

**ESTUDO DE FATORES MOLECULARES
PROGNÓSTICOS E PREDITIVOS DO LINFOMA NÃO-
HODGKIN DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B
ATRAVÉS DE *TISSUE MICROARRAYS***

VICTOR PIANA DE ANDRADE

**Tese de Doutorado apresentada à Fundação
Antônio Prudente para a obtenção do Grau
de Doutor em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Fernando Augusto Soares

**São Paulo
2006**

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Andrade, Victor Piana

Estudo de fatores moleculares prognósticos e preditivos do linfoma não-Hodgkin difuso de grandes células B através de tissue microarrays / Victor Piana de Andrade – São Paulo, 2005.

105p.

Tese (doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS. 2. LINFOMA NÃO HODGKIN. 3. PROGNÓSTICO. 4. BIOLOGIA MOLECULAR/métodos. 5. IMUNOHISTOQUÍMICA.

AGRADECIMENTOS - FAPESP

Esta pesquisa recebeu o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP registrada sob o número de processo 2003/13572-0.

AGRADECIMENTOS

Durante estes quatro anos o trabalho foi difícil e recompensador, às vezes com intercorrências que retardaram seu andamento além do esperado pelo aluno e orientador. O término representa um passo a mais dentro de um projeto de vida acadêmica. O sucesso precisa ser dividido com todos os colaboradores diretos e indiretos. Destaco aqui alguns daqueles a quem tenho admiração e gratidão pelo convívio e ajuda inestimáveis:

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares pela orientação e compreensão ao longo dos anos, apesar das minhas particularidades de trabalhar e morar em outro estado no início do projeto e da minha transferência para São Paulo na metade do projeto com todas as dificuldades inerentes;

Ao Dr. José Humberto Tavares Guerreiro Fregnani pelo auxílio com a análise dos dados e sugestões técnicas.

Ao Dr. José Cabeçadas do Instituto Português de Oncologia, Lisboa – Portugal, pela disponibilidade na realização de uma das reações imunoistoquímicas para o anticorpo BCL6 diante das nossas dificuldades técnicas em obter uma coloração ideal;

Ao Dr. José Carlos Morais pelo acompanhamento, críticas e sugestões valiosas ao longo dos quatro anos do projeto.

Ao Dr. Daniel Cubero pelo auxílio na interpretação dos dados clínicos e revisão dos prontuários;

Aos técnicos do laboratório de Anatomia Patológica e do Instituto Ludwig: José Ivanildo Neves, Sueli Nonogaki, Carlos F. Nascimento, Severino da Silva Ferreira e César Eugênio Nascimento Braga pela presteza e habilidade no levantamento dos casos, construção dos blocos de TMA e reações imunoistoquímicas;

Aos colegas de pós-graduação pela troca de idéias e experiências durante as reuniões periódicas e convívio diário;

À minha esposa Danieli CO Andrade e demais familiares pelo apoio e compreensão durante o andamento do projeto.

RESUMO

Andrade VP. **Estudo de fatores moleculares prognósticos e preditivos do linfoma não-Hodgkin difuso de grandes células B através de tissue microarrays** São Paulo; 2006. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Os linfomas difusos de grandes células B (LDGCB) compõem um grupo heterogêneo do ponto de vista clínico, morfológico, molecular e de resposta ao tratamento. O Índice Prognóstico Internacional (IPI) é o fator prognóstico mais importante mas os avanços no conhecimento molecular permitiu a identificação de subgrupos baseados no perfil ontogenético do linfócito B (“centro germinativo” vs. “linfócito ativado”) com diferenças prognósticas independente do IPI. Avaliamos a expressão protéica por *tissue microarrays* de proteínas relacionadas ao ciclo celular, apoptose, diferenciação do linfócito e resposta a citocinas/metabolismo oxidativo em 109 pacientes adultos com LDGCB nodal diagnosticados e tratados com esquema baseado em antraciclina no Hospital do Câncer AC Camargo. **RESULTADOS:** As variáveis estágio clínico, remissão completa, IPI, p53, OCT2, ciclina G1 e B1 e NF-kappaB mostraram significância estatística ($p < 0,05$) para a sobrevida câncer-específica em 5 anos na análise univariada. A classificação ontogenética (CD10/BCL6/MUM1) foi possível mas não mostrou relevância clínica ($p=0,348$). O modelo de regressão Cox incluiu apenas IPI e remissão completa. O grupo IPI de baixo risco esteve associado a positividade para STAT1 ($p=0,017$) e cJUN ($p=0,041$). Pacientes com IPI de baixo risco e evolução desfavorável associaram-se a positividade para BCL2 ($p=0,029$). Um algoritmo elaborado a partir da expressão de OCT2 e p53 foi capaz de identificar três grupos com diferentes curvas de sobrevida ($p=0,02$) **CONCLUSAO:** A melhor maneira de usar o conhecimento molecular nos LDGCB ainda não está clara. Um modelo de classificação multi-função parece ser mais racional do que aquele baseado apenas na diferenciação do linfócito.

SUMMARY

Andrade VP. **Predictive and prognostic factors in diffuse large B-cell lymphoma using Tissue Microarrays.** São Paulo; 2006. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Genetic profiling has confirmed Diffuse Large B-cell Lymphoma (DLBCL) subtypes with distinct clinical outcomes named “germinal center” (GC) and “activated B-cell” (ABC). Apoptosis and cell cycle pathways are also of clinical importance. We evaluated protein expression in 109 specimens from adult patients with nodal DLBCL. METHODS: Forty-four antigens covering cell cycle, apoptosis, lymphoid differentiation markers and cytokines response/oxidative metabolism were studied using *tissue microarray* technology. RESULTS: No statistic difference on cancer specific survival was noted between GC and ABC profiles ($p=0.348$). International Prognostic Index (IPI), complete remission, clinical stage, p53, OCT2, cyclin G1 and B1 and NF-kappaB were considered statistically significant by univariate analysis ($p<0.05$). Cox regression model identified complete remission and IPI as predictive variables. Low-risk IPI was associated to positive STAT1 ($p=0,017$) and cJUN ($p=0,041$). Patients with low-risk IPI but poor outcome were associated with positive BCL2 ($p=0,029$). Grouping OCT2 and p53 results identified three subgroups with distinct survival curves ($p=0,02$). CONCLUSION: A multi-pathway approach seems to be more rational for molecular profiling of DLBCL.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Processo de maturação do linfócito B.	8
Figura 2	Relação dos linfomas não-Hodgkin com as etapas da maturação dos linfócitos	9
Figura 3	FOTOMICROGRAFIA - Linfoma difuso de grandes células B centroblástico.	14
Figura 4	FOTOMICROGRAFIA - Linfoma Difuso de Grandes Células B Immunoblástico. 155	
Figura 5	FOTOMICROGRAFIA - Linfoma Difuso de Grandes Células B rico em células T e histiócitos.	16
Figura 6	FOTOMICROGRAFIA - Linfoma Difuso de Grandes Células B anaplásico.	17
Figura 7	FOTOMICROGRAFIA - Linfoma Difuso de Grandes Células B plasmablástico.	19
Figura 8	Alterações moleculares mais freqüentes nos linfomas difusos de Grandes Células B.	26
Figura 9	Descoberta dos subtipos de LDGCB pelo perfil molecular.	30
Figura 10	Equipamento manual para construção dos Tissue Microarrays.	34
Figura 11	Protocolo de anotação dos dados morfológicos e imunoistoquímicos.	39
Figura 12	Planilha de ordenação dos casos no Tissue Microarray.	41
Figura 13	Blocos de TMA construídos a partir de 297 biópsias de linfomas de grandes células.	42
FIGURA 14	A: Lamina representativa do Bloco A (nível 120), corada pela Hematoxilina e eosina. B: Detalhe de um caso.	42
Figura 15	FOTOMICROGRAFIA - reação imunoistoquímica demonstrando a especificidade da marcação. ANTICORPO p16; 25x.	43
Figura 16	FOTOMICROGRAFIA - Detalhe do LDGCB corado pelo método imunoistoquímico. ANTICORPO p16; A:100x. B:400x	43

Figura 17 Algoritmo para classificação molecular dos Linfomas Difusos de Grandes Células B pela imunoistoquímica segundo Hans et al. 2004.	47
Figura 18 Protocolo de anotação dos dados obtidos a partir da revisão dos prontuários clínicos.	49
Figura 19 Critérios para elaboração do IPI adaptado	50
Figura 20 GRÁFICO DA Proporção de casos CD20+, CD20(-) e não avaliáveis no bloco de TMA. 553	
Figura 21 GRÁFICO DA Proporção de casos negativos e positivos fraco, moderado e forte na análise imunoistoquímica dos marcadores da diferenciação linfocitária.	54
Figura 22 Gráfico da proporção de casos negativos e positivos fraco, moderado e forte na análise imunoistoquímica dos marcadores da apoptose.	54
Figura 23 Gráfico da proporção de casos negativos e positivos fraco, moderado e forte na análise imunoistoquímica dos marcadores Do ciclo celular.	55
Figura 24 Gráfico da proporção de casos negativos e positivos fraco, moderado e forte na análise imunoistoquímica dos marcadores De resposta a citocinas.	55
Figura 25 GRÁFICO DA comparação das curvas de Kaplan-Meier entre os grupos com IPI de baixo risco e IPI de alto risco.	57
Figura 26 GRÁFICO DA comparação das curvas de Kaplan-Meier entre os grupos com e sem remissão completa após esquema quimioterápico de primeira linha.	59
Figura 27 GRÁFICO DA comparação entre as curvas de Kaplan-Meier referentes aos grupos OCT2 positivo e OCT2 negativo.	63
Figura 28 GRÁFICO DA comparação entre as curvas de Kaplan-Meier referentes aos grupos p53 positivo e p53 negativo.	63
Figura 29 GRÁFICO DA comparação entre as curvas de Kaplan-Meier referentes aos grupos Ciclina G1 positivo e Ciclina G1 negativo	64

Figura 30	GRÁFICO DA comparação entre curvas de Kaplan-Meier referentes aos grupos NF-kappaB positivo e NF-kappaB negativo	64
Figura 31	Algoritmo alternativo para a classificação molecular dos LDGCB pela imunistoquímica.	65
Figura 32	Conjunto de marcadores imunistoquímicos usados na classificação dos LDGCB segundo o perfil ontogenético.	66
Figura 33	GRÁFICO DA COMPARAÇÃO ENTRE AS CURVAS DE KAPLAN-MEIER DE ACORDO COM O NÚMERO DE FATORES ADVERSOS IDENTIFICADOS PELO MODELO MULTIVARIADO COX (IPI E REMISSÃO COMPLETA).	68
Figura 34	Algoritmo elaborado a partir das variáveis moleculares OCT2 e p53 para classificação do risco de evolução desfavorável após tratamento padrão em pacientes com linfoma difuso de grandes células B.	70
Figura 35	GRÁFICO DA comparação das curvas de Kaplan-Meier considerando a sobrevida câncer-específica em 60 meses para os grupos OCT2(-), OCT2+/p53+ e OCT2+/p53(-)	71

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	CLASSIFICAÇÃO DAS NEOPLASIAS LINFÓIDES	4
QUADRO 2	FATORES MOLECULARES PROGNÓSTICOS DO LDGCB	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Neoplasias linfóides de células B maduras, suas frequências relativas, célula de origem proposta e alterações moleculares descritas.	5
Tabela 2	Principais diferenças descritas entre os Linfomas difusos de grandes células B com perfil do linfócito B do centro germinativo daqueles com perfil semelhante ao linfócito B ativado.	29
Tabela 3	Anticorpos e respectivos protocolos utilizados nas reações imunoistoquímicas.	44
Tabela 4	Crítérios de graduação imunoistoquímica a partir da intensidade da marcação e porcentagem de células neoplásicas marcadas. Os casos foram categorizados em imunomarcação ausente, fraca, moderada e forte.	46
Tabela 5	Taxas de Sobrevida global média, Sobrevida livre de doença média e remissão completa segundo o estadiamento clínico.	57
Tabela 6	Análise univariada dos parâmetros clínicos em relação a sobrevida câncer específica em 5 anos.	58
Tabela 7	Análise univariada da marcação imunoistoquímica para cada painel estudado em relação a sobrevida câncer específica em 5 anos.	61
Tabela 8	Análise univariada da sobrevida câncer-específica em 5 anos (SCE-5) segundo a resultado imunoistoquímico categorizado em negativo e positivo.	62
Tabela 9	Análise multivariada. Modelo regressão Cox estável com a presença das variáveis clínicas IPI e remissão completa.	67
Tabela 10	Simulação do modelo de regressão Cox antes da inclusão do IPI.	69
Tabela 11	Sobrevida câncer-específica e sobrevida mediana dos grupos OCT2 negativo, OCT2negativo/p53positivo e CT2 positivo /p53 negativo ($p=0,02$).	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CDK	Proteína quinase dependente de ciclina – do inglês: <i>cyclin-dependent kinase</i>
cDNA	DNA complementar
DHL	Desidrogenase Láctica sérica
Ig	Imunoglobulina
IgH	Imunoglobulina de cadeia pesada
IgL	Imunoglobulina de cadeia leve
IFN	Interferon
IPI	Índice Prognóstico Internacional
LNH	Linfoma não-Hodgkin
LDGCB	Linfoma difuso de grandes células B
LDGCB-CG	Linfoma difuso de grandes células B com perfil “centro germinativo”.
LDGCB-A	Linfoma difuso de grandes células B com perfil “célula B ativada”.
OMS	Organização Mundial da Saúde
RCB	Receptor de células B
REAL	Revised European and American Lymphoma
RR	Risco relativo
SCE-5	Sobrevida câncer-específica em 5 anos
TMA	Tissue Microarray

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Linfomas Nao-Hodgkin	1
1.2	A Ontogênese do Linfócito B	4
1.3	O Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB)	10
1.4	Os Estudos de Expressão Gênica com CDNA Microarrays	27
1.5	Os Estudos de Tissue Microarrays	33
1.6	Justificativa	36
2	OBJETIVOS	37
3	CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1	Coorte Retrospectiva	38
3.2	Construção do Arranjo Tecidual Em Matriz	40
3.3	Marcadores Moleculares - Imunoistoquímica	44
3.4	Análise Microscópica dos Marcadores Moleculares	45
3.5	Revisão dos Prontuários	48
3.6	Métodos Estatísticos	52
4	RESULTADOS	53
4.1	Marcadores Imunoistoquímicos	53
4.2	Caracterização dos Pacientes Incluídos na Análise de Sobrevida	56
4.3	A Análise Univariada	58
4.4	A Análise Multivariada	67
5	DISCUSSÃO	72
6	CONCLUSÕES	88
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

ANEXOS

Anexo 1 Estadiamento de Ann Arbor para Linfomas.

Anexo 2 Critérios de avaliação da capacidade física do paciente
(Performance Status).

Anexo 3 Avaliação caso a caso da representação do linfoma difuso
de grandes células no cilindro amostrado, considerando os
diferentes níveis corados pela Hematoxilina e eosina.

Anexo 4 Identificação das lâminas obtidas a partir do Bloco TMA A.

Anexo 5 Identificação das lâminas obtidas a partir do bloco TMA B.

1 INTRODUÇÃO

1.1 LINFOMAS NÃO-HODGKIN

Os linfomas não-Hodgkin (LNH) constituem um grupo particular de neoplasias malignas. Cerca de 95% tem origem nas células de linhagem B exibindo grande heterogeneidade no comportamento biológico entre os subtipos histológicos e clínicos (KUPPERS 2005). A distinção de cada tipo de linfoma é relevante tanto do ponto de vista da patogênese como das conseqüências de cada uma das opções terapêuticas. Durante décadas diferentes grupos propuseram classificações puramente morfológicas para tentar agrupar as entidades e orientar o tratamento, entre elas as classificações de LENNERT (1969), de LUKES e COLLINS (1975), de RAPPAPORT (1974), do National Cancer Institute (NCI) (1982) conhecida como “Working Formulation” e a classificação de Kiel. Nenhuma outra área da patologia passou por tantas modificações nas classificações no último século, retratando a dificuldade deste objeto de estudo. Embora estas classificações tenham sido úteis durante um longo tempo, a complexidade biológica sempre trouxe limitações práticas para o tratamento e prognóstico. Mesmo com todas as limitações, sempre esteve claro haver um grupo de LNH de baixo grau, isto é, baixo índice proliferativo, com curso indolente mas pouca resposta ao tratamento quimioterápico e outro grupo rapidamente progressivo com alto índice mitótico e significativa resposta ao

tratamento quimioterápico. A partir da década de 80 os estudos de biologia molecular e a aplicação da imunofenotipagem por imunistoquímica ou citometria de fluxo trouxeram novos elementos no entendimento da patogênese dos linfomas. Em 1994 foi proposta a classificação *Revised European and American Lymphoma classification* (REAL) considerando aspectos morfológicos e imunofenotípicos. Todos os LNH de células B agressivos, sem elementos suficientes para a caracterização de Linfoma Linfoblástico ou de Linfoma de Burkitt, foram englobados no termo Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB). Apesar disto, os autores reconheciam que este grupo abrigava neoplasias com imensa variedade de aspectos clínicos e aspectos morfológicos (HARRIS et al. 1994). A mais recente classificação das neoplasias hematopoéticas, publicada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2001 (JAFFE et al. 2001), se baseou no conceito da classificação REAL de 1994 e utiliza elementos morfológicos e moleculares para definir entidades clínico-patológicas (Quadro 1).

Tanto nas classificações puramente morfológicas como nas mais recentes nota-se uma tentativa de se traçar um paralelo entre os subtipos de LNH e as fases do desenvolvimento do linfócito. As mais recentes descobertas no campo da biologia molecular dão suporte a este esquema. Cada um dos LNH apresenta hoje uma postulada célula de origem baseado no seu perfil molecular e um correspondente panorama das alterações moleculares, principalmente as translocações cromossômicas, que uma vez acumuladas levam a transformação e progressão da doença (Tabela 1).

<p>Neoplasia de células B precursoras Linfoma linfoblástico de células B</p> <p>Neoplasia de células B maduras Leucemia linfocítica crônica/ Linfoma linfocítico Leucemia pró-linfocítica de células B Linfoma linfoplasmacítico Linfoma da zona marginal esplênico Leucemia de células pilosas (Hairy cell) Mieloma múltiplo Plasmocitoma solitário ósseo Plasmocitoma extra-ósseo Linfoma da zona marginal extra-nodal do tecido linfóide associado à mucosa (MALT) Linfoma da zona marginal nodal Linfoma folicular Linfoma de células do manto Linfoma difuso de grandes células B Linfoma de grandes células B mediastinal (tímico) Linfoma de grandes células B intravascular Linfoma de grandes células B primário de efusões Linfoma/leucemia de Burkitt</p>	<p>Neoplasia de células T precursoras Linfoma linfoblástico de células T Linfoma de células NK blástico</p> <p>Neoplasia de células T maduras Leucemia prolinfocítica de células T Leucemia Linfocítica de células grandes granulares Leucemia de células NK agressiva Linfoma/Leucemia de células T do adulto Linfoma T/NK extranodal, tipo nasal Linfoma T tipo enteropático Linfoma T hepatoesplênico Linfoma T subcutâneo paniculite-símile Micose fungóide Síndrome de Sezary Linfoma de grandes células anaplásicas cutâneo Linfoma de células T periféricas, SOE Linfoma angioimunoblástico Linfoma anaplásico de grandes células T/nulo</p> <p>Proliferação de células B de potencial maligno incerto Papulose linfomatóide</p>
<p>Proliferação de células B de potencial maligno incerto Granulomatose linfomatóide Doença linfoproliferativa pós-trasplante, polimórfica</p>	<hr/> <p>Linfoma de Hodgkin Predominância linfocitária nodular Linfoma de Hodgkin clássico (LH) LH esclerose nodular LH rico em linfócitos LH celularidade mista LH depleção linfocitária</p>

Quadro 1 - Classificação das neoplasias linfóides.

Fonte: Jaffe et al (2001).

Entretanto, está cada vez mais claro que os LNH não têm crescimento autônomo como se imaginava mas dependem de fatores que estimulem a proliferação e sobrevivência do linfócito neoplásico, a semelhança dos linfócitos normais. Assim, a ampliação do conhecimento sobre a ontogênese dos linfócitos bem como dos fatores moleculares envolvidos em cada fase da maturação têm verdadeiramente revolucionado a abordagem dos LNH.

1.2 A ONTOGÊNESE DO LINFÓCITO B

O desenvolvimento dos linfócitos B depende de várias etapas, se inicia na medula óssea e se completa no centro germinativo do linfonodo, com grande dependência da aquisição do receptor de células B (RCB) competente para transmissão dos sinais externos que permitem sua sobrevivência, diferenciação e ativação. Um RCB é composto por duas imunoglobulinas de cadeia pesada (IgH) idênticas e duas Imunoglobulinas de cadeia leve (IgL) kappa ou lambda idênticas. Existem ainda moléculas acessórias acopladas ao RCB (CD79a e CD79b) com domínios intracitoplasmáticos que auxiliam na transmissão intra-celular dos sinais recebidos nos RCB. Na dependência do estágio de maturação do RCB e de suas moléculas acessórias um célula B ativada por um antígeno poderá ser induzida a proliferar e/ou evoluir a novas etapas da diferenciação. As células B são capazes de gerar uma diversidade de Ig`s muito maior do que o número de genes existentes para codificá-las.

Tabela 1 - Neoplasias linfóides de células B maduras, suas freqüências relativas, célula de origem proposta e alterações moleculares descritas.

Linfoma	Freqüência (%)	Célula de origem proposta	Translocação Cromossômica	Genes Supressores de Tumor
Manto	5	Zona Manto CD5+	CCND1-IgH	ATM
LLC-B	7	Virgem? Memória? Zona marginal?		ATM, TP53
Folicular	20	CG	BC2-IgH	
LDGCB	30-40	CG ou pós-CG	BCL6-varios BCL2-IgH MYC-IgH MYC-IgL	CD95 ATM TP53
Primário Mediastinal	2	Celula B tímica		SOCS1
Burkitt	2	CG	MYC-IgH MYC-IgL	TP53, RB2
Pós-transplante	<1	CG		
LH Clássico	10	CG defeituosa		
LH Predominância Linfocitária	0.5	CG	BCL6-varios	
Zona Marginal Esplênico	1	Virgem com diferenciação zona marginal		
MALT	7	Zona marginal	API2-MALT1 BCL10-IgH MALT1-IgH FOXP1-IgH	CD95
Linfoplasmacítico	1	pós-CG	PAX5-IgH	
Primário de efusões	<0.5	pós-CG		
Mieloma Múltiplo	10	plasmócito	CCND1-IgH FGFR3-IgH MAF-IgH	CD95

Fonte: Modificado de KÜPPERS (2005)

Legenda: LLC-B: Leucemia linfóide crônica B, LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B, LH: Linfoma de Hodgkin, MALT: Linfoma do tecido linfóide associado a mucosa, CG: centro-germinativo

Este processo ocorre por meio do rearranjo dos segmentos dos genes da IgH e IgL. No gene da IgL existem 40 regiões V (Variável) codificadoras e 5 regiões J (do inglês Joining). Apenas uma das 40 regiões V e uma das 5 regiões J estarão expressas na molécula IgL em uma determinada célula B. De modo semelhante a IgH de uma determinada célula B é resultado do rearranjo e expressão de uma das 51 regiões V, uma das 27 regiões D (Diversidade) e uma das 6 regiões J. O número de combinações possíveis por estes rearranjos já explica boa parte da diversidade de sítios de reconhecimento antigênico nas células B, entretanto esta diversidade ainda será muito ampliada por outros mecanismos que acontecem no centro germinativo do linfonodo.

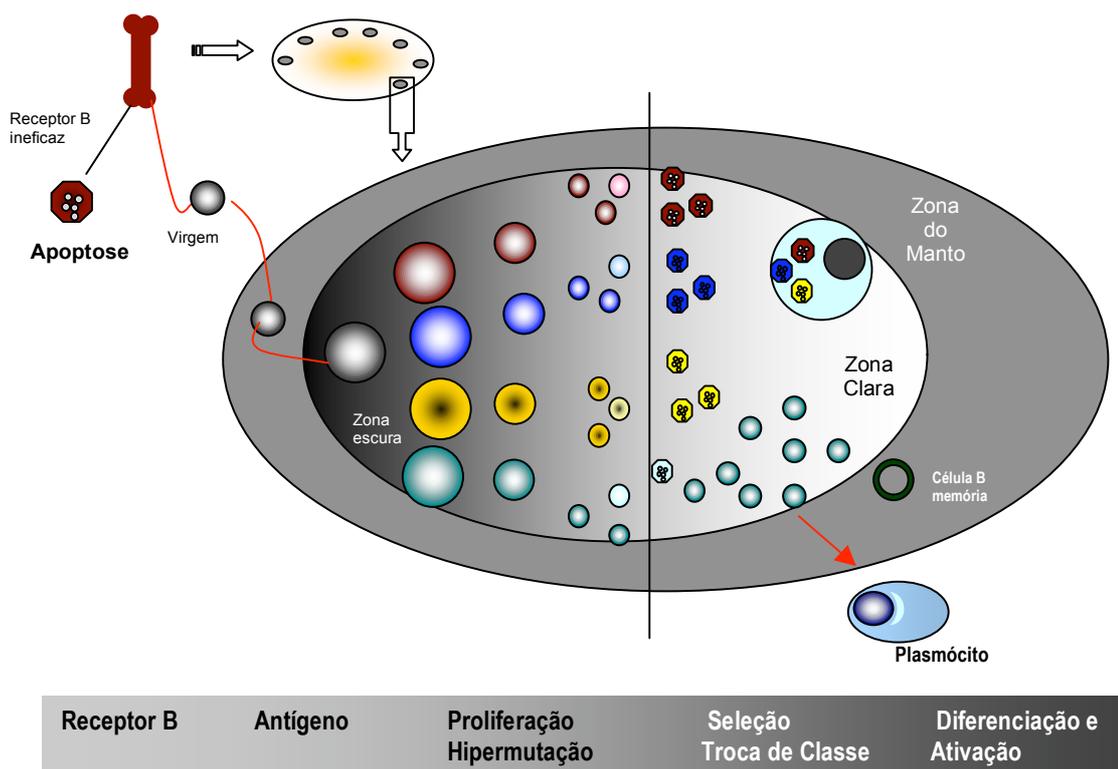
As etapas iniciais na medula óssea terminam com este rearranjo das regiões V, D e J do gene da IgH e V e J do gene da IgL e aquisição do RCB na superfície celular. As células B que expressarem um RCB eficiente e sem propriedades auto-reativas deixarão a medula óssea e diferenciarão em células B *naive* (sem exposição prévia a antígenos). As células B *naive* podem ser ativadas por antígenos que se liguem aos RCB e participar das respostas imunes. As células B portadoras de RCB ineficientes ou auto-reativos são induzidas à apoptose (KUPPERS 2005).

As etapas finais da maturação ocorrem no linfonodo onde o processo de maturação do RCB se completa através da modificação dos genes das Ig's pela hipermutação somática ("ajuste fino" da seqüência da região variável feita por mutações de ponto capaz de aumentar mais a diversidade

e afinidade das moléculas de Ig) e troca de classes (mudança da região constante da IgH sem alteração da região variável).

Cada etapa da maturação do linfócito no centro germinativo é caracterizado por uma estrutura em evolução do RCB com diferentes marcadores moleculares de diferenciação e estes perfis moleculares estão associados com determinadas regiões da microanatomia do centro germinativo como ilustrados na Figura 1. Uma neoplasia de células B maduras representa um clone com um rearranjo V(D)J específico, diferente de uma hiperplasia linfóide onde é possível determinar a presença de diversos clones pela presença de diferentes combinações V(D)J.

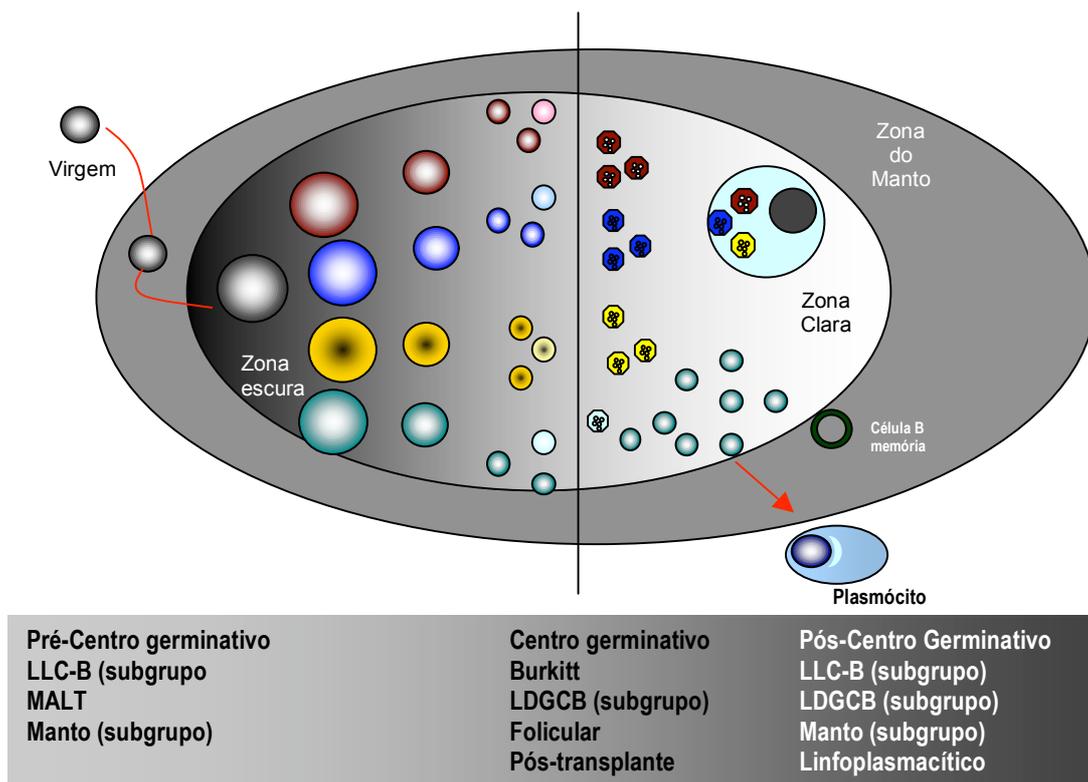
Um dos principais conceitos na patogênese dos LNH se baseia na observação das semelhanças morfológicas e moleculares dos linfomas com determinadas etapas da maturação e agrupa os LNH de células B em derivados do linfócito que se encontra em alguma etapa da maturação dentro do centro germinativo ou derivados do linfócito pós-centro germinativo (Figura 2). No entanto, para além de esclarecer a ontogênese dos linfócitos B e traçar um paralelo com a classificação dos LNH de células B os estudos moleculares demonstraram pequenas diferenças nos perfis moleculares dentro das atuais categorias existentes na classificação da OMS de 2001. Por exemplo, na Leucemia Linfocítica Crônica/Linfoma Linfocítico, considerada uma neoplasia de células B naive, há um subgrupo de com mutação da região variável dos genes da Ig, retratando uma exposição previa ao centro germinativo (OPPEZZO et al.2002).



Fonte: Traduzido de KÜPPERS (2005).

Legenda: As células B maduras naive que recebem estímulos dos linfócitos T entram nos folículos primários dos órgãos linfóides como linfonodos onde estabelecem os centros germinativos (elipse interna). As células B sem contato com antígenos (virgens; IgM+IgD+) que constituem os folículos primários são substituídas pelas células B proliferantes e deslocadas para a periferia onde formam a zona do manto ao redor dos CG (elipse externa). No CG uma zona escura e uma zona clara podem ser percebidas (lado esquerdo e direito da elipse interna, respectivamente). A zona escura consiste principalmente de células B em proliferação, enquanto a zona clara contém células em repouso. Nas células em proliferação o processo hipermutação somática está ativado, o que leva à introdução de mutações nos genes contendo regiões variáveis (V) rearranjadas. A maioria das mutações são desfavoráveis para as células, como aquelas que levam à diminuição da afinidade dos Receptores B para os antígenos levando as células para a apoptose. Uma pequena fração das células B do CG adquirem mutações nos Receptores B que aumentam sua afinidade pelo antígeno, e estas células serão selecionadas positivamente (verdes). O processo de seleção presumivelmente ocorre na zona clara, onde as células B do CG estão em íntimo contato com os linfócitos T CD4 e células dendríticas foliculares. Uma fração destas células B do CG sofrem mudanças na classe das Ig por recombinação. Finalmente, as células B do CG se diferenciam em células B de memória ou plasmócitos e deixam o microambiente do CG.

Figura 1 - Processo de maturação do linfócito B.



Fonte: Modificado de KUPPERS (2005).

Legenda: Os linfomas humanos de células B são relacionados com a contraparte normal das células B. A maioria dos linfomas derivam de células do centro germinativo (CG) ou de células pós-CG, indicando o papel do CG na patogênese. A figura mostra o CG circundado por um manto de células B naive, a maioria CD5+ - este deve compreender um subgrupo particular de célula B. A zona marginal é uma zona rica em células B, localizada entre os folículos e a área de células T no baço (uma zona similar está presente nas placas de Peyer, mas geralmente ausente nos linfonodos). A origem dos linfomas da zona marginal é incerta, e provavelmente inclui linfócitos B de memória pós-CG e células B naive envolvidas na resposta imune independente dos linfócitos T. Linfomas do tecido linfóide associado a mucosa (MALT) e linfomas da zona marginal nodais (nao indicados)são presumivelmente derivados das células B da zona marginal. Linfomas da zona marginal esplênico comprometem as células foliculares e da zona marginal, geralmente portadores de genes com regiões variáveis (V) não-mutadas. Estes linfomas, portanto, devem ser derivados das células B naive prestes a sofrerem diferenciação a linfócitos B da zona marginal. Enquanto a maioria dos linfomas do manto derivam de linfócitos naive CD5+ da zona do manto, cerca de 20-30% dos casos exibem genes da Ig com regiões V mutadas, indicando que as células foram expostas a antígenos no CG. A origem da leucemia linfocítica crônica (LLC) tem sido debatida. Cerca de metade dos casos exibem mutações da região V dos genes da Ig. Ambos os subgrupos de LLC parecem derivar das células CD5+, de memória ou da zona marginal. Os linfomas pós-transplante geralmente são derivados de células B expressando BCR selecionadas pós-exposição antigênica, enquanto outros parecem derivar de células B do CG no estágio pré-apotótico. Estudos de expressão gênica em larga escala identificaram dois subtipos mais importantes de Linfoma Difuso de Grandes Células (LDGCB), um com perfil similar ao linfócito do centro germinativo (LDGCB-CG), e outro similar ao linfócito ativado in vitro (LDGCB-A). O linfoma primário do mediastino parece ser derivado de uma célula B tímica pós-CG.

Figura 2 - Relação dos linfomas com as etapas da maturação dos linfócitos.

Nos linfomas difusos de grandes células B (LDGCB) há um grupo com perfil molecular mais semelhante com o linfócito do centro germinativo (LDGCB-CG) e outro com perfil mais semelhante com o linfócito B ativado ou pós-centro germinativo (LDGCB-A) (ALIZADEH et al. 2000).

1.3 O LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B (LDGCB)

EPIDEMIOLOGIA

O LDGCB é o tipo mais comum de linfoma não-Hodgkin em todo o mundo, correspondendo a 30-40% do total dos casos, acometendo tanto crianças como adultos. Cerca de 55% dos casos ocorrem em homens, com média de idade de 64 anos (ARMITAGE 2001). Os dados disponíveis no endereço eletrônico do Instituto Nacional de Câncer (INCA) citam uma incidência de Linfomas não-Hodgkin no Brasil segundo as cidades participantes de 4,30 a 14,10 casos novos em homens por 100.000 habitantes por ano (São Paulo tem 13 casos novos por 100.000 habitantes por ano) e 3,2 a 8,6 casos novos em mulheres por 100.000 habitantes por ano (São Paulo tem 8,6 casos novos por 100.000 habitantes por ano) (Ministério da Saúde 2003). A *American Cancer Society* (ACS) estima, para 2006, 58.870 casos novos de Linfoma não-Hodgkin, sendo 30.680 em homens e 28.190 em mulheres (NCI 2006).

ASPECTOS CLÍNICOS

O LDGCB é uma doença de crescimento rápido envolvendo sítios nodais e extra-nodais, com evolução fatal sem o tratamento. A sobrevida global em 5 anos é de 46 % enquanto a sobrevida livre de doença em 5 anos é de 41%. Metade dos pacientes se apresentam em estágio inicial (I ou II) e cerca de 17% dos pacientes exibem comprometimento da medula óssea ao diagnóstico (ARMITAGE 2001).

Via de regra, o diagnóstico é feito através da biópsia cirúrgica com avaliação morfológica e imunoistoquímica. Um paciente ao ser diagnosticado como portador de LDGCB precisa da avaliação de uma série de características clinico-laboratoriais para o estadiamento e planejamento do tratamento. Os principais fatores prognósticos e preditivos clínicos isolados são:

1. Idade: ≤ 60 *versus* > 60 anos
2. Estadiamento Ann Arbor: ≤ 2 *versus* > 2 ; (Anexo 1)
3. Numero de sítios extra-nodais: ≤ 1 *versus* > 1
4. Nível sérico de Desidrogenase Láctica (DHL): normal *versus* elevada
5. Capacidade física (*performance status*): ≤ 1 *ou* ≥ 2 (Anexo 2).

A reunião dos cinco fatores acima em um escore deu origem ao Índice Prognóstico Internacional (IPI) que classifica os pacientes em baixo risco (até 1 fator) risco intermediário/baixo (2 fatores) risco intermediário/alto (3 fatores) e alto risco (4 ou 5 fatores), com sobrevida em 5 anos de 73%, 51%, 43% e 26%, respectivamente (SHIPP et al 1993). Este índice é o fator preditivo padrão para pacientes com LDGCB e foi proposto em 1993 pelo

Projeto Internacional de Fatores Prognósticos em Linfoma não-Hodgkin. No entanto, uma proporção relevante dos pacientes classificados como baixo risco através do IPI apresentam evolução desfavorável, bem como pacientes classificados como alto risco evoluem favoravelmente (COIFFIER 2005). A identificação dos pacientes que não se beneficiam do tratamento padronizado é a base do tratamento alternativo ajustados ao risco de cada paciente. Comumente observamos o uso do IPI categorizado apenas em baixo-risco (até 2 fatores adversos) e alto-risco (3 ou mais fatores adversos).

O uso do IPI como fator prognóstico e preditivo já foi validado para os LDGCB (NICOLAIDES et al. 1998; WILDER et al. 2002). Trinta e um por cento dos pacientes apresentam IPI de baixo grau (0/1), enquanto em 16% apresentam IPI de alto grau (4/5) (ARMITAGE 2001). Nos pacientes com IPI de baixo risco (0/1) a sobrevida global em 5 anos é de 73% e a sobrevida livre de doença é de 63%, enquanto para os pacientes com IPI de alto risco (4/5) estes índices são de 22% e 19%, respectivamente (ARMITAGE 2001).

Os LDGCB são potencialmente curáveis dependendo das características do tumor e do paciente. São muitos os esquemas de quimioterapia empregados, via de regra todos incluem drogas do grupo das antraciclinas. Não foi demonstrado uma superioridade de algum dos esquemas e o mais usado é o esquema CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona) por apresentar menor toxicidade e regime de administração menos complicado (COIFFIER 2005). Cerca de 35 a 40% dos pacientes apresentam-se vivos após 5 anos e cerca de 30% dos pacientes não respondem ou apresentam recaída logo após o fim do

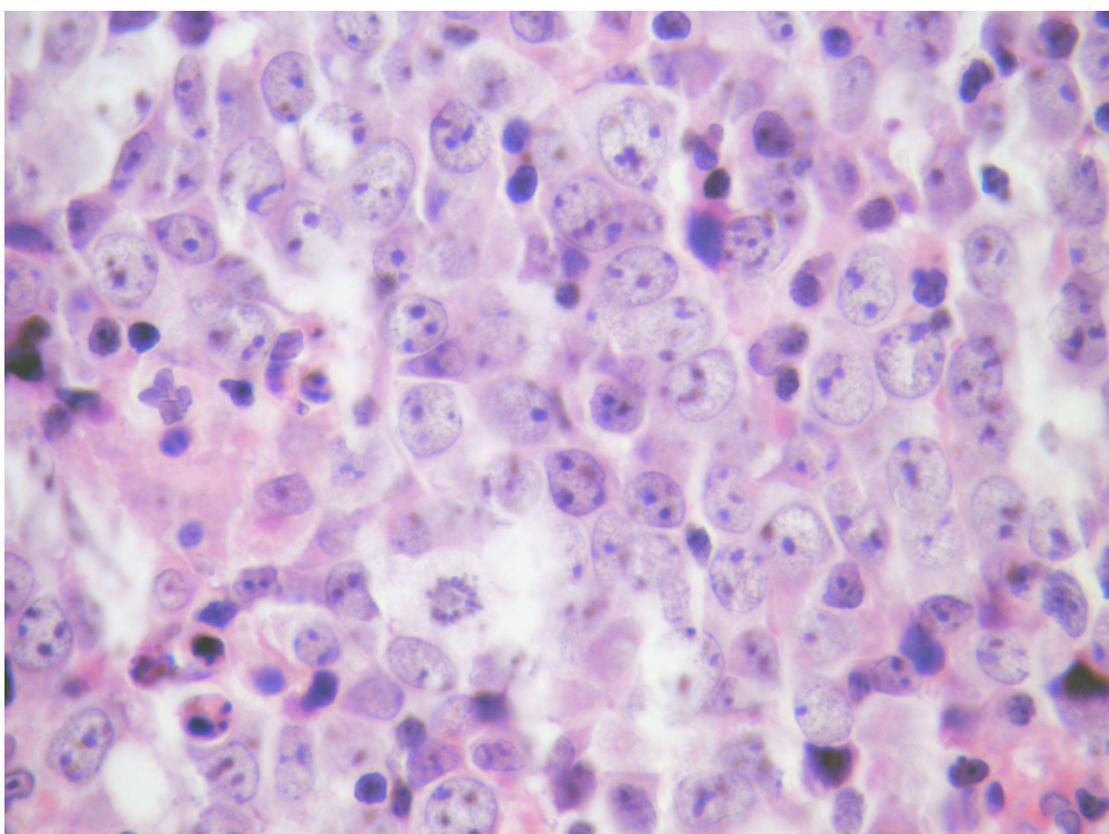
tratamento. Novos esquemas com intensificações da dose ou do regime de administração do esquema CHOP ou equivalente, além da inclusão do transplante de medula óssea para se evitar recidivas, têm sido usados em grupos específicos de pacientes e alguns mostraram superioridade ao regime de CHOP clássico (COIFFIER 2003; TILLY et al. 2003; COIFFIER e REYES 2005). A adjuvância de anticorpos monoclonais anti-CD20 (Rituximab) ao tratamento clássico, conhecido como R-CHOP, tem mostrado superioridade no que se refere a progressão da doença durante o tratamento e recidivas (COIFFIER et al. 2002; MOUNIER et al. 2003; FEUGIER et al. 2005). Pacientes idosos, com IPI de alto risco, ou com doença recidivada têm sido submetidos a testes de variados esquemas de tratamento para se tentar melhorar as taxas de sobrevida.

ASPECTOS MORFOLÓGICOS

Por definição o LDGCB são constituídos por células linfóides com núcleos pelo mínimo duas vezes maior que o linfócito normal ou maior do que o núcleo do histiócito. A célula pode exibir grande variação no contorno nuclear, no padrão cromatínico e na quantidade de citoplasma. Os casos de LDGCB segundo a classificação da OMS de 2001 correspondem na sua maioria aos diagnosticados nas classificações anteriores como: difuso de grandes células, difuso de células mistas, imunoblástico (NCI 1982), difuso centroblastico, difuso centroblastico ou centrocítico, ou imunoblástico (Kiel). Os LDGCB expressam consistentemente os marcadores de células B como CD20, CD19, CD22 e CD79a. A classificação da OMS para os LDGCB não

utiliza um único critério e engloba entidades de novo, casos de progressão a partir de linfomas de baixo grau e casos associados a imunodeficiências. São reconhecidas as seguintes variantes quanto ao padrão morfológico:

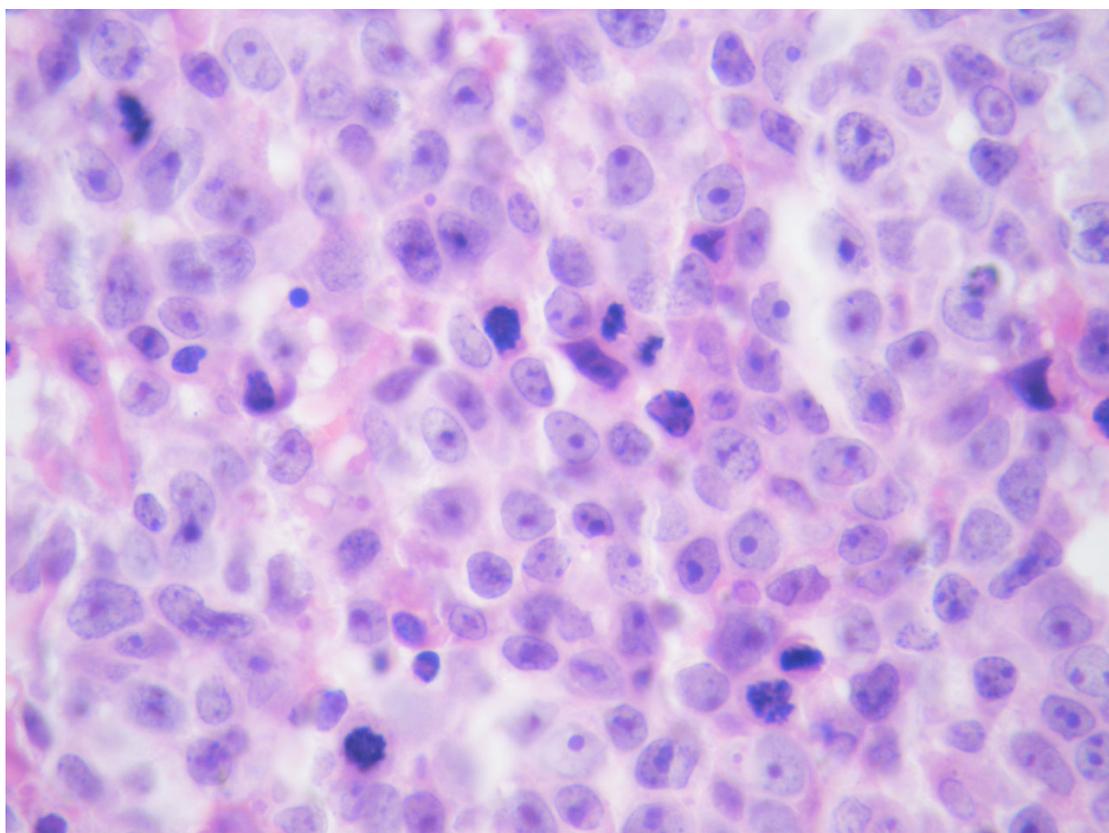
- Centrolástico: constitui o maior grupo dentro dos LDGCB. O núcleo medem de 10-14µm, de aspecto vesicular, cromatina fina com dois a quatro nucléolos (Figura 3). Pode conter uma quantidade variável de células com padrão imunoblástico de permeio. De fato, os núcleos podem ser monomórficos, polimórficos ou multilobulados.



Legenda: O núcleo apresenta volume de cerca de 3 vezes o linfócito normal, com cromatina hipodensa e três a quatro nucléolos pequenos, alguns adjacentes à membrana nuclear. Hematoxilina e eosina, 1000x.

Figura 3 – Fotomicrografia do linfoma difuso de grandes Células B centrolástico.

- **Imunoblástico:** corresponde a menos de 5% dos LDGCB. Como critério, mais de 90% das células tumorais exibem a morfologia imunoblástica, ou seja, núcleos grandes com nucléolo central único, além de citoplasma amplo e basofílico (Figura 4). Algumas células podem ter diferenciação plasmablástica. Algumas vezes a separação morfológica das variantes centroblástica ou imunoblástica é subjetiva.

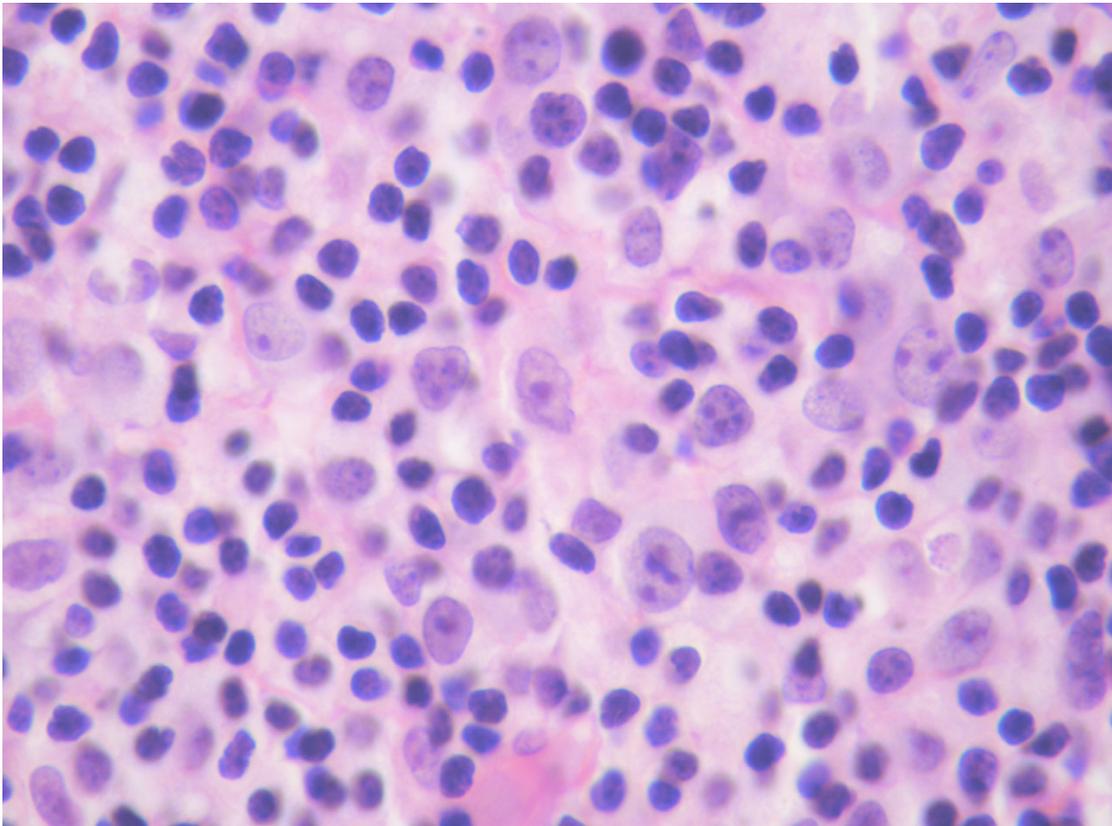


Legenda: O núcleo se caracteriza por um macronúcleolo eosinofílico único central. Hematoxilina e eosina, 1000x.

Figura 4 - Fotomicrografia do linfoma difuso de grandes células B Imunoblástico.

- **Rico em células T/histiócitos:** nesta variante as células neoplásicas dispõem-se difusamente e compõem menos de 10% das células.

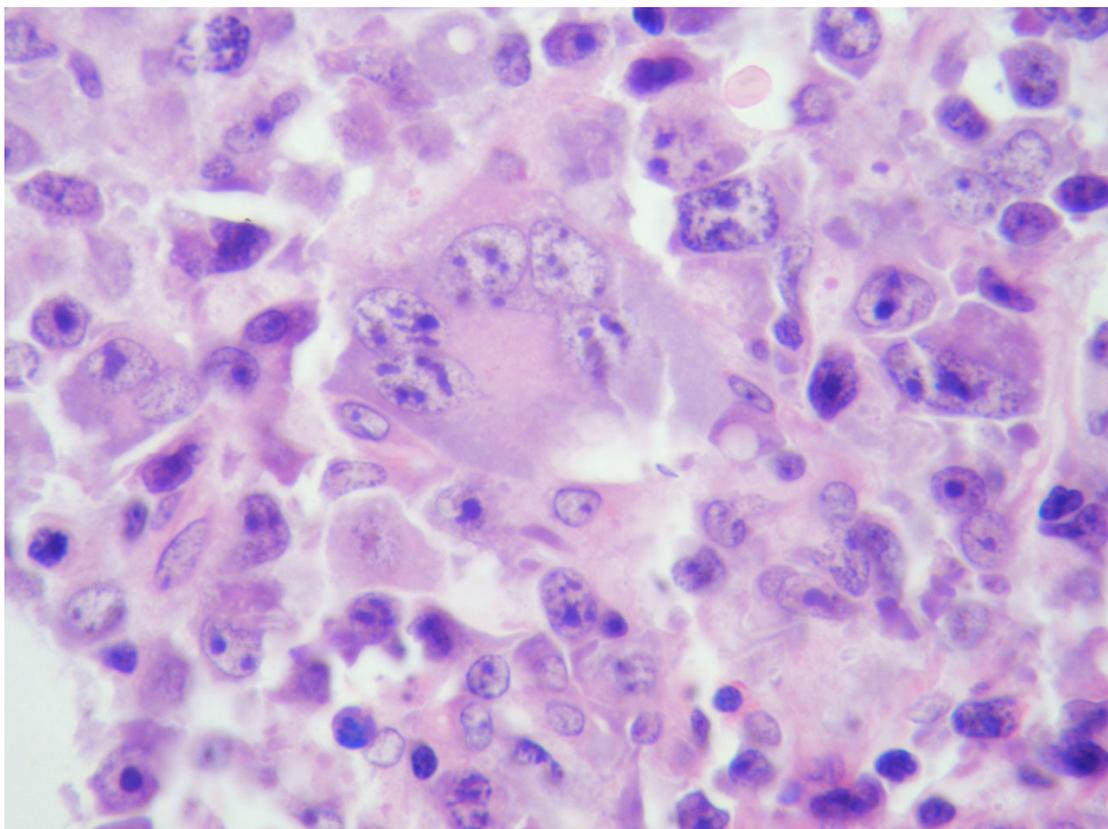
Mais de 90% de células são reativas de padrão linfóide ou histiocitóide (Figura 5). Estudos imunoistoquímicos revelaram que 80% destas células que circundam as células B neoplásicas exibem fenótipo de linfócitos T. A natureza neoplásica das células B foi confirmada pela demonstração da monoclonalidade das imunoglobulinas. Esta variante exibe semelhanças morfológicas importantes com o linfoma de Hodgkin que ao contrario apresenta-se clinicamente em estágios mais precoces.



Legenda: Os esparsos linfócitos neoplásicos com morfologia centroblastica ou imunoblástica estão permeados por numerosos linfócitos T ou histiócitos reacionais. Hematoxilina e eosina, 1000x.

Figura 5 – Fotomicrografia do linfoma difuso de grandes células B rico em células T e histiócitos.

- Anaplásico: células gigantes e bizarras com morfologia anaplásica. Consistentemente exibem positividade para o anticorpo anti-CD30 (Figura 6). Esta variante está incluída nos LDGCB e é considerada distinta dos linfomas anaplásicos de células T devido às particularidades clínico-patológicas e moleculares. Esta é a variante menos caracterizada devido a sua relativa raridade.



Legenda: Esta variante apresenta células com acentuado pleomorfismo nuclear, por vezes multinucleadas. Hematoxilina e eosina, 1000x.

Figura 6 – Fotomicrografia do linfoma Difuso de Grandes Células B anaplásico.

Estes padrões apresentam baixa reprodutibilidade e pouco significado clínico. Algumas diferenças podem ser observados em casos específicos e baseado em painéis imunoistoquímicos são reconhecidas duas outras variantes:

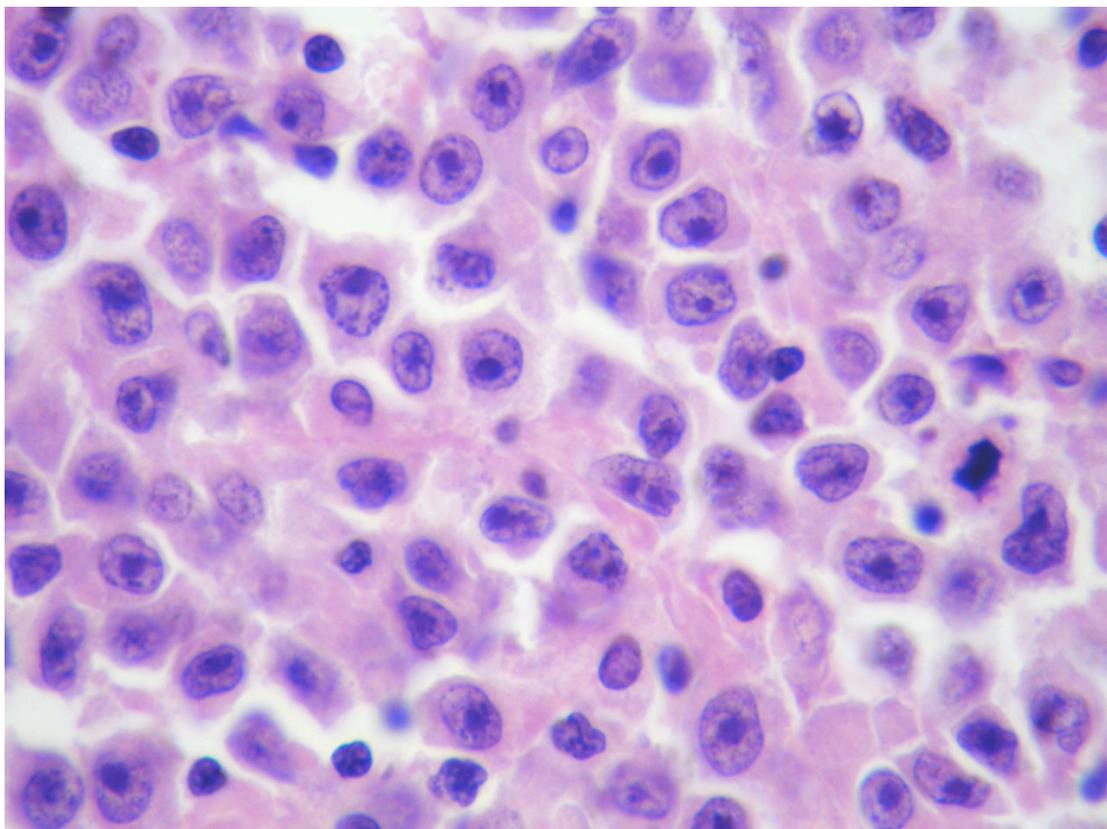
- Linfoma difuso de grandes células B com expressão de ALK.
- Variante Plasmablástica: variante rara (2-4%), usualmente diagnosticada em mucosas, (particularmente na mucosa oral) com extensão submucosa e ulceração. As células são monomórficas com padrão entre um imunoblasto e plasmablasto, isto é, núcleos volumosos e redondos com nucléolo evidente, de localização excêntrica em um citoplasma amplo e basofílico (Figura 7). Há associação marcada com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Frequentemente observamos a expressão para o anticorpo anti-CD138. Interessante é a consistente negatividade desta variante para os anticorpos anti-CD45 e anti-CD20.

Além de todas estas, há ainda na classificação da OMS três variantes clínicas:

- Primário mediastinal;
- Intravascular;
- Primário de derrames cavitários.

Com tantas categorias baseadas em critérios morfológicos, imunoistoquímicos e clínicos os LDGCB constituem um grupo muito heterogêneo biologicamente. O avanços recentes prometem diminuir esta

categoria LDGCB para a próxima atualização da classificação com a separação de algumas entidades, baseado nas diferenças moleculares. (PILERI et al. 2002; ROSENWALD et al. 2003; CALVO et al. 2004)



Legenda: As células exibem núcleos grandes com nucléolo evidente, com localização excêntrica no citoplasma basofílico. Hematoxilina e eosina, 1000x.

Figura 7 – Fotomicrografia do linfoma difuso de grandes células B plasmoblástico.

ASPECTOS MOLECULARES

As células de um clone maligno acumulam alterações genéticas que levam a expressões gênicas aberrantes e fenótipos alterados conferindo-lhes maior ou menor competitividade. As características relacionadas a

agressividade tumoral são a capacidade de proliferação contínua, resistência a apoptose, insensibilidade aos sinais de parada da proliferação e início da diferenciação, capacidade de invasão e promoção da angiogênese.

Baseado nos estudos de padrão de mutações somáticas com rearranjo das regiões variáveis dos genes da imunoglobulinas sabe-se que os LDGCB são derivados de células com prévia exposição a antígenos no centro germinativo dos linfonodos. Os principais mecanismos patogênicos já caracterizados nos LDGCB são:

1. Desregulação do gene *BCL6* (3q27) - o gene *BCL6* tem 26 kb, contém 10 exons e age como um fator regulador da transcrição de genes relacionados a proliferação e diferenciação. A expressão gênica constitutiva do *BCL6* está restrita os linfócitos B do centro germinativo (centroblastos e centrócitos). A ausência de transcrição do *BCL6* impede a formação de centros germinativos nos linfonodos estimulados, mas não diminui os linfócitos B ou T no sangue periférico. A expressão protéica *BCL6* está presente também nos linfomas, principalmente no linfoma de Burkitt, folicular e parte dos LDGCB, com padrão similar ao do centro germinativo. A desregulação da gene *BCL6* deve-se ao seguintes mecanismos moleculares:
 - a. Rearranjo - é um dos rearranjos mais freqüentes nos LDGCB (30-40%). A translocação mais comum é a t(3:14)(q27:q32), envolvendo usualmente o gene da Ig. Esta translocação resulta

na ativação continuada do gene *BCL6*, bloqueando a progressão da diferenciação, inibindo a apoptose e facilitando a proliferação pela modulação das proteínas p27, p53, ciclina D2. Entretanto, YANG et al. (2006) demonstraram que a translocação BCL6-Ig é um evento que ocorre em centro germinativos de indivíduos sadios e não é um evento suficiente para a transformação linfomatoso. A expressão protéica do BCL6 nos linfomas ocorre independente do rearranjo do gene. Inicialmente os estudos demonstraram que pacientes portadores de LDGCB com rearranjo do *BCL6* exibiam um prognóstico significativamente melhor para sobrevida global e sobrevida livre de doença, resultados que não foram confirmados por outros autores (OFFIT et al. 1994; PESCARMONA et al. 1997; KRAMER et al. 1998; BARRANS et al. 2002). Os estudos mais recentes que investigaram o BCL6 pela quantificação de cDNA mostram uma maior sobrevida para os pacientes tratados com esquema CHOP, com papel independente do IPI, tendo este gene sido incorporado nos modelos multigene preditores de sobrevida. (LOSSOS et al. 2001; WRIGHT et al. 2003). O papel como fator prognóstico da expressão protéica do BCL6 isoladamente também é controverso segundo os trabalhos mais recentes (COLOMO et al. 2003; HANS et al. 2004).

- b. Hipermutação - Durante o processo fisiológico de hipermutação somática na fase final de maturação das células no centro germinativo podem ocorrer mutações do gene *BCL6* e conseqüente desregulação. Esta desregulação embora aumente o nível de transcrição do gene *BCL6* parece não ser suficiente para a transformação linfomatoso (PASQUALUCCI et al. 1998; SHEN et al. 1998).
2. Desregulação do gene *BCL2* (18q21) – o gene *BCL2* tem funções anti-apotóticas, estando a proteína *BCL2* localizada na membrana interna mitocondrial. Fisiologicamente a expressão de *BCL2* existe nos estágios pré-centro germinativo e geralmente decresce enquanto o linfócito B migra pelo centro germinativo. Cerca de 47-58% dos LDGCB expressam *BCL2* (HILL et al. 1996; GASCOYNE et al. 1997) e a sua super-regulação deve-se a:
 - a. Rearranjo – inicialmente identificado nos linfomas foliculares e posteriormente em 20-30% dos LDGCB. A t(14:18) (q32;q21) coloca o gene *BCL2* justaposto ao gene da Ig, determinando a uma hiper-expressão do gene *BCL2* pela ativação constitutiva do gene da Ig (WEISS et al. 1987; JACOBSON et al. 1993). Esta hiper-expressão determina um viés anti-apoptótico no centro germinativo. A aquisição deste fenótipo está associado com a lenta progressão de uma hiperplasia linfóide para o LDGCB, geralmente com morfologia imunoblástica. Muitos destes LDGCB exibem também uma alteração secundária do

rearranjo do gene *MYC*, sugerindo que a sobrevida prolongada é oncogênica para os linfócitos. A translocação do *BCL2* por si só não se correlaciona com a sobrevida nos LDGCB. Entretanto a super-expressão protéica mostra, na maioria dos estudos, uma correlação com menor sobrevida global ou sobrevida livre de doença (HILL et al. 1996; KRAMER et al. 1996; GASCOYNE et al. 1997).

- b. Amplificação - até 80% dos LDGCB podem exibir hiper-expressão da proteína *bcl2* e estes índices não podem ser explicados apenas pela frequência da translocação. A amplificação foi demonstrada como um mecanismo alternativo e excludente de desregulação do gene *BCL2* (MONNI et al. 1997).
3. Rearranjo do gene *MYC* (8q24) - o gene *MYC* pode sofrer rearranjo para o *locus* do gene da IgH – t(8:14)(q24:q32) ou menos frequentemente para os *loci* do gene da IgL kappa ou lambda, t(8:2) ou t(8:22), respectivamente. Estas mutações estão consistentemente presentes nos linfomas de Burkitt e em 2-16% dos LDGCB, sendo especialmente freqüentes nos LDGCB gástricos (28%) com altos índices de remissão completa (KRAMER et al. 1998). A expressão do gene *MYC* expressa um fenótipo relacionado com a capacidade de proliferar ao invés de diferenciar no tecido linfóide.
4. Rearranjo do gene *NF-κB/REL* (10q24)– Este rearranjo está associado com a incapacidade de reprimir a transcrição e aquisição

de uma função de ativador constitucional da transcrição. NF- κ B está localizada no citoplasma sob a forma de dímeros protéicos na sua forma inativa, ligada a proteínas inibidoras (I κ B). Em resposta a sinalizações de diversas vias as I κ B são fosforiladas e degradadas, permitindo a migração das NF- κ B para o núcleo onde agem como ativadores da transcrição mediando a proliferação, apoptose e sobrevivência da célula (KARIN et al. 2002). Amplificações do gene *REL*, codificador de um das subunidades dos dímeros, ocorrem em cerca de 20% dos LDGCB, principalmente os de sítios extra-nodais (FEUERHAKE et al. 2005). Já foi descrito o papel da ativação constitutiva do NF- κ B na sobrevivência dos linfócitos nos LDGCB com perfil molecular do linfócito ativado (DAVIS et al. 2001). A relevância desta molécula e a pluralidade de funções tem elevado o *NF- κ B* a candidato a intervenção farmacológica específica (WIESTNER e STAUDT 2003).

5. Rearranjo do gene *MUM1* (IRF-4) (6p25) – O gene *MUM1* codifica um fator de transcrição membro da família dos fatores reguladores de interferon (IRF), com importante função na resposta a sinalizações por interferons e outras citocinas. Usualmente está expresso em linfócitos T ativados e linfócitos B pós-centro germinativo ou plasmócitos (FALINI et al. 2000). A translocação t(6:14) (p25;q24) coloca o gene *MUM1* justaposto com o gene da *IgH*, resultando na hiper-expressão da proteína MUM1. Em LDGCB a freqüência de expressão da proteína MUM1 pode chegar a 75% e, diferente dos

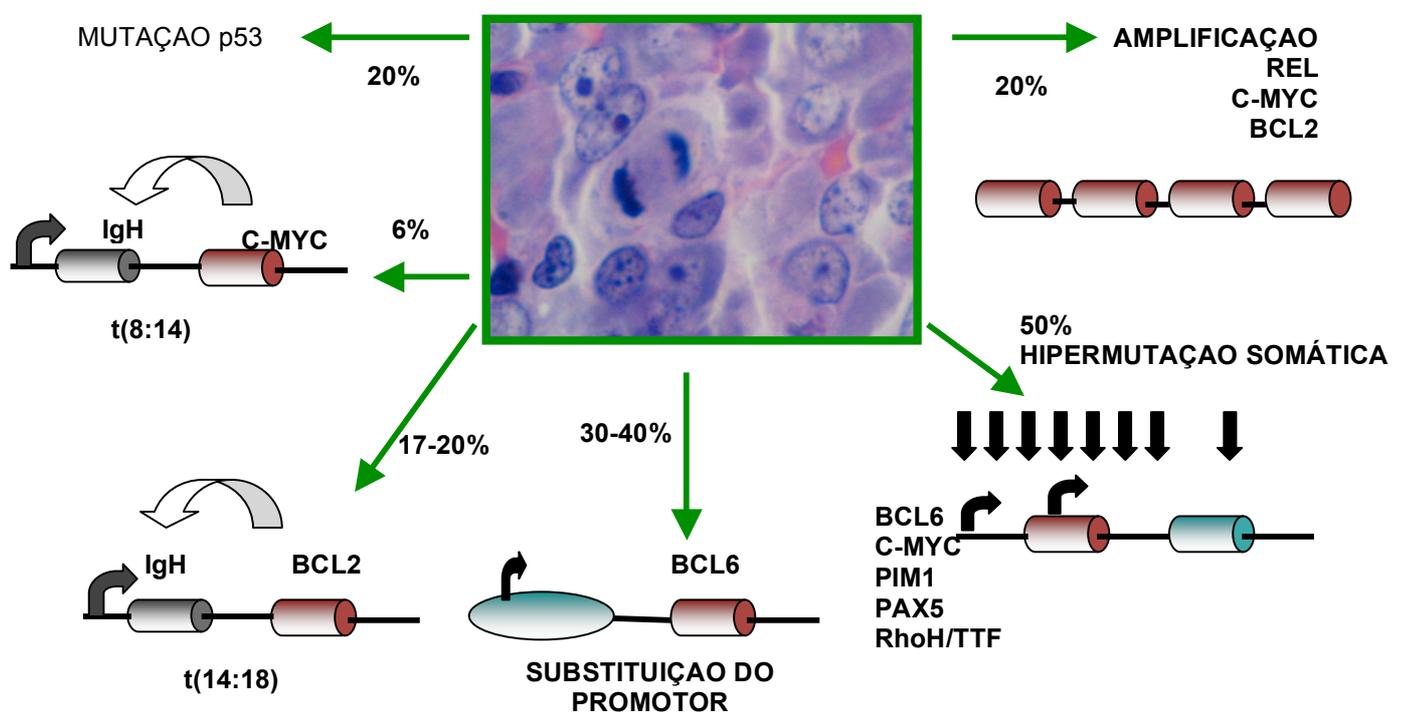
linfócitos normais onde a expressão de MUM1 e BCL6 são excludentes, cerca de 50% dos casos de LDGCB co-expressam MUM1 e BCL6 (FALINI et al. 2000). A expressão de MUM1 tem sido considerada na classificação molecular dos LDGCB como indicativo do perfil do linfócito B ativado (COLOMO et al. 2003; CHANG et al. 2004; HANS et al. 2004).

6. Mutação do gene *TP53* – o gene *TP53*   um regulador da transcri o multifuncional envolvido na diferencia o, na apoptose, na monitora o da integridade do genoma através do retardo da fase G1 do ciclo DNA alterado. A muta o do *TP53*, presente em cerca de 20% dos LDGCB, pode levar a sua inativa o e conseqüente acúmulo de altera es genéticas adicionais. Nos LDGCB a muta o do *TP53* parece ser mais freqüente nos casos de evolu o a partir de linfomas de baixo grau (SANDER et al. 1993; DU et al. 1995; MOLLER et al. 2002; SHAMINIE et al. 2005). A hiper-expressão da proteína p53 tem sido relacionada a agressividade biológica e resistência a quimioterapia nos LDGCB, com papel independente em várias series (FARRUGIA et al. 1994; PIRIS et al. 1994; ICHIKAWA et al. 1997; KODURU et al. 1997; WILSON et al. 1997; MOLLER et al. 1999; SANCHEZ-BEATO et al. 2001). Por todas estas evidências a muta o do TP53   considerada pela OMS um fator prognóstico adverso (GATTER e WARNKE 2001).
7. Inativa o da proteína p27/KIP1 – A p27   uma proteína quinase dependente de ciclina (CDK, do inglês *cyclin-dependent kinase*) e sua

inativação é essencial para a progressão do ciclo celular da fase G1 para fase S. Além disto, já foi demonstrada sua atividade na diferenciação, apoptose e resposta a quimioterapia (LLOYD et al. 1999). Usualmente células em proliferação não exibem expressão de p27. No entanto, há a expressão anômala de p27 existe em alguns linfomas de células do manto e LDGCB, caracterizados por alto índice proliferativo e evolução clínica desfavorável (QUINTANILLA-MARTINEZ et al. 1998; SAEZ et al. 1999). Este efeito parece estar associado a uma forte co-expressão da ciclina D3 (SANCHEZ-BEATO et al. 1999).

As principais alterações moleculares dos LDGCB estão resumidas na

Figura 8.



Fonte: Traduzido de LOSSOS (2005).

Figura 8 - Alterações moleculares mais frequentes nos Linfomas Difusos de Grandes Células B.

1.4 OS ESTUDOS DE EXPRESSÃO GÊNICA COM cDNA MICROARRAYS

Atualmente o tratamento dos LDGCB classicamente se inicia com quimioterapia multi-droga e anticorpos humanizados e nos casos de falência, os pacientes são candidatos ao transplante de medula óssea. O conhecimento do padrão de expressão gênica dos tumores, isolado ou associado ao IPI poderia selecionar os pacientes que seriam poupados dos efeitos colaterais de um tratamento quimioterápico ineficaz e que se beneficiariam de um transplante precoce de medula óssea.

A técnica de “*cDNA microarrays*” permite uma avaliação quantitativa comparativa da expressão de milhares de genes de um determinado tumor e um tecido de referência. Um projeto multicêntrico denominado *Leukemia/Lymphoma Molecular Profiling Project (LLMPP)* iniciou estudos que incluíam a quantificação da expressão de mais de 17.000 genes, incluindo genes seletivamente expressos em células linfóides e genes relacionados com importantes etapas da linfomagenese e imunologia. Este projeto identificou em 2000 a existência de dois subgrupos de LDGCB com expressão gênica indicativa de diferentes estágios de maturação dos linfócitos B (ALIZADEH et al. 2000).

Um grupo de tumores se caracterizou pela alta expressão relativa genes característicos das células B do centro germinativo (LDGCB célula B centro germinativo-símile; LDGCB-CG) e o outro grupo expressou genes normalmente expressos durante a ativação *in vitro* de linfócitos B periféricos (LDGCB célula B ativada-símile; LDGCB-A) Os pacientes portadores do

perfil LDGCB-CG tiveram uma sobrevida significativamente melhor do que os com perfil LDGCB-A (sobrevida em cinco anos de 76% comparada com 16%, respectivamente). Dentre os genes quantitativamente mais expressos nos LDGCB-CG estavam o CD10 e o BCL6, enquanto entre os genes quantitativamente mais expressos nos LDGCB-A estavam o MUM1 e o BCL2. Não foi observada nenhuma correlação com as variantes morfológicas do LDGCB. (ALIZADEH et al. 2000)

ROSENWALD et al. em 2003, em uma análise subsequente dos dados do LLMPP, identificaram os genes com maior relevância estatística e construíram um modelo matemático para prever a chance de cura após o tratamento quimioterápico padrão. Para além de confirmarem os achados de ALIZADEH et al. (2000) com um papel independente e complementar ao IPI, outras informações moleculares foram extraídas como a existência de um perfil “proliferativo” que melhor identifica os pacientes com evolução desfavorável. Os perfis “MHC classe II” relacionados a antigenicidade e “linfonodo” relacionados a genes codificadores de proteínas da matriz extracelular e fatores de crescimento do tecido conjuntivo estiveram associados a um melhor prognóstico. O grupo com perfil LDGCB-CG exibiu baixa atividade do NF- κ B, enquanto o grupo LDGCB-A exibiu alta expressão deste gene, indicando uma possível relação com a interferência no mecanismo de apoptose relacionada com a quimioterapia.

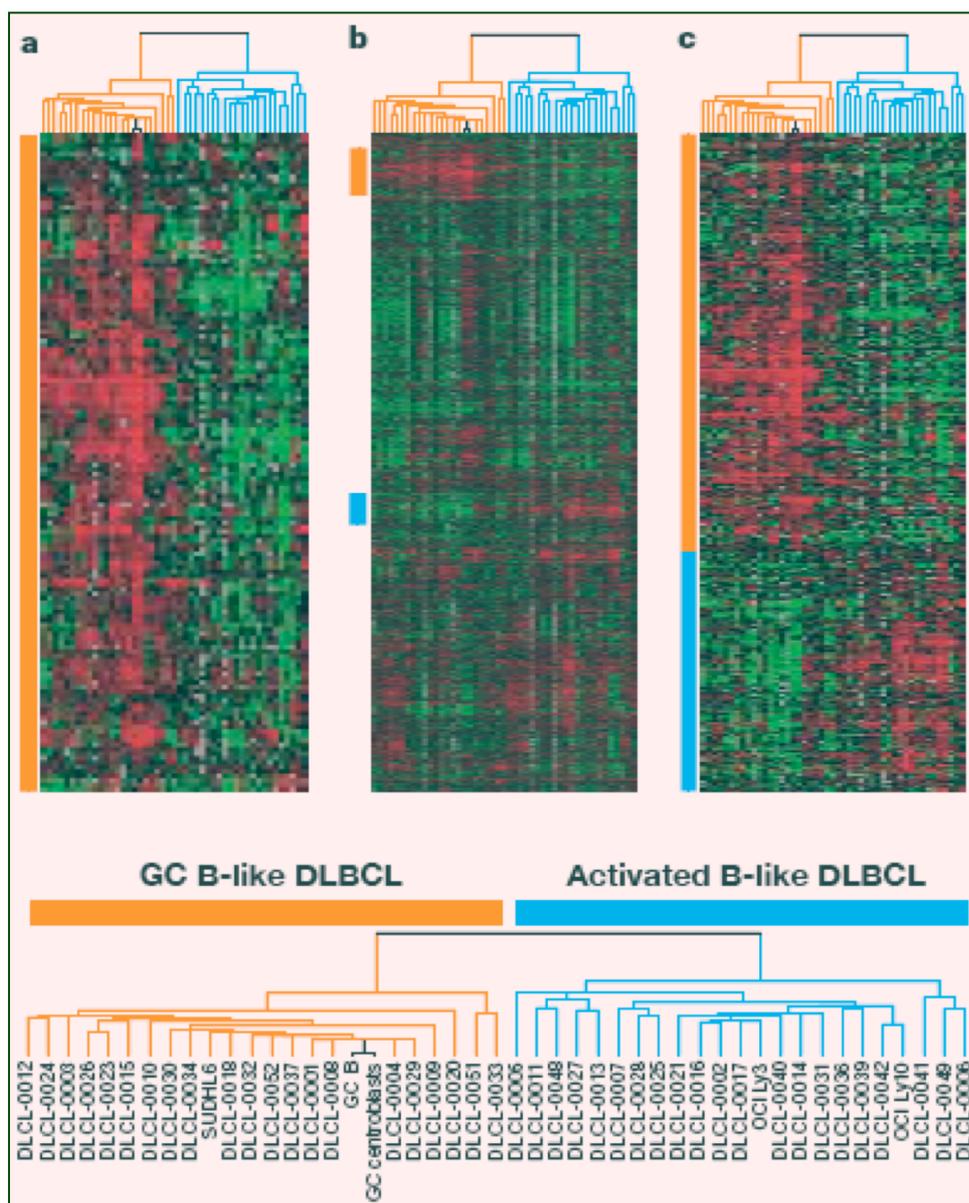
Corroborando a hipótese de que os LDGCB-CG e LDGCB-A apresentam patogênese distintas, foram descritas outras diferenças na expressão de moléculas relacionadas a apoptose (BAD, BID, BAX, BCLX, BCL2), ciclo

celular (ciclina D2) ou a expressão de fatores de transcrição (STAT6) em resposta a estímulo com interleucina (IL-4) (BAI et al. 2004; HANS et al. 2004; IQBAL et al. 2004; LU et al. 2005). As principais diferenças entre os LDGCB-CG e o LDGCB-A estão resumidas na Tabela 3.

Tabela 2 - Principais diferenças descritas entre os Linfomas difusos de grandes células B com perfil do linfócito B do centro germinativo daqueles com perfil semelhante ao linfócito B ativado.

	LDGCB COM PERFIL “CENTRO GERMINATIVO-SIMILE”	LDGCB COM PERFIL “LINFÓCITO ATIVADO- SIMILE”
Célula de origem	Linfócito do centro germinativo	Linfócito pós-centro germinativo (?)
Mutação da Ig “on-going mutation”	Sim	Não
Mecanismo Oncogênico	Translocação do gene BCL2 Amplificação do cREL (2p)	Ativação constitutiva do NF-kappaB
Sinalização intracelular	<ul style="list-style-type: none"> • AMPc modula AKT e pBAD • IL4 induzindo: aumento de STAT6 fosforilada no núcleo Proliferação	<ul style="list-style-type: none"> • PDE4B inativa AMPc • IL4 induzindo baixos níveis de acúmulo nuclear do STAT6 ativação do AKT parada do ciclo celular G0G1
Evolução clínica	Favorável Sobrevida 5 anos - 60%	Desfavorável Sobrevida 5 anos – 35%

Fonte: Traduzido de LOSSOS (2005)



Fonte: ALIZADEH et al. (2000).

Legenda: A: As amostras usadas estão descritas na parte inferior. Agrupamento hierárquico dos LDGCB (azul e laranja) e dos linfócitos B do centro germinativo baseado no perfil de expressão gênica dos linfócitos B. Dois subgrupos de LDGCB, centro-germinativo-símile (LDGCB-CG; laranja) e linfócito B ativado-símile (LDGCB-A; azul) foram definidos neste processo. B: Descoberta dos genes que estão seletivamente expressos nos LDGCB-CG e LDGCB-A. Os genes seletivamente expressos em cada subtipo estão indicados pelas barras laranja e azul. C: Detalhe dos genes que estão seletivamente expressos nos LDGCB-CG e LDGCB-A.

Figura 9 - Descoberta dos subtipos de LDGCB pelo perfil molecular.

Desde então outros grupos fizeram descobertas interessantes aplicando a mesma tecnologia, que incluem diferentes conjuntos de genes capazes de classificar os LDGCB em subgrupos com relevância clínica (NISHIU et al. 2002; SHIPP et al. 2002; LOSSOS et al. 2004; MIRCEAN et al. 2004; MONTE et al. 2005; TOME et al. 2005).

Foram gerados a partir destes estudos vários perfis moleculares baseado nas suas funções dos genes, denominados “resposta imune do hospedeiro”, “fosforilação oxidativa”, “receptor de células B/proliferação” e “apoptose”, “ciclo celular”, “transdução do sinal e metabolismo” e “redox”.

LOSSOS et al. (2004), na tentativa de solucionar as dúvidas até aqui apresentadas, estudaram os 36 genes mais importantes citados nos trabalhos de ALIZADEH et al. (2000) e SHIPP et al. (2002) a fim de construir um modelo preditivo simples capaz de identificar os subgrupos de pacientes com LDGCB. Os seis genes com melhor poder estatístico na análise univariada foram selecionados para um modelo multivariado que resultou num modelo preditor simples considerando contribuição relativa de cada gene. Os genes selecionados foram: LMO2, BCL6, FN1 (preditores de sobrevida longa), CCND2, SCYA3 e BCL2 (preditores de sobrevida curta). Estes genes estão relacionados com múltiplas funções celulares como o ciclo celular, a diferenciação e a apoptose. Tanto a sobrevida em 5 anos (65% para o grupo de baixo risco e 15% para o grupo de alto risco) como a sobrevida mediana (8,7 e 3,8 anos, respectivamente) foram significativamente diferentes, com um papel independente e complementar ao IPI (LOSSOS et al. 2004).

De forma resumida, LOSSOS e MORGENSZTERN em um artigo publicado em fevereiro de 2006 no Journal of Clinical Oncology listaram os marcadores moleculares mais citados nos artigos científicos com casuísticas acima de 40 pacientes que estudaram LDGCB nodais (Quadro 2).

Quadro 2 - Fatores moleculares prognósticos do LDGCB.

<p>Ciclo Celular p53 Ciclina D p27 Ki-67</p> <p>Apoptose BCL2 Caspases 3,8,9 Survivina</p> <p>Moléculas de adesão ICAM1 (CD54) CD44</p> <p>Angiogênese Esdostatina VEGF Metaloproteinase 9</p>	<p>Diferenciação do Linfócito B BCL6 HGAL CD10 CD5 FOXP1 PKC-beta CD21</p> <p>Outros Mm23H1 IL10 HLA`s</p> <p>Perfis Moleculares</p>
--	---

Fonte: LOSSOS e MORGENSZTERN 2006.

O padrão de expressão gênica dos tumores se apresenta como um novo caminho para o futuro das rotinas diagnóstica e terapêutica em oncologia. Embora esta análise seja capaz de identificar subgrupos nos LDGCB, não está claro ainda o melhor critério: ontogênese do linfócito B, ciclo celular, apoptose, metabolismo e fosforilação oxidativa ou resposta imune do hospedeiro.

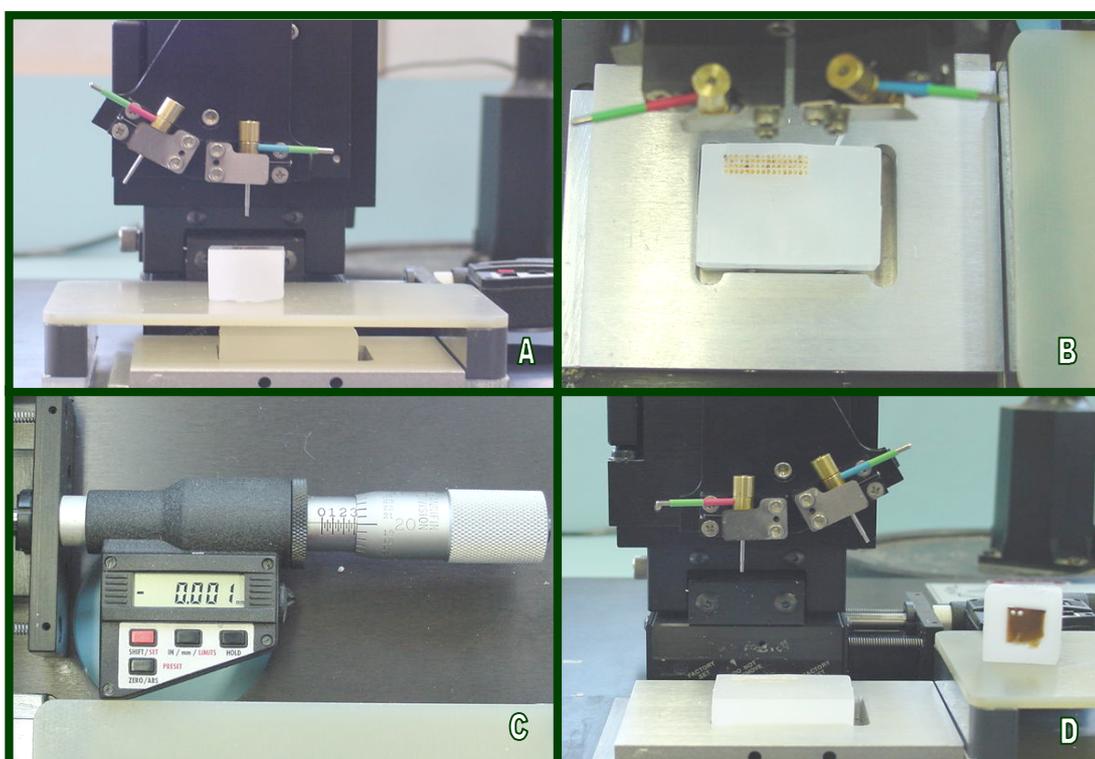
1.5 ESTUDOS DE TISSUE MICROARRAYS

Embora os estudos de cDNA tenham identificado perfis de expressão protéica de LDGCB biologicamente distintos, estes perfis são baseados em dezenas de genes e os métodos analíticos usados nestes estudos não são capazes de atribuir pesos relativos a esta expressão gênica.

Assim, pelos estudos de cDNA microarrays seria difícil estabelecer um pequeno e seletivo número de genes que seriam facilmente aplicáveis na rotina. Além disto, os estudos com expressão de RNAm, que têm a vantagem da análise quantitativa dos genes, necessitam de tecidos frescos ou congelados, o que limita a aplicação desta metodologia na rotina. Em contraste, a imunohistoquímica aplicada em blocos de parafina fornece apenas uma avaliação semi-quantitativa da expressão protéica mas é amplamente usada na rotina.

Tentando tornar o conhecimento da classificação ontogenética do LDGCB aplicável na rotina diagnóstica alguns autores demonstraram ser possível a identificação dos LDGCB-CG e LDGCB-A através da imunohistoquímica, embora em alguns estudos não tenha sido identificada diferença estatística significativa na sobrevivência dos pacientes (COLOMO et al. 2003; BAI et al. 2004; CHANG et al. 2004; HANS et al. 2004). O método imunohistoquímico também foi utilizado com sucesso por alguns autores para confirmação dos perfis alternativos na identificação de subgrupos com evolução clínica diferente (SHIPP et al. 2002; COLOMO et al. 2003; SAEZ et al. 2004; MONTI et al. 2005; TOME et al. 2005).

A técnica de *Tissue Microarray (TMA)*, descrita por KONONEN et al. em 1998, permite a análise em larga escala da expressão protéica dos tumores através da imunohistoquímica, sendo possível conhecer a expressão de uma determinada proteína em centenas de casos diferentes em apenas uma lâmina histológica. Para isto, um equipamento de precisão automático ou manual insere amostras teciduais de vários blocos doadores em um bloco receptor.



Legenda: A: Vista frontal com detalhe das agulhas. O bloco doador é posicionado acima da placa acrílica. Após a extração do cilindro tecidual a retirada da placa acrílica expõe o bloco receptor. B: Vista superior do bloco receptor com cilindros de 1.0mm distantes 0.2mm cada. C: Vista superior, eixo digital que permite o deslocamento preciso do bloco receptor nos eixos horizontal e vertical. D: Vista frontal. A direita está o bloco doador do primeiro cilindro, usualmente um órgão diferente dos demais para orientar o ponto de início do bloco.

Figura 10 - Equipamento manual para construção dos Tissue Microarrays.

Esta técnica apresenta acuidade comprovada que justifica seu emprego com amplas vantagens de custo e tempo para os estudos

retrospectivos de grandes centros ou estudos cooperativos com grandes bancos de dados (HOOS e CORDON-CARDO 2001; SAUTER e MIRLACHER 2002).

Enquanto a técnica de cDNA Microarrays avalia a expressão de milhares de seqüências de RNA para determinar quais as dezenas ou centenas de genes estão hiperexpressos ou hipoexpressos em tumores com diferentes comportamentos biológicos, a técnica de TMA estuda ao nível protéico a expressão dos genes selecionados pelo cDNA microarray em grandes estudos retrospectivos, tentando identificar aqueles com aplicação prática e que portanto seriam alvos de novas estratégias terapêuticas.

O TMA não é um método livre de dificuldades mas seu uso tem sido defendido em relação aos cortes convencionais pelas seguintes razões:

Representatividade eficiente através da utilização de diversos blocos e com lâminas de diferentes níveis de corte;

1. Possibilidade de repetição dos experimentos;
2. Estudo de grande número de amostras;
3. Grande economia de tempo e dinheiro;
4. Homogeneidade nos protocolos laboratoriais pela realização de todas as reações simultaneamente;

1.6 JUSTIFICATIVA

Pelo exposto, julgamos relevante o estudo dos LDGCB para melhor caracterização das suas principais alterações moleculares e identificação dos subtipos que possam estar contidos nestas categoria, visando individualizar o tratamento e seguimento dos pacientes. O método escolhido para tal, baseado na disponibilidade e praticidade, é a imunoistoquímica aplicada a blocos de TMA para permitir a análise em larga escala.

2 OBJETIVOS

Nossos objetivos nesta pesquisa foram:

- Construir um TMA dos LDGCB do Hospital do Câncer de São Paulo, incluindo os tumores diagnosticados de 1980 a 2001 que será útil a mais de um projeto;
- Conhecer os padrões de expressão protéica através de TMA dos LDGCB do Hospital do Câncer de São Paulo, incluindo os tumores diagnosticados de 1980 a 2001, com ênfase nos marcadores moleculares relacionados apoptose, ciclo celular, diferenciação linfóide e de resposta a citocinas/metabolismo oxidativo.
- Avaliar a relevância clínica da classificação molecular proposta, baseada na diferenciação do linfócito (CD10/BCL6/MUM1) como fator prognóstico/preditivo nos LDGCB;
- Identificar que marcadores ou grupo de marcadores imunohistoquímicos poderiam ser utilizados na rotina propedêutica dos pacientes para avaliação prognóstica.

3 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COORTE RETROSPECTIVA

Analizamos uma coorte retrospectiva de linfomas difusos de grandes células B obtida a partir dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer AC Camargo diagnosticados entre 1980 a 2001. O critério de busca dos casos no banco de dados foi baseado na topografia “linfonodo” e diagnóstico “linfoma”, com obtenção de 1453 biópsias identificadas. Ao longo dos 21 anos muitas foram as classificações utilizadas pelos diversos patologistas do serviço e a imunistoquímica não era uma ferramenta disponível. Foi realizada uma leitura de cada laudo anatomopatológico para identificação dos casos que continham diagnóstico que sugeria a possibilidade de Linfoma não-Hodgkin difuso com células grandes segundo a OMS 2001. Destes, os casos que apresentavam lâmina(s) e bloco(s) disponíveis foram revistos, independentemente do hospital de origem. Todas as lâminas disponíveis em cada caso, incluindo as colorações Hematoxilina e eosina e Giemsa foram revistas por dois examinadores (VPA e FAS) para seleção dos casos que poderiam corresponder a LDGCB pela classificação da OMS 2001. Os dados foram anotados em protocolo específico (Figura 11). As lâminas de marcadores imunistoquímicos arquivadas ou preparadas na fase de seleção dos casos foram examinadas somente em casos específicos para se afastar a

possibilidade de Linfoma de Hodgkin ou outras neoplasias hematopoéticas. Por motivo de custos o estudo do painel imunoistoquímico dos casos foi realizado nas lâminas do TMA e não nos cortes convencionais.

PROTOCOLO DE PESQUISA											
Estudo de Fatores Moleculares Prognósticos e Preditivos do Linfoma Não-Hodgkin de Grandes Células B através de "Tissue Microarrays".											
Doutorando: Victor Piana de Andrade											
Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares											
Registro da Pesquisa:						Registro AC Camargo:					
Registro Patologia:						Data do nascimento					
Diagnóstico:						Topografia:					
REVISÃO DE LÂMINAS – HeE e Imunoistoquímica											
Dimensão linfonodo: x mm						Arquitetura geral <input type="checkbox"/>					
Cápsula <input type="checkbox"/>		Seio subcapsular <input type="checkbox"/>				Seios Medulares <input type="checkbox"/>					
Folículos <input type="checkbox"/>		Manto <input type="checkbox"/>				Medular <input type="checkbox"/>					
Marginal <input type="checkbox"/>		Interfolicular <input type="checkbox"/>									
HEMATOXILINA e EOSINA / GIEMSA											
Padrão mesoscópico <input type="checkbox"/>						Categoria Diagnóstica <input type="checkbox"/>					
Classificação HeE											
Tamanho da célula neoplásica <input type="checkbox"/>											
Morfologia celular predominante HeE <input type="checkbox"/>											
Classificação do Linfoma (REAL/WHO) <input type="checkbox"/>											
Variante Morfológica do Linfoma Não-Hodgkin de Grandes Células B <input type="checkbox"/>											
IMUNOISTOQUÍMICA											
CD3	<input type="checkbox"/>	CD10	<input type="checkbox"/>	CD23	<input type="checkbox"/>	CD56	<input type="checkbox"/>	TIA-1	<input type="checkbox"/>	VS38C	<input type="checkbox"/>
CD4	<input type="checkbox"/>	CD3	<input type="checkbox"/>	CD25	<input type="checkbox"/>	CD79a	<input type="checkbox"/>	EMA	<input type="checkbox"/>	Ciclina D1	<input type="checkbox"/>
CD5	<input type="checkbox"/>	CD20	<input type="checkbox"/>	CD30	<input type="checkbox"/>	CD138	<input type="checkbox"/>	Ki-67	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
CD7	<input type="checkbox"/>	CD21	<input type="checkbox"/>	CD43	<input type="checkbox"/>	EBV(LMP1)	<input type="checkbox"/>	Bcl-2	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
CD8	<input type="checkbox"/>	CD22	<input type="checkbox"/>	CD45RA	<input type="checkbox"/>	Fascina	<input type="checkbox"/>	Bcl-6	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
Diagnóstico final (REAL/WHO):											

Figura 11 - Protocolo de anotação dos dados morfológicos e imunoistoquímicos obtidos após a revisão das lâminas arquivadas dos casos cujo relatório anatomopatológico sugeria a possibilidade de linfoma difuso de grandes células.

Os critérios de inclusão dos casos no bloco de TMA foram:

- Diagnóstico de linfoma não-Hodgkin difuso de grandes células primário do linfonodo pelos dois examinadores;
- Disponibilidade do bloco de parafina com suficiente quantidade de material para a obtenção do cilindro necessário à construção do TMA.

3.2 CONSTRUÇÃO DO ARRANJO TECIDUAL EM MATRIZ

Nas lâminas revistas foram selecionadas áreas representativas da neoplasia para direcionar a obtenção dos cilindros utilizados na montagem do TMA. A planilha com a ordenação dos casos contidos nos blocos receptores está na Figura 12. Com o equipamento de precisão foram retirados dois cilindros com 1,0 mm de diâmetro em cada bloco doador para a construção de dois blocos receptores, Bloco A e Bloco B, cada um deles contendo um cilindro de cada biopsia dispostos na mesma ordem (Figura 13).

Os cortes histológicos foram obtidas com 4 micrômetros de espessura em lâminas especiais com carga elétrica (Instrumedics Inc.) com o auxílio de fitas adesivas sensíveis a luz ultravioleta para evitar a perda da orientação das amostras (Figura 14). Do bloco A foram obtidas 172 lâminas e do bloco B 100 lâminas. As lâminas do bloco A foram utilizadas para as reações imunohistoquímicas previstas e as lâminas do Bloco B foram utilizadas em parte para a repetição das reações que se fizeram necessárias ou novos anticorpos incluídos posteriormente e o excedente permanece conservado a

-20°C para preservação da reatividade antigênica. Como parte da consistência dos dados, avaliamos os diferentes níveis 01, 30, 60, 90, 100, 120 e 150 corados pela hematoxilina e eosina quanto a presença de representação do material, e a presença do linfoma com células grandes (Anexo 3). Os níveis utilizados para cada anticorpo em cada bloco de TMA estão listados nos Anexo 4 e Anexo 5.

		Amostras de 1.0 mm equidistantes 0,2 mm																
mm		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	mm
		0	1.2	2.4	3.6	4.8	6	7.2	8.4	9.6	10.8	12	13.2	14.4	15.6	16.8	18	
0	0	Liver Core	156507	157313	157935	158025	159685	159701	160678	163864	164843	165133	165261	165395	166196	166243	166315	0
1	1.2	167437	168117	168314	168585	170074	170196	173905	174047	175421	175491	176004	176364	176786	178871	178979	179204	1.2
2	2.4	180859	181442	181942	182594	183536	184047	185008	185114	186578	187403	187692	189935	190467	190566	192228	192778	2.4
3	3.6	193016	194975	195385	196453	201161	202271	202406	203135	204036	205195	208152	209467	209688	210346	212885	216766	3.6
4	4.8	218755	221442	223675	223712	224938	228632	229729	229737	234707	234965	235247	236095	237667	238074	238276	241127	4.8
5	6	241549	248824	248834	249761	249795	251820	253201	244430	254844	255745	256102	256718	256851	257368	258330	258565	6.0
6	7.2	260392	261774	263073	263240	264190	264344	264887	266549	266604	267260	268341	268362	270833	271024	271442	272710	7.2
7	8.4	273068	275817	277252	277729	278383	278505	278901	279965	280128	281564	282009	282505	283022	283121	283140	283215	8.4
8	9.6	283937	284167	284231	284301	284316	284464	284863	287625	287641	289271	289715	290721	291894	292283	292426	297208	9.6
9	10.8	297879	298102	300744	301332	301811	302216	302506	302754	303692	305238	305895	305905	307563	308149	308245	308772	10.8
10	12	309269	309975	310086	311322	314433	315987	317129	317812	318105	319236	319401	320375	321718	321762	322259	322305	12
11	13.2	323103	324243	325881	326457	327271	327683	329535	330573	330755	333164	334169	334188	335345	335772	335960	336066	13.2
12	14.4	336316	336359	336898	337218	337695	338021	339876	340366	340668	341016	341174	341419	97-0809	97-0849	97-1120	97-1701	14.4
13	15.6	97-2173	97-2202	97-2414	97-3826	97-4506	97-4670	97-5488	97-6242	97-6597	97-6658	97-6790	97-7536	97-7538	98-0218	98-0547	98-1341	15.6
14	16.8	98-2496	98-3746	98-3769	98-5570	98-5890	98-5940	98-7862	98-9196	98-9748	99-1333	99-1525	99-1765	99-2006	99-2561	99-2578	99-2827	16.8
15	18	99-3034	99-3183	99-3364	99-3441	99-4680	99-5615	99-6390	99-6660	99-7562	99-7653	00-0342	00-0484	00-0673	00-0929	00-0937	00-1136	18
16	19.2	00-1411	00-1723	00-3767	00-3785	00-4007	00-4130	00-4389	00-4732	00-4738	00-4788	00-6164	00-6288	00-6464	00-6492	00-6805	00-6895	19.2
17	20.4	00-6897	00-9206	00-9639	00-10180	0-10822	01 0517	01 1775	01 1988	01 2741	01 2743	01 3163	01 3282	01 5139	01 5278	01 5330	01 5538	20.4
18	21.6	01 6304	01 8038	01 8105	01 9116	01 9527	01 10911	01 11259	01 11801	01 11830	321756							21.6
mm		0	1.2	2.4	3.6	4.8	6	7.2	8.4	9.6	10.8	12	13.2	14.4	15.6	16.8	18	mm

Figura 12 - Planilha de ordenação dos casos no Tissue Microarray. O primeiro cilindro representa parênquima hepático para facilitar a orientação.

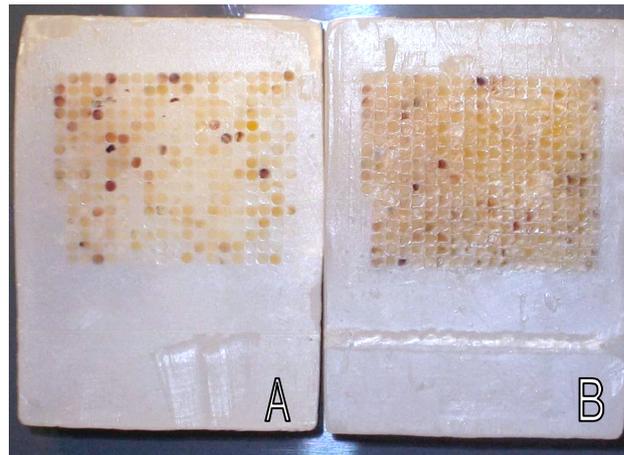


Figura 13 – Blocos de TMA construídos a partir de 297 biópsias de linfomas de grandes células. Cada bloco contém um cilindro de 1mm de diâmetro distando 0,2mm entre si. O bloco B é uma duplicata do bloco A, contendo um cilindro de cada biópsia.

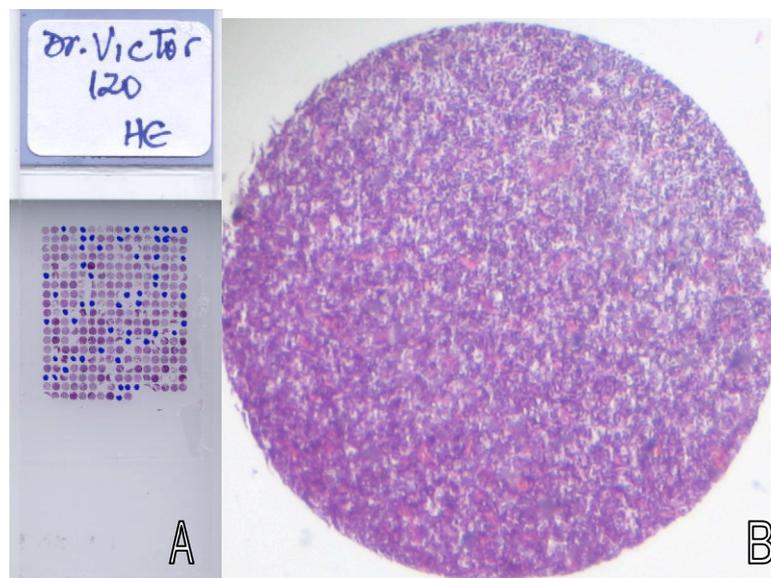


Figura 14 - A: Lamina representativa do Bloco A (nível 120), corada pela Hematoxilina e eosina. Os pontos azuis representam os casos que não aderiram à lâmina. B: Detalhe de um caso.

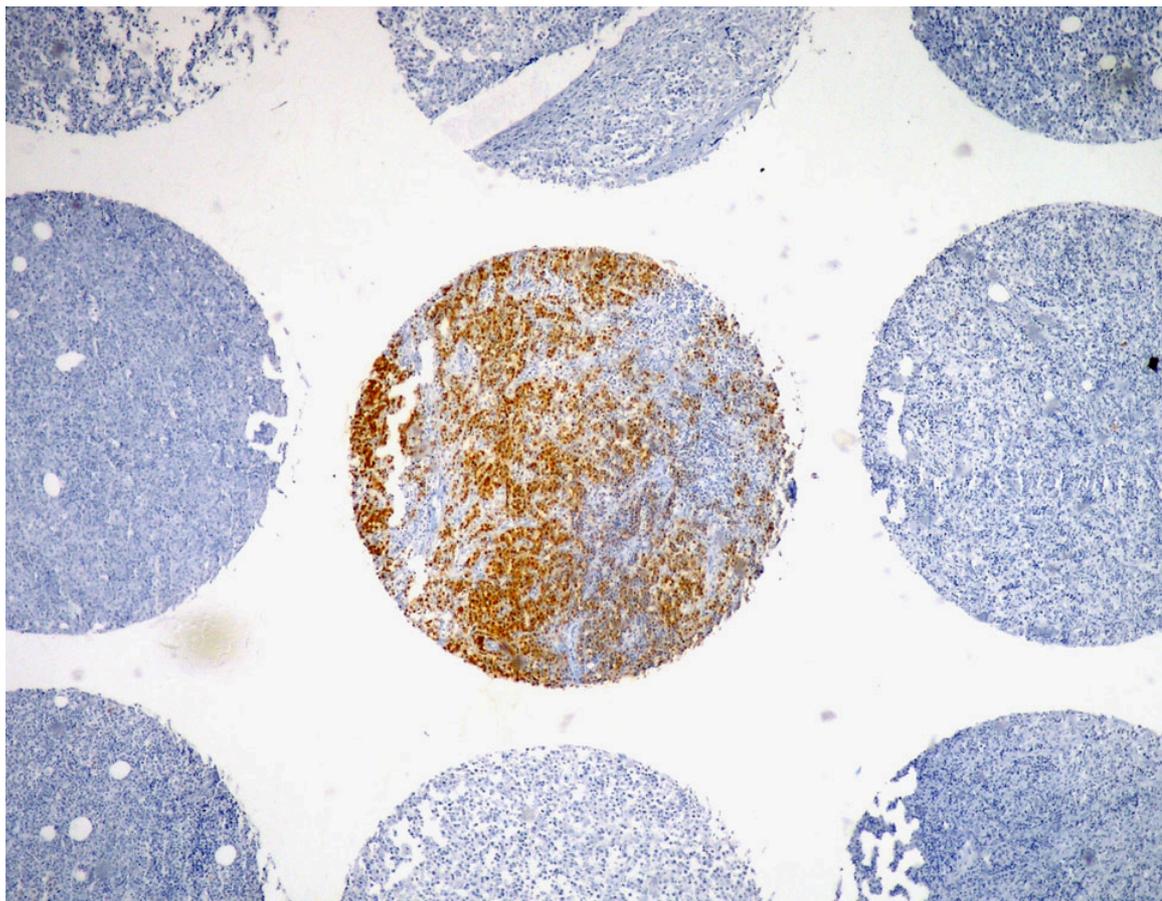


Figura 15 – Reação imunoistoquímica demonstrando a especificidade da marcação. p16; 25x.

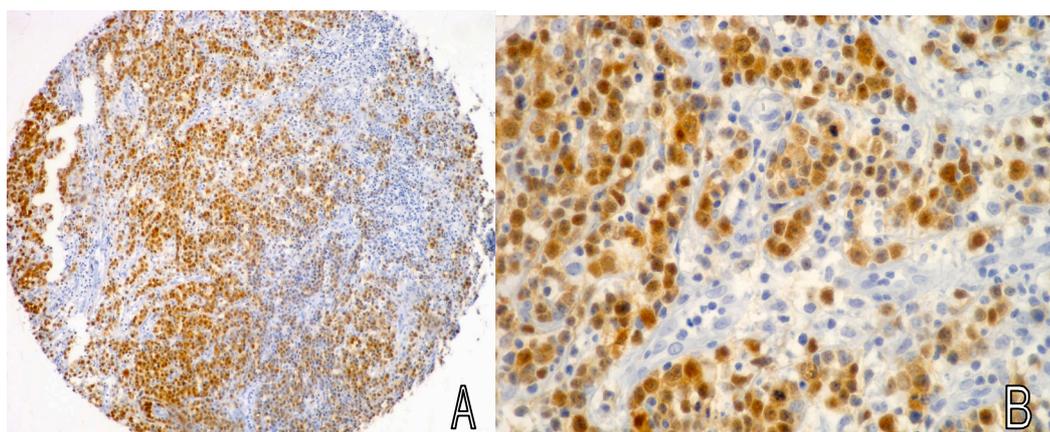


Figura 16 – Detalhe do LDGCB corado pelo método imunoistoquímico. A: Anticorpo p16;100x. B: Anticorpo p16;400x.

3.3 MARCADORES MOLECULARES - IMUNOISTOQUÍMICA

Foram avaliadas as proteínas associadas a apoptose, ao ciclo celular, marcadores linfóides e resposta a citocinas/metabolismo oxidativo. As características de cada anticorpo e o protocolo das reações estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3 - Anticorpos e respectivos protocolos utilizados nas reações imunistoquímicas.

DIFERENCIAÇÃO LINFÓIDE								
Anticorpo	Clone	Fabricante	Código	Título	Reat	Sol	pH	Amplificação
CD5	4C7	Novocastra	NCL-CD5-4C7	50	pp	E	8	SABC HRP
CD10	56C6	Novocastra	NCL-CD10-270	100	pp	C	6	SABC HRP
CD20	L26	Dako	M0755	400	pp	C	6	SABC HRP
CD23	1B12	Novocastra	NCLCD231B12	80	pp	C	6	SABC HRP
CD30	Ber-H2	Dako	M0751	50	pp	C	6	SABC HRP
CD44v6	VFF-7	Novocastra	NCL-CD44V6	100	pp	C	6	SABC HRP
CD79a	HM57	Dako	M7051	200	mw	AC	6	SABC HRP
CD138	MI15	Dako	M7228	200	bm	T/E	9	LSAB HRP
BCL-6	PG-B6p	Dako	M7211	50	pp	E	8	SABC HRP
HLA-DR	LN-3	Novocastra	NCL-LN3	60	pp		6	ABC HRP
MUM-1	MUM1p	Dako	M7259	100	pp	E	9	SABC HRP
BOB-1 (C20)	poli	St Cruz	sc955	400	pp	C	6	SABC HRP
OCT-2 (C20)	poli	St Cruz	sc233	3000	pp	C	6	SABC HRP
CICLO CELULAR								
Anticorpo	Clone	Fabricante	Código	Título	Reat	Sol	pH	Amplificação
p73	poli	St Cruz	sc7957	200	pp	C	6	SABC HRP
p21 waf1	SX118	Dako	M7202	25	pp	C	6	SABC HRP
p27kip1	SX53G8	Dako	M7203	200	pp	C	6	SABC HRP
p16 ink4a	E6H4	MTM Lab	OA315	25	pp	kit		SABC HRP
ki-67	MIB-1	Dako	M7240	50	pp	C	6	SABC HRP
pRb	RB1	Dako	M7131	50	pp	C	6	SABC HRP
Ciclina A	poli	St Cruz	sc751	100	bm	T/E	9	SABC HRP
Ciclina B1	V152	Dako	M3530	1500	bm	T/E	9	SABC HRP
Ciclina D1	DSC6	J Bartek		300	pp	C	6	SABC HRP
Ciclina E	poli	St Cruz	sc481	50	pp	E	8	SABC HRP
Ciclina G1	poli	St Cruz	sc7865	100	pp	E	8	SABC HRP
p53	DO-7	Dako	M7001	100	pp	C	6	SABC HRP

Cont/ Tabela 3

APOPTOSE								
Anticorpo	Clone	Fabricante	Código	Título	Reat	Sol	pH	Amplificação
bcl-2	124	Dako	M887	40	pp	C	6	SABC HRP
bax	poli	Dako	A3533	50	pp	C	6	SABC HRP
bak	poli	Dako	A3538	400	pp	C	6	SABC HRP
bcl-x	poli	Dako	A3535	50	pp	C	6	SABC HRP
FAS (C20)	poli	St Cruz	sc715	200	pp	C	6	SABC HRP
FAS-L (N20)	poli	St Cruz	sc834	200	pp	C	6	SABC HRP
Mcl-1	poli	Dako	A3534	100	pp	C	6	SABC HRP
BAG-1	3.10G3E2	Chemicon	MAB4611	25	pp	C	6	SABC HRP
Caspase8	11B6	Novocastra	NCL-casp8	50	pp	C	6	SABC HRP
Casp3cleaved	poli	Cell Sign	9661	800	pp	C	6	SABC HRP
Casp3 p20	poli	St Cruz	sc1226	250	pp	C	6	SABC HRP
Casp9 p10	poli	St Cruz	sc7885	500	pp	C	6	SABC HRP
RESPOSTA À CITOCINAS / METABOLISMO OXIDATIVO								
Anticorpo	Clone	Fabricante	Código	Título	Reat	Sol	pH	Amplificação
Stat1(p84-91)	poli	St Cruz	sc346	3000	pp	C	6	SABC HRP
Stat2 (C20)	poli	St Cruz	sc476	800	pp	C	6	SABC HRP
c-REL(NF-kB)	poli	St Cruz	sc272	200	pp	C	6	SABC HRP
COX-2	4H12	Novocastra	NCL-cox2	6000	pp	C	6	SABC HRP
JUNc	poli	St Cruz	sc1694	200	mw	AC	6	LSAB
JUNd	poli	St Cruz	sc74	200	mw	AC	6	SABC HRP
c-FOS	poli	St Cruz	sc253	200	mw	AC	6	SABC HRP

Legenda:

C = Tampão citrato 10 mM; AC: ác cítrico 10 mM; E = EDTA 1mM; T/E = Tris/EDTA;

pp = panela de pressão; bm = banho maria; mw = microondas;

SABC HRP - Duet Mouse/Rabbit - Dako (Denmark) cod - K0496

Fabricantes:

Novocastra Laboratories LTD - NewCatle Upon Tyne – UK

Santa Cruz Biotechnology, Inc - Santa Cruz, CA – USA

Chemicon International, Inc - Temecula, CA – USA

Cell Signaling Technology, Inc - Danvers, MA – USA

Dako Denmark A/S - Glostrup – Denmark

MTM Laboratories AG - Distribuido pela Dako A/S

Ciclina D1- cortesia do Dr Jirik Bartek - Danish Cancer Society - Copenhagen – Dinamarca

3.4 ANÁLISE MICROSCÓPICA DOS MARCADORES MOLECULARES

Os anticorpos foram analisados pelo mesmo observador (VPA) e cada anticorpo dentro de um mesmo dia para se diminuir a variação intra-observador na intensidade da reação. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico e os resultados classificados em relação à intensidade da

reação e número de células positivas conforme a Tabela 6. Como cada anticorpo possui entre 3 e 4 valores referentes aos diferentes níveis consideramos para a análise estatística um valor resultante obtido pela comparação dos níveis disponíveis com a seguinte seqüência de prioridades:

1. Valor representativo = moda
2. Valor representativo = valor intermediário
3. Valor representativo = maior valor.
4. Avaliação subjetiva de acordo com a possibilidade de problemas técnicos da reação ou representação da neoplasia.

O escore final foi estabelecido segundo ilustrado na Tabela 4 classificado em negativo, fraco, moderado e forte.

Tabela 4 - Critérios de graduação imunohistoquímica a partir da intensidade da marcação e porcentagem de células neoplásicas marcadas. Os casos foram categorizados em imunomarcação ausente, fraca, moderada e forte.

		Porcentagem de Células Neoplásicas Marcadas (%)				
		0	1-10	11-50	50-90	>90
Intensidade	1					
	2					
	3					
	4					
	4					

Fraco

Moderado

Forte

Comparamos a intensidade de coloração em relação ao tempo de arquivamento do bloco de parafina a fim de avaliarmos possíveis interferências desta variável. Estabelecemos quatro grupos de acordo com o tempo de arquivamento: 1980-85, 1986-90, 1991-95, 1996-2001 e comparamos a intensidade de coloração para o anticorpo anti-CD20.

Para a elaboração do algoritmo proposto por Hans et al. [HANS et al. 2004] consideramos positiva a imunomarcagem maior que 10% das células em pelo menos um nível, independente da intensidade da marcação. A estrutura do algoritmo está demonstrada na Figura 17.

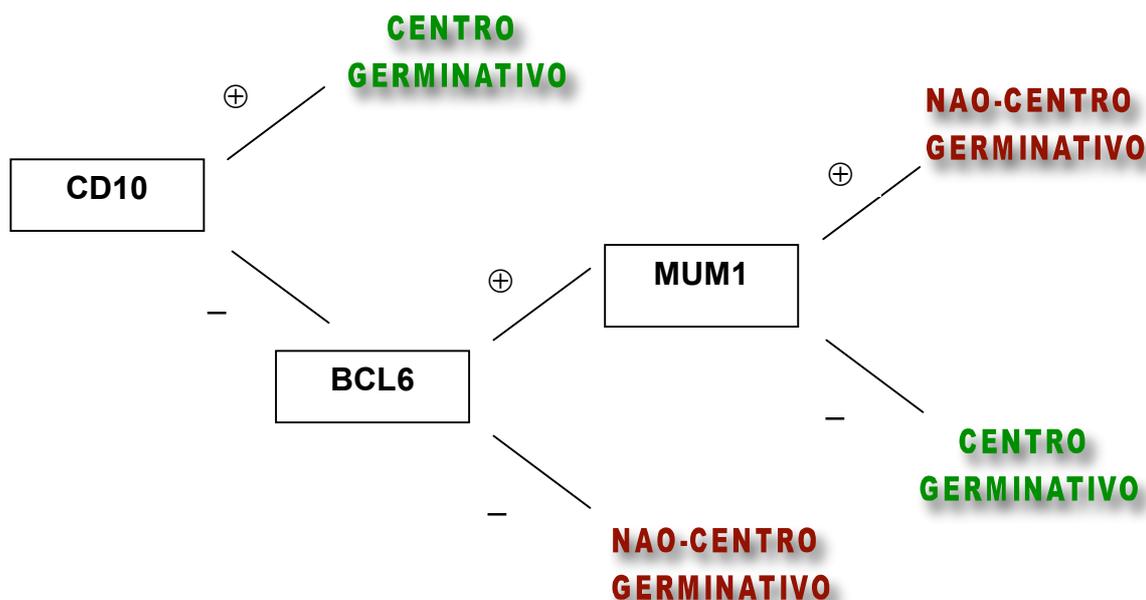


Figura 17 – Algoritmo para classificação molecular dos Linfomas Difusos de Grandes Células B pela imunistoquímica segundo Hans et al. 2004.

3.5 REVISÃO DOS PRONTUÁRIOS

Os prontuários arquivados ou microfilmados foram revistos para anotação das variáveis clínicas em protocolo específico (Figura 18).

O tempo de seguimento clínico foi calculado em meses pela subtração da data do início da quimioterapia da data da última informação (consulta médica ou contato indireto) ou morte pelo linfoma. A morte relacionada ao linfoma (ou câncer-específica) foi definida como a morte pela doença em si ou pelos efeitos do tratamento quimioterápico/radioterápico.

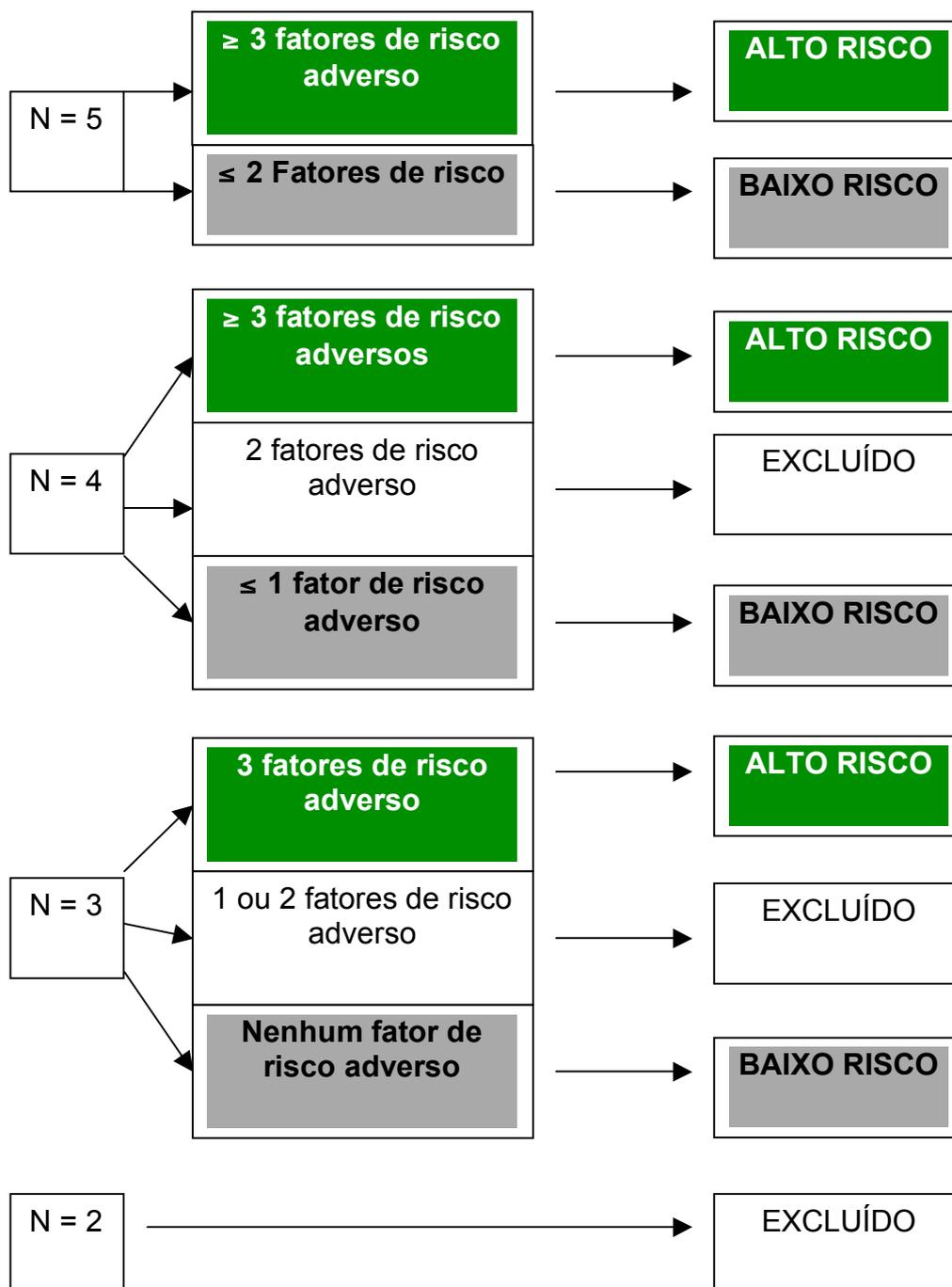
A remissão clínica completa foi estabelecida pela ausência de doença clínica detectável ao fim do tratamento quimioterápico de primeira linha. A sobrevida livre de doença foi calculada pela subtração da data do atestado de remissão completa até a recidiva do linfoma. O IPI foi estabelecido segundo o The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project (Anonymus 1993).

Como muitos pacientes apresentavam dados faltantes para a elaboração do IPI clássico utilizamos o cálculo do IPI adaptado segundo BIASOLI et al. (2000) (Figura 19).

Os dados dos prontuários foram revistos e anotados em protocolo específico. Após a anotação dos prontuários foi necessário excluir alguns pacientes por motivos clínicos.

LDGCB – PROTOCOLO DE ANOTAÇÕES CLÍNICAS DR. VICTOR PIANA DE ANDRADE / PROF. FERNANDO A. SOARES	
RGH:	
NOME:	NASCIMENTO:
IDADE 1º ATENDIMENTO:	SEXO:
DIAGNÓSTICO Topografia:	
PRIMEIRO ATENDIMENTO: ___/___/___	IPI:
ESTÁGIO:	TAMANHO DO TUMOR:
PERF STATUS:	KARNOFSKY:
DHL:	B2-MICROGLOBULINA:
DOENÇA EXTRA-NODAL:	SINTOMAS B:
TRATAMENTO	
INÍCIO: ___/___/___	FIM: ___/___/___
ESQUEMA QUIMIOTERAPIA:	Radioterapia
Nº DE SESSÕES:	Remissão completa:
SEGUIMENTO	
RECIDIVA: ___/___/___	ÓBITO: ___/___/___
ÚLTIMA INFORMAÇÃO: ___/___/___ ESTADO:	
INTERCORRÊNCIAS:	
OBSERVAÇÕES:	

Figura 18 - Protocolo de anotação dos dados obtidos a partir da revisão dos prontuários clínicos.



Fonte: BIASOLI et al. (2000).

Figura 19 - Critérios para elaboração do IPI adaptado a situações de dados clínicos incompletos, baseado no número de fatores disponíveis (N).

Os critérios de inclusão dos pacientes para a análise de sobrevida:

- Pacientes maiores de 18 anos, uma vez que os pacientes acompanhados pelo departamento de Pediatria usaram protocolo de tratamento diferente do utilizado para os adultos;
- Pacientes diagnosticados, tratados e acompanhados no Hospital AC Camargo cuja biópsia disponível para a construção do TMA foi obtida antes do início da quimioterapia;
- Pacientes com doença primária nodal
- Pacientes com linfoma difuso de células grandes com positividade para o anticorpo anti-CD20

Os critérios de exclusão dos pacientes da análise de sobrevida foram:

- Os pacientes com diagnóstico de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.
- Pacientes com doenças concomitantes graves (Insuficiência cardíaca congestiva grau IV, cirrose hepática, carcinoma de pâncreas) que impediram as análises da resposta à quimioterapia por óbito precoce pela doença de base;
- os casos de linfomas CD20 positivos com painel imunoistoquímico mais compatível com outro linfoma B (por exemplo CD5/Ciclina D1 positivos)
- os casos com índice proliferativo muito baixo
- os casos sem representação de linfoma difuso de grandes células na amostra contida nas lâminas do TMA;

3.6 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Para as análises de sobrevida a variável dependente considerada foi a porcentagem de sobrevida câncer específica(SCE) em 5 anos (SCE-5). A SCE foi calculada pelo intervalo entre o início do tratamento (primeiro ciclo da quimioterapia) e o óbito decorrente à doença ou ao tratamento. Para os pacientes que não morreram considerou-se a data da última informação. Para a sobrevida livre de doença o evento final considerado foi a recidiva clínica ou histopatológica.

As variáveis independentes foram as variáveis clínicas e índices obtidos pela revisão dos prontuários, o valor representativo das análises imunohistoquímicas e os perfis moleculares.

A análise univariada foi feita pelo método de Kaplan-Meier sendo as curvas de sobrevida comparadas pelo teste de log-rank.

Foram selecionadas para o modelo de riscos proporcionais de Cox as variáveis cujos níveis descritivos dos testes de significância foram de até 15%. A técnica de modelagem utilizada foi a Stepwise Forward Selection. A estimativa do risco relativo foi realizada pelo cálculo do Hazard Ratio (HR) o qual foi obtido a partir do modelo de Cox.

A associação entre as variáveis qualitativas foi avaliada pelo teste do qui-quadrado de Pearson ou pelo teste exato de Fisher.

Para todas as análises o nível de significância estatística considerado foi de 5%.

O software utilizado para a análise estatística foi o SPSS v10

4 RESULTADOS

4.1 MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS

Após a revisão das lâminas disponíveis dos casos seleccionados pela leitura dos laudos anatomopatológicos foram seleccionados 297 pacientes com Linfoma não-Hodgkin com aspecto difuso composto por células grandes. Dos 297 espécimes seleccionados para a construção do bloco receptor 252 foram positivos para o anticorpo CD20 (Figura 20).

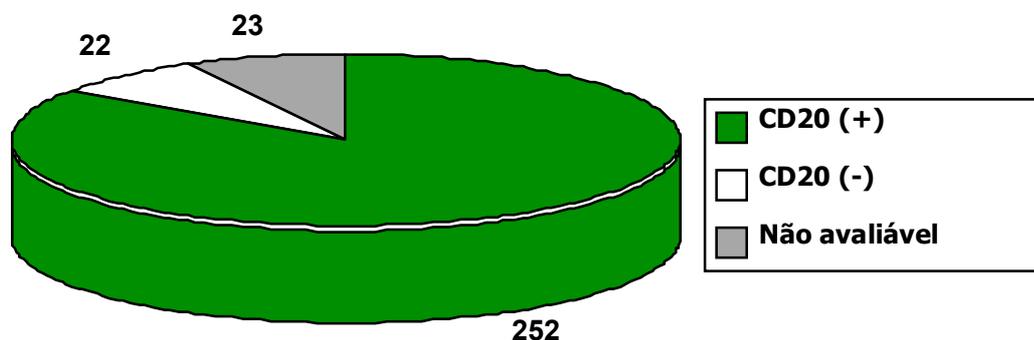


Figura 20 - Gráfico de proporção de casos CD20+, CD20(-) e não avaliáveis no bloco de TMA.

Os resultados da análise imunoistoquímica considerando os casos com CD20 positivo está demonstrado nos gráficos de barras contendo as proporções de casos negativo, fraco, moderado e forte para cada anticorpo (Figuras 21 a 24).

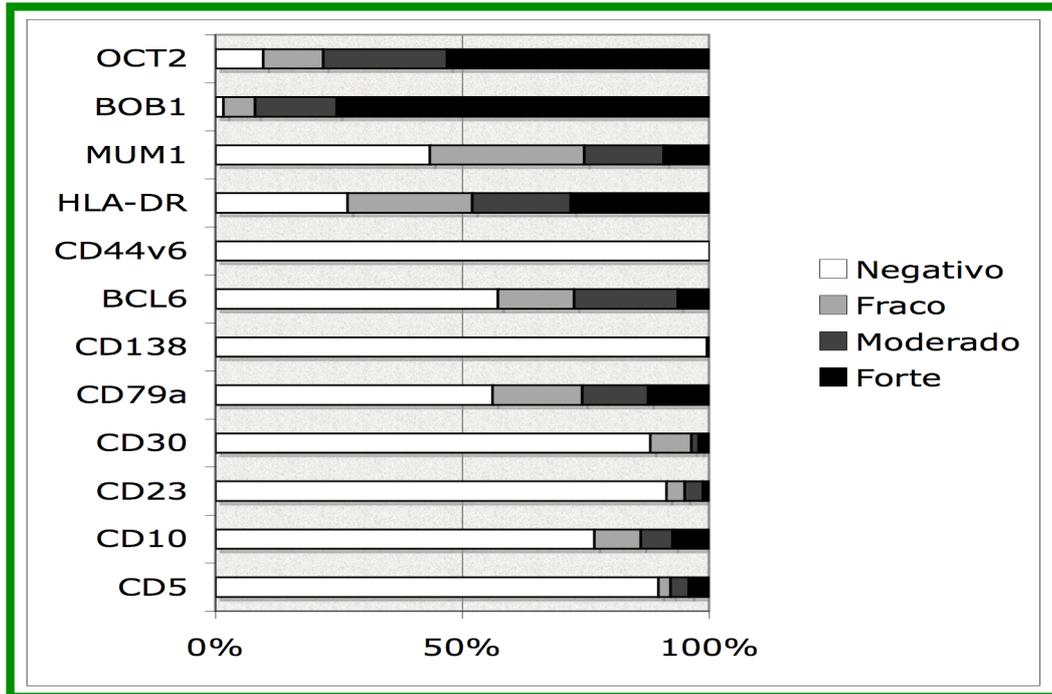


Figura 21 – Gráfico da proporção de casos negativos e positivos fraco, moderado e forte na análise imunoistoquímica dos marcadores da diferenciação linfocitária.

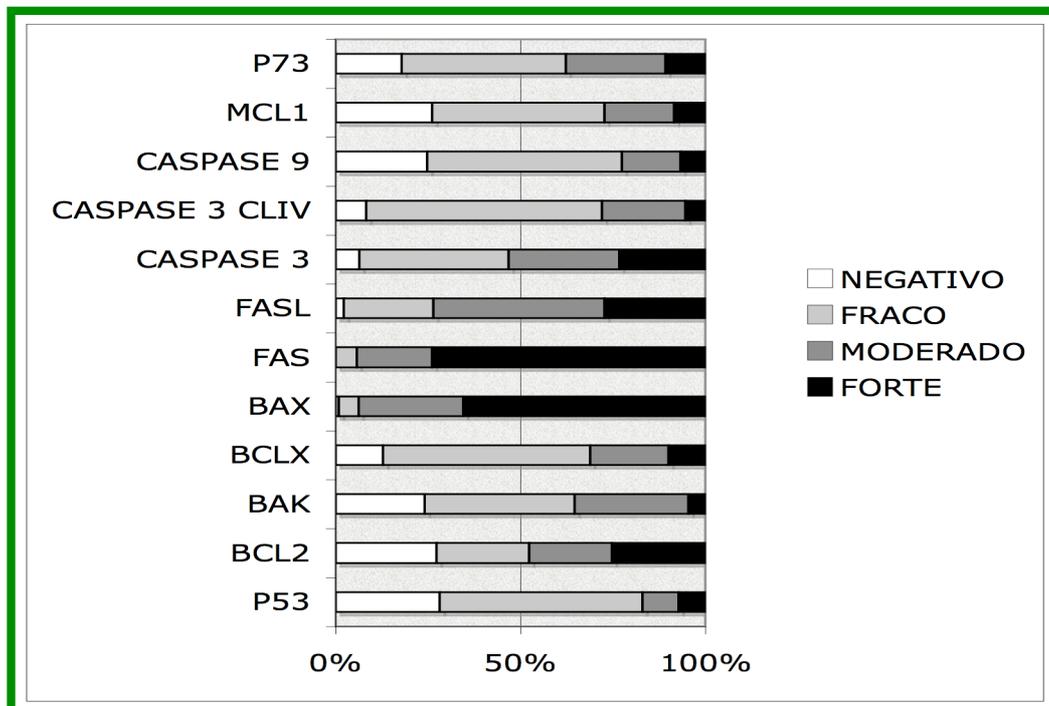


Figura 22 - Gráfico da proporção de casos negativos e positivos fraco, moderado e forte na análise imunoistoquímica dos marcadores da apoptose.

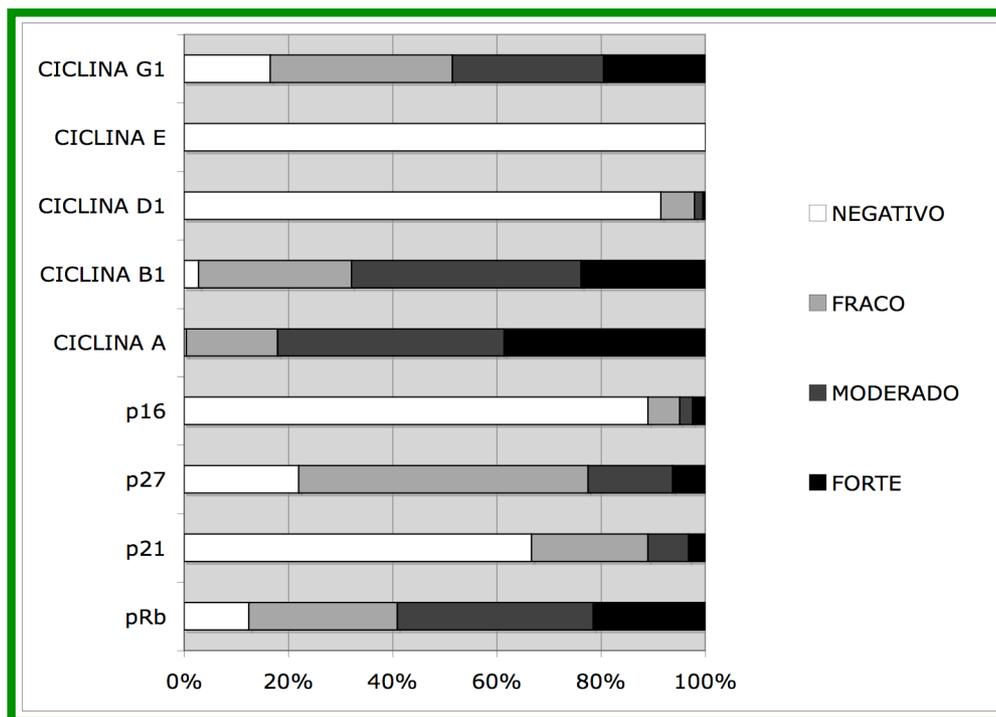


Figura 23 - Gráfico da proporção de casos negativos e positivos fraco, moderado e forte na análise imunohistoquímica dos marcadores do ciclo celular.

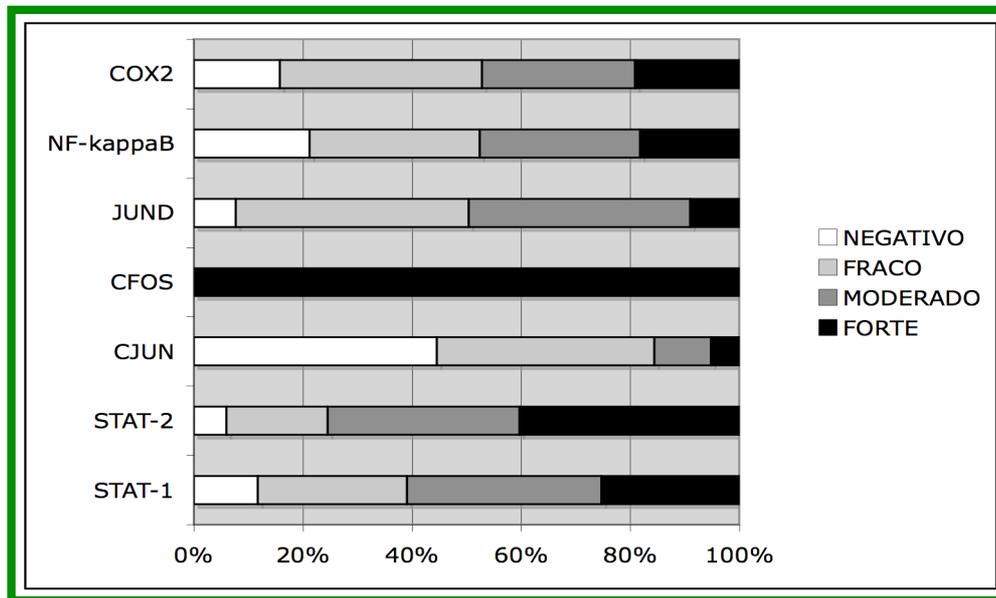


Figura 24 - Gráfico da proporção de casos negativos e positivos fraco, moderado e forte na análise imunohistoquímica dos marcadores de resposta a citocinas/metabolismo oxidativo.

Excluindo-se os que apresentavam painel imunoistoquímico compatíveis com outros linfomas CD20+ restaram 109 pacientes adultos com linfoma difuso de grandes células B nodal, com tratamento quimioterápico baseado em antraciclina e acompanhamento no Hospital do Câncer A.C Camargo, com dados clínicos suficientes para a análise das sobrevida câncer-específica e livre de doença.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES INCLUÍDOS NA ANÁLISE DE SOBREVIDA

A idade dos pacientes variou de 21 à 83 anos (média 55 ± 14.1 anos e mediana 55 anos). Quanto ao estágio clínico, 11 pacientes apresentaram doença no estágio I, 29 no estágio II, 35 no estágio III e 34 no estágio IV. As sobrevidas relacionadas ao estágio clínico estão mostradas na

Tabela 5. Sessenta e oito pacientes (62.4%) faleceram ao longo de todo o seguimento e a sobrevida câncer-específica em cinco anos (SCE-5) foi de 39.3%. O tempo máximo de seguimento foi de 210 meses (mediana 40 meses). Não houve diferença significativa na SCE-5 segundo a década de admissão no Hospital AC Camargo (1980-1991 vs. 1991-2001; $p=0.380$).

Apenas 47 pacientes apresentavam todos os dados necessários a elaboração do IPI clássico. Segundo os critérios do IPI adaptado, 50 pacientes apresentavam IPI de baixo risco, 22 apresentavam IPI de alto risco e em 39 o IPI não pode ser determinado.

Tabela 5 - Taxas de Sobrevida global média, Sobrevida livre de doença média e remissão completa segundo o estadiamento clínico.

Estadiamento	Sobrevida Câncer Específica Média (meses)	Sobrevida Livre de Doença Média (meses)	Remissão Completa (%)
I (n=11)	64,52	41,24	82
II (n=32)	50,03	23,98	59
III (n=36)	31,60	14,02	42
IV (n=34)	34,44	14,63	29

A SCE-5 para o grupo com IPI de baixo risco foi de 55,7% enquanto para o grupo com IPI de alto risco foi de 25,0% ($p=0,004$; Figura 24)

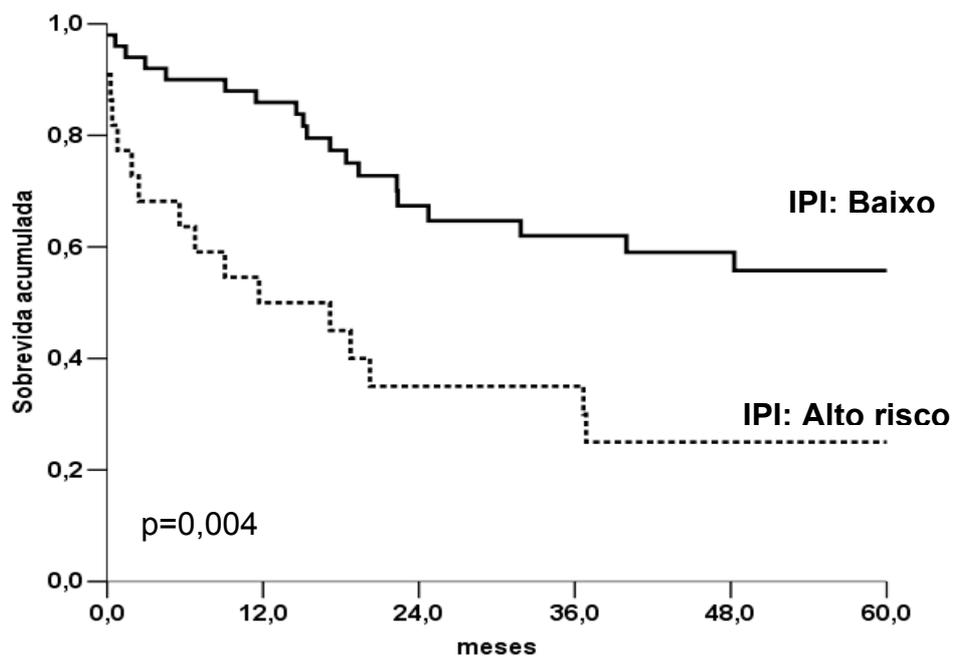


Figura 25 - Gráfico de comparação das curvas de sobrevida câncer específica entre os grupos com IPI de baixo risco e IPI de alto risco.

4.3 A ANÁLISE UNIVARIADA

Variáveis clínicas

As SCE-5 segundo as variáveis clínicas estão descritas na Tabela 6. O IPI, o estágio clínico (quatro grupos ou agrupado em doença avançada vs. doença localizada) e a remissão completa (Figura 26) após o tratamento quimioterápico de primeira linha foram os parâmetros clínicos estatisticamente significativos para a SCE-5. O uso de radioterapia adjuvante esteve correlacionado a maior SCE-5, embora com uma diferença estatisticamente não significativa. A idade acima de 60 anos não mostrou diferença estatística nesta população.

Tabela 6 - Análise univariada dos parâmetros clínicos em relação a sobrevida câncer específica em 5 anos.

Variável	Categorias	Sobrevida Câncer-específica 5 anos (%)	p
Idade	> 60	39,9	0,618
	< 60	36,6	
Estágio Clínico	I	60,9	<0,001
	II	55,5	
	III	29,0	
	IV	25,0	
Estágio Clínico agrupado	I/II	57,3	<0,001
	III/IV	28,6	
Remissão Completa	Sim	63,8	<0,001
	Não	21,6	
Sintomas B	Não	38,9	0,419
	Sim	39,5	
Radioterapia adjuvante	Não	34,1	0,057
	Sim	47,3	
Índice Prognóstico Internacional	baixo risco	55,7	0,004
	alto risco	25,0	
Década de admissão	1980-1990	35,1	0,348
	1991-2001	44,2	

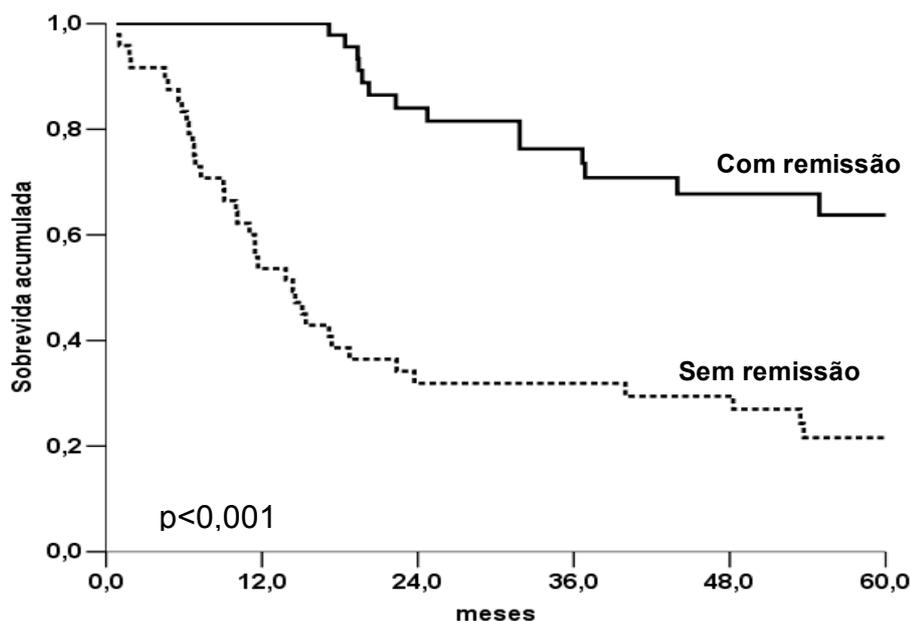


Figura 26 - Gráfico da comparação das curvas de sobrevida câncer específica entre os grupos com e sem remissão completa após esquema quimioterápico de primeira linha.

Variáveis morfológicas e moleculares

Não houve diferença na SCE-5 em relação a morfologia celular predominante no linfoma (centroblástica vs. imunoblástica vs. pleomórfica vs. B-rico em T; $p=0,660$).

A Tabela 7 mostra os resultados da análise imunoistoquímica para cada painel estudado correlacionados com a SCE-5. Os resultados da análise estatística univariada dos marcadores imunoistoquímicos agrupados em negativo ou positivo (fraco, moderado ou forte) estão descritos na Tabela 8.

Conforme esperado, não houve diferença estatisticamente significativa entre a intensidade da marcação imunoistoquímica do anticorpo CD20 ao longo dos anos ($p=0,06$). Embora não tenha sido avaliado objetivamente, também não observamos diferenças na intensidade da imunomarcação para os demais anticorpos entre casos mais antigos e mais recentes. Portanto, devemos considerar que o tempo de arquivamento não interferiu na intensidade da reação imunoistoquímica na nossa amostra.

As seguintes variáveis moleculares encontraram significância estatística para SCE-5 na análise univariada: OCT2 ($p=0,009$; Figura 27), p53 ($p=0,024$; Figura 28), Ciclina G1 ($p=0,021$; Figura 29), e NF- κ B ($p=0,044$; Figura 30) e ciclina B1 ($p=0,002$).

A positividade para a proteína BCL2 em mais de 50% das células neoplásicas, ponto de corte mais frequentemente utilizado na literatura, esteve relacionada à uma pior sobrevida livre de doença (negativo: 34,6% e positivo: 16,35%; $p=0,028$). Além disto no grupo de pacientes com IPI de baixo risco a positividade para BCL2 esteve associada a pior SCE-5 (negativo: 60.6%, positivo: 26.7%; $p=0,029$).

Tabela 7 - Análise univariada da marcação imunoistoquímica para cada painel estudado em relação a sobrevida câncer específica em 5 anos*.

Painel	Anticorpo	Marcação Imunoistoquímica (n)/SCE-5 (%)				p
		Neg/SCE-5	1+/SCE-5	2+/SCE-5	3+/SCE-5	
Marcador Linfóide	CD5	88/37,5	3/63,7	5/0	5/80,0	,237
	CD10	82/33,6	8/52,5	9/55,6	5/60,0	,504
	bcl-6	69/42,7	11/60,6	16/33,0	6/33,0	,706
	MUM-1	48/42,2	22/23,3	15/54,9	15/35,6	,136
	HLA-DR	33/32,0	16/48,9	22/45,7	31/39,0	,439
	OCT-2	10/0	15/42,9	21/48,2	51/41,3	,056
	BOB1	1/0	6/0	16/10,7	76/50,0	,002
Apoptose	p53	26/63,1	54/34,8	14/21,4	9/47,6	,023
	bcl-2	30/51,8	26/30,1	23/38,3	25/34,8	,694
	bcl-X	11/24,2	56/42,1	20/42,4	13/39,6	,818
	bax	1/100	7/28,6	30/24,4	65/46,0	,453
	bak	25/38,3	42/47,3	30/37,3	5/40,0	,972
	caspase3	5/40,0	35/25,5	31/51,0	23/43,2	,275
	caspase3 clivada	7/38,1	60/37,8	27/33,7	10/37,5	,583
	caspase9	17/59,6	51/29,5	19/50,0	10/30,0	,604
	CD95	0	10/32,0	16/43,7	78/40,2	,915
	CD95L	2/0	21/61,8	47/39,0	28/33,8	,179
	MCL-1	21/44,9	39/40,2	20/41,6	11/26,5	,861
Ciclo celular	pRb	16/37,5	23/37,9	49/36,9	14/42,9	,958
	Ciclina A	0	20/31,1	37/51,3	41/33,4	,125
	Ciclina B1	2/0	23/50,2	42/42,5	20/42,5	,024
	Ciclina D1	74/33,5	11/68,2	1/0	2/100	,148
	Ciclina G1	15/20,0	28/39,2	40/45,7	17/36,3	,131
	p16	91/38,7	10/45,0	2/0	1/0	,841
	p21	77/40,4	20/41,3	5/0	1/100	,484
	p27	17/57,7	49/33,2	29/43,9	5/20,0	,409
	p73	15/36,6	46/47,3	25/43,2	14/32,6	,733
Resposta à Citocinas	cJun	24/37,0	48/38,4	7/38,1	5/40,0	,792
	JunD	14/47,9	54/37,5	19/30,7	3/66,7	,859
	STAT-1	7/28,6	25/23,3	36/42,6	22/48,3	,262
	STAT-2	7/28,6	16/43,7	36/44,0	38/40,9	,706
	NF-κB	16/62,4	29/36,5	27/36,5	20/41,7	,248
	Cox-2	13/33,0	33/38,9	22/45,4	16/37,6	,988

*Os marcadores CD44v6 (diferenciação celular) e Ciclina E (ciclo celular) foram negativos em todos os casos. O marcador cFos (metabolismo oxidativo) foi positivo forte em todos os casos.

Tabela 8 - Análise univariada da sobrevida câncer-específica em 5 anos (SCE-5) segundo a resultado imunistoquímico categorizado em negativo e positivo.*

Painel	Anticorpo	Negativo n/SCE-5	Positivo n/SCE-5	p
DIFERENCIAÇÃO LINFÓIDE	CD5	88/37.5	13/44.0	0.904
	CD10	82/33.6	22/54.2	0.155
	BCL-6	69/42.7	33/38.3	0.787
	MUM-1	48/42.2	52/35.5	0.909
	HLA-DR	33/32.0	69/44.3	0.110
	CD138	98/36.8	1/0	0.873
	OCT-2	10/0	87/43.3	0.009
	BOB1	1/0	98/39.5	0,084
APOPTOSE	P53	26/63.1	77/32.0	0.024
	BCL-2	30/51.8	74/34.5	0.295
	BCL-X	11/24.2	89/41.7	0.335
	BAX	1/100	102/38.9	0.391
	BAK	25/38.3	77/42.1	0.646
	CASPASE3	5/40.0	92/38.9	0.961
	CASPASE3 CLIVADA	7/38.1	97/36.5	0.991
	CASPASE9	17/59.6	80/33.9	0.266
	CD95L	2/0	96/42.5	0.519
	MCL-1	21/44.9	70/37.7	0.396
CICLO CELULAR	PRB	16/37.5	86/39.4	0.640
	CICLINA B1	2/0	85/41.4	0.002
	CICLINA D1	74/33.5	14/67.3	0.065
	CICLINA G1	15/20.0	85/41.6	0.021
	P16	91/38.7	13/49.2	0.700
	P21	77/40.4	26/34.7	0.550
	P27	17/57.7	83/36.1	0.205
	P73	15/36.6	85/42.6	0.786
RESPOSTA A CITOCINAS	CJUN	24/37.0	60/38.1	0.652
	JUND	14/47.9	76/36.3	0.638
	COX-2	13/33.0	71/38.9	0.823
	STAT-1	7/28.6	83/39.3	0.919
	STAT-2	7/28.6	90/39.9	0.315
	NF-κB	16/62.4	76/38.4	0.044

*Os marcadores ciclina A e cFos foram positivos em todos os casos. Os marcadores CD44v6 e ciclina E foram negativos em todos os casos.

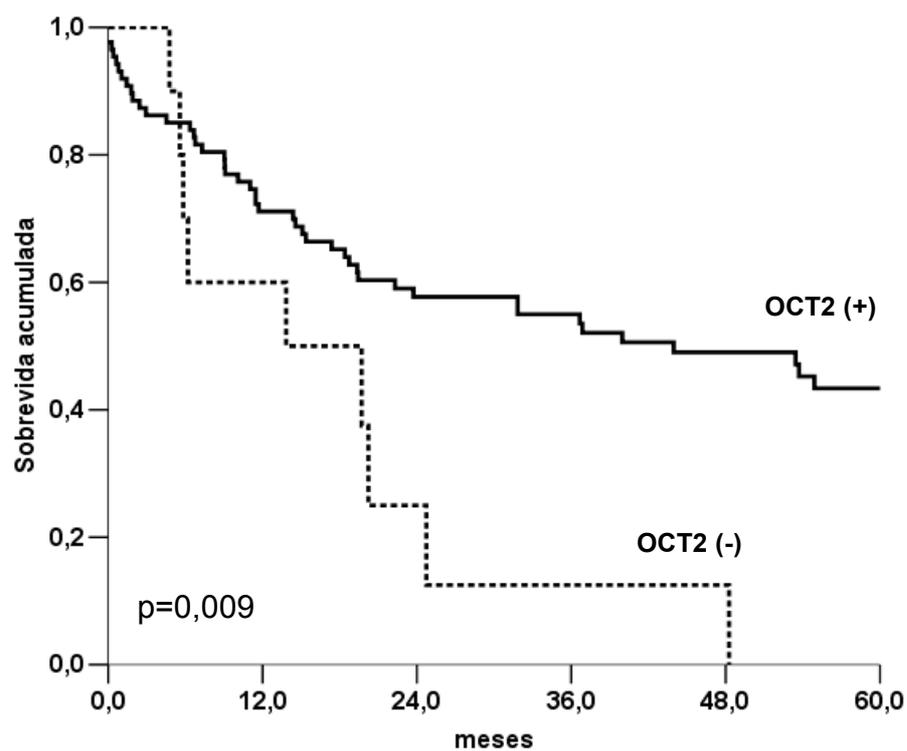


Figura 27 - Gráfico de comparação das curvas de sobrevida câncer específica entre os grupos OCT2 positivo e OCT2 negativo.

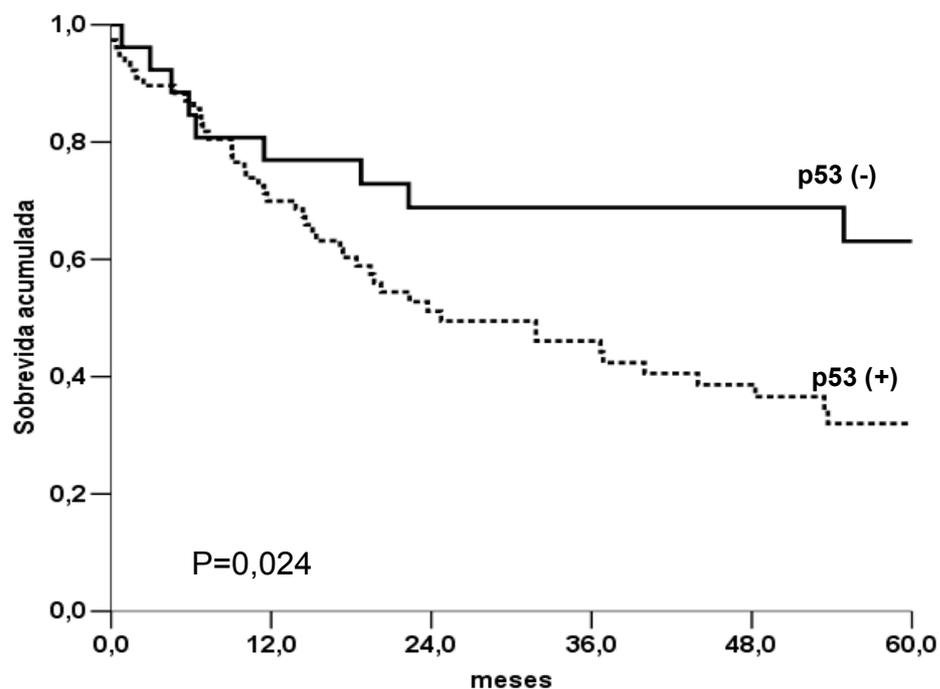


Figura 28 - Gráfico de comparação das curvas de sobrevida câncer específica entre os grupos p53 positivo e p53 negativo.

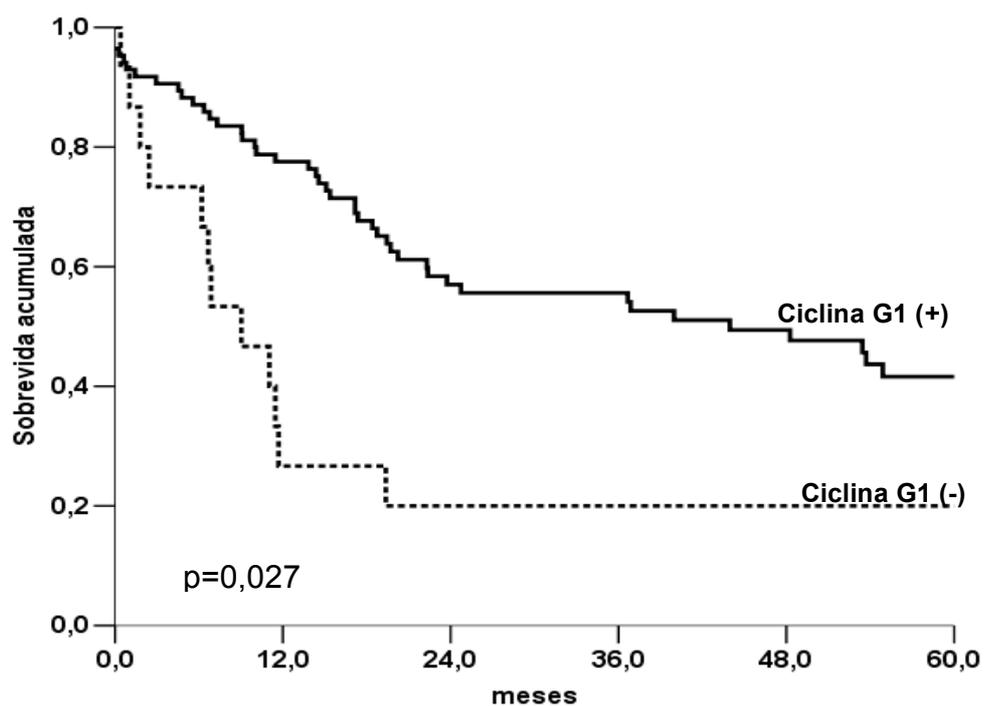


Figura 29 - Gráfico de comparação das curvas de sobrevida câncer específica entre os grupos Ciclina G1 positivo e Ciclina G1 negativo.

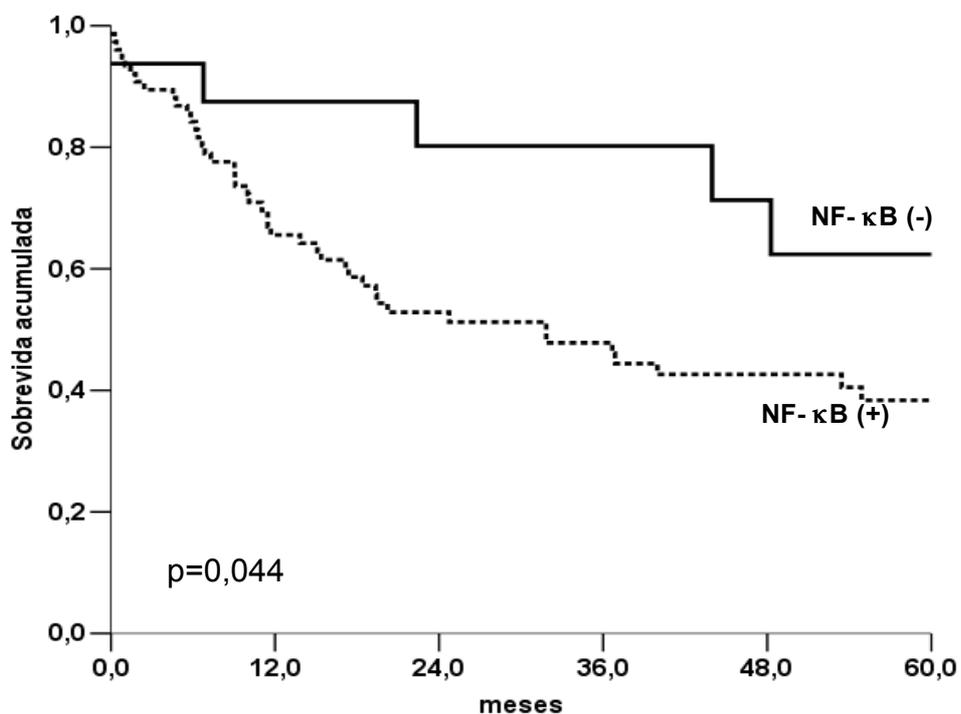


Figura 30 - Gráfico de comparação das curvas de sobrevida câncer específica entre os grupos grupos NF-KappaB positivo e NF-kappaB negativo.

A classificação molecular do LDGCB segundo o algoritmo de Hans et al. 2004 foi possível em 101 casos e identificou:

Perfil “centro germinativo”: 34 casos (29,7%)

Perfil “não centro-germinativo”: 67 casos (66,3%)

Nenhuma diferença estatisticamente significativa quanto a SCE-5 foi observada nesta população considerando esta classificação molecular (CG: 38,8% e Ativado: 41,0%; $p=0.610$). Para a sobrevida livre de doença também não observamos diferença estatisticamente significativa entre os perfis moleculares (Ativado: 24,6% e CG: 31,9%; $p=0,672$). Investigamos a validade de um outro algoritmo demonstrado na Figura 31 onde a evidência de ativação linfocitária determinada pela positividade do anticorpo MUM1 foi considerada a principal informação. O tipo 3 foi definido pela ausência de evidência dos perfis “ativado” ou “centro germinativo”. Neste algoritmo foram classificados como perfil “centro germinativo”, perfil “ativado e tipo 3 respectivamente 26 (31,3%), 23 (27,7%) e 36 (43,4%) casos. Não houve diferença significativa na sobrevida câncer específica (CG: 43,1%, Ativado: 37,9% e Tipo 3: 46,3%; $p=0,185$) ou sobrevida livre de doença (CG:35,4%, Ativado: 0% e Tipo 3: 33,2%; $p= 0,711$) entre estes grupos.

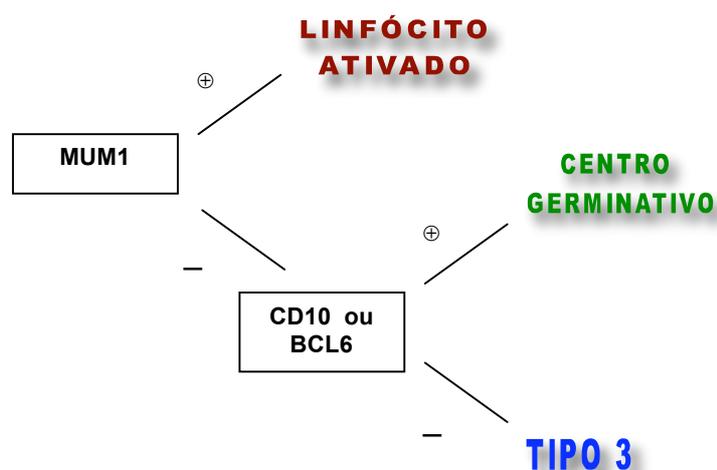
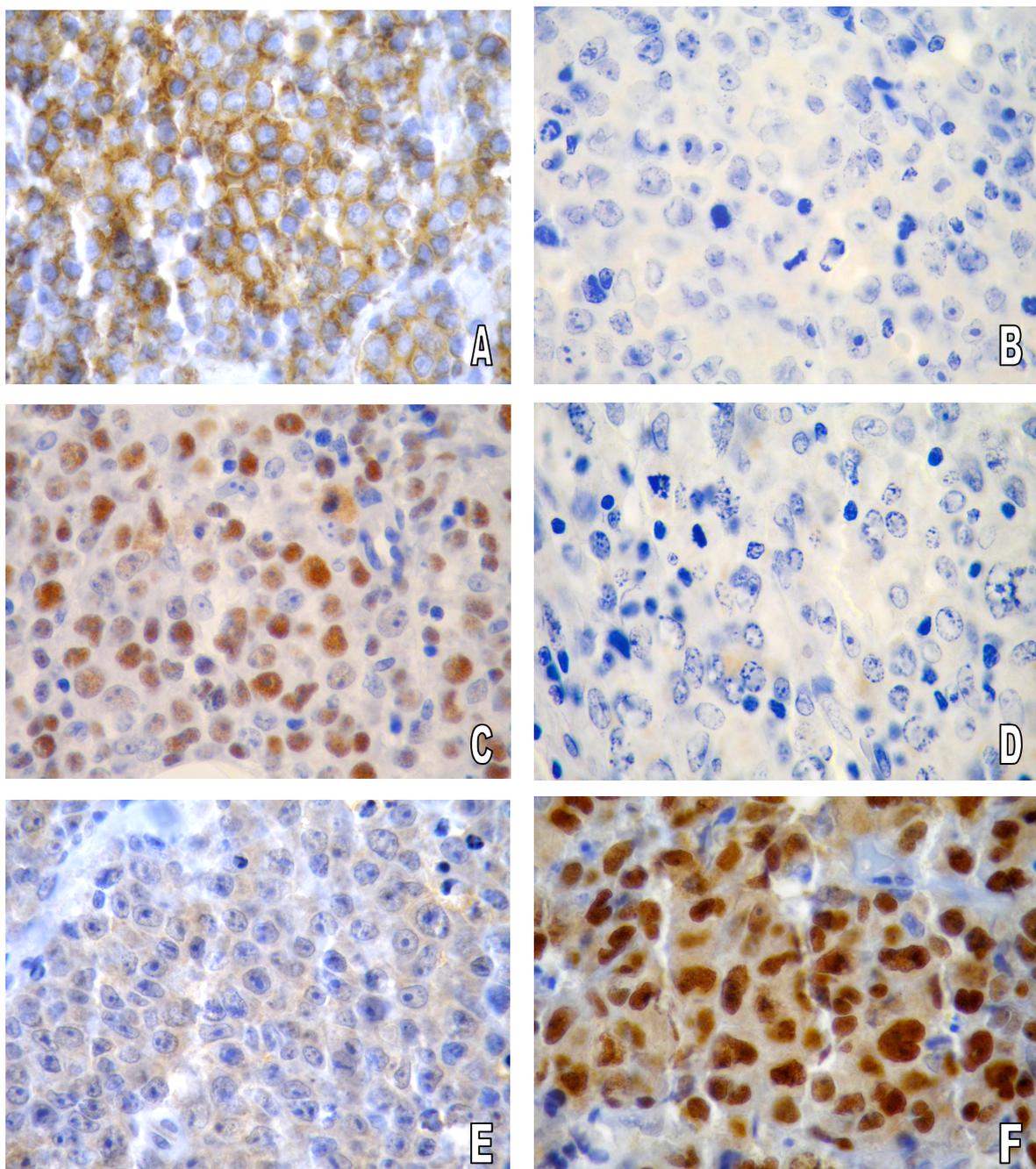


Figura 31 - Algoritmo alternativo para a classificação molecular dos LDGCB pela imunohistoquímica.



Legenda: A - CD10 positivo; B – CD10 negativo; C – BCL6 positivo; D – BCL6 negativo; E – MUM1 negativo; F: MUM1 positivo. As ilustrações situadas à esquerda na figura compõem o perfil “centro germinativo” enquanto as situadas à direita compõem o perfil “linfócito ativado”.

Figura 32 - Conjunto de marcadores imunoistoquímicos usados na classificação dos LDGCB segundo o perfil ontogenético.

4.4 A ANÁLISE MULTIVARIADA

Todas as variáveis clínicas ou moleculares com nível de significância na análise univariada menor que 0,15 participaram do modelo de regressão Cox. Os fatores de risco independentes para morte relacionada a doença identificados pelo modelo de regressão COX foram: IPI de alto risco e doença residual após regime quimioterápico de primeira linha (Tabela 9).

Tabela 9 – Análise multivariada. Modelo regressão Cox com as variáveis clínicas IPI e remissão completa.

Variável	Categoria	Hazard Ratio	Intervalo de Confiança 95% do Hazard Ratio	
			Inferior	Superior
IPI	baixo risco	1		
	alto risco	2,27	1,08	4,78
Remissão Completa	sim	1		
	não	3,27	1,56	6,83

Os pacientes foram estratificados em três grupos de acordo com o número de fatores de risco independentes para o óbito com diferença estatisticamente significativa entre as curvas de sobrevida câncer específica ($p=0,005$; Figura 33):

- Ausência dos fatores de risco: SCE-5 = 75.2%
- Um fator de risco: SCE-5 = 42.8%
- Dois fatores de risco: SCE-5 = 14.3%

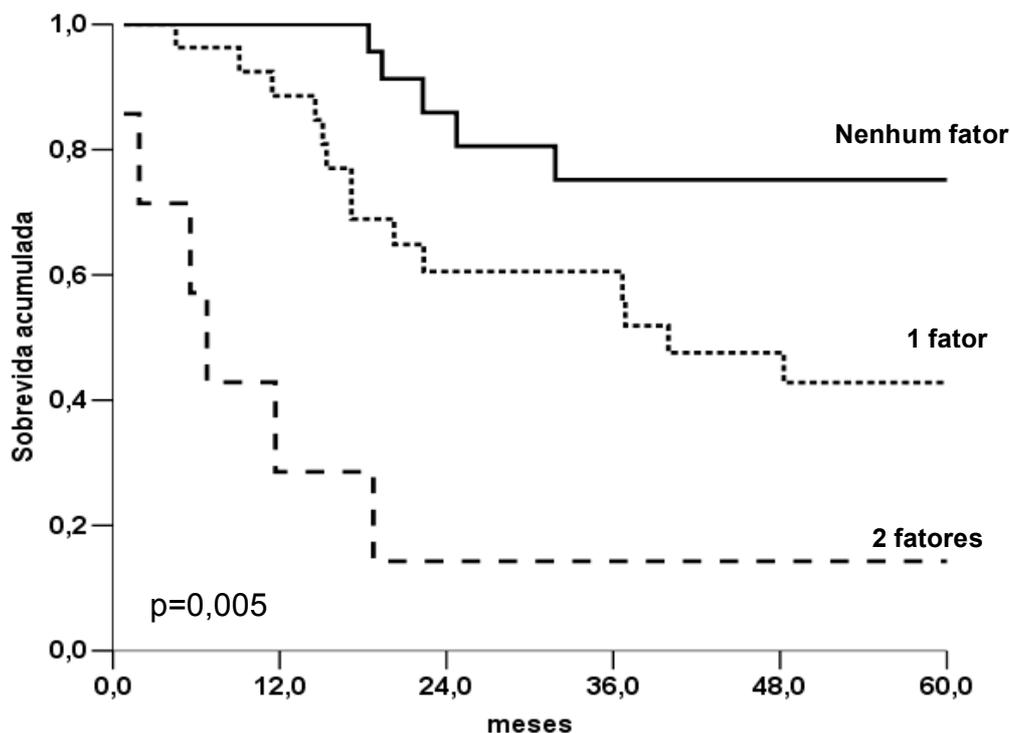


Figura 33 - Gráfico de comparação das curvas de sobrevida câncer específica entre os grupos com e sem fatores adversos identificados pelo modelo multivariado Cox (IPI e remissão completa).

Quando o modelo multivariado foi ajustado pela década do tratamento as variáveis IPI e remissão completa mantiveram seus níveis de significância, permanecendo no modelo.

O grupo de pacientes com IPI de baixo risco difere significativamente do grupo de pacientes com IPI de alto risco para os marcadores moleculares STAT-1 ($p = 0.017$) e cJun ($p=0.041$). Tanto para STAT-1 quanto para cJun a positividade esteve associada com o IPI de baixo risco.

Se considerarmos apenas os pacientes com IPI de baixo risco observamos que 60.6% dos pacientes portadores de LDGCB BCL2 positivo apresentaram morte relacionada ao linfoma, comparado a 26.7% dos pacientes do subgrupo BCL2 negativo ($p=0,029$). Os demais marcadores

moleculares apresentaram diferenças não significativas para esta variável.

Para os pacientes com IPI de alto risco não identificamos marcadores moleculares relacionados significativamente com a melhor ou pior SCE-5. Também não identificamos nenhum marcador molecular capaz de prever a remissão completa ao tratamento quimioterápico de primeira linha.

Para a identificação das variáveis moleculares mais relevantes excluímos o IPI do modelo de regressão Cox e as variáveis que permaneceram no modelo foram remissão completa, estágio clínico, P53 e OCT2 (Tabela 10).

Assim elaboramos um modelo algoritmo baseado nas duas variáveis moleculares presentes nesta situação, capaz de separar os pacientes com evolução favorável e desfavorável com nível de significância estatística $p=0,02$ (Figura 34 e 35; Tabela 11).

Tabela 10 - Simulação do modelo de regressão Cox antes da inclusão do IPI.

Variável	Categoria	Hazard Ratio	Intervalo de Confiança 95% do Hazard Ratio	
			Inferior	Superior
Estágio Clínico	I			
	II	3,91	0,81	18,84
	III	6,41	1,37	29,98
	IV	10,37	2,25	47,73
P53	Negativo			
	Positivo	2,64	1,20	5,81
OCT2	Positivo			
	Negativo	2,34	1,06	5,19
Remissão Completa	Sim			
	Não	3,89	2,03	7,23

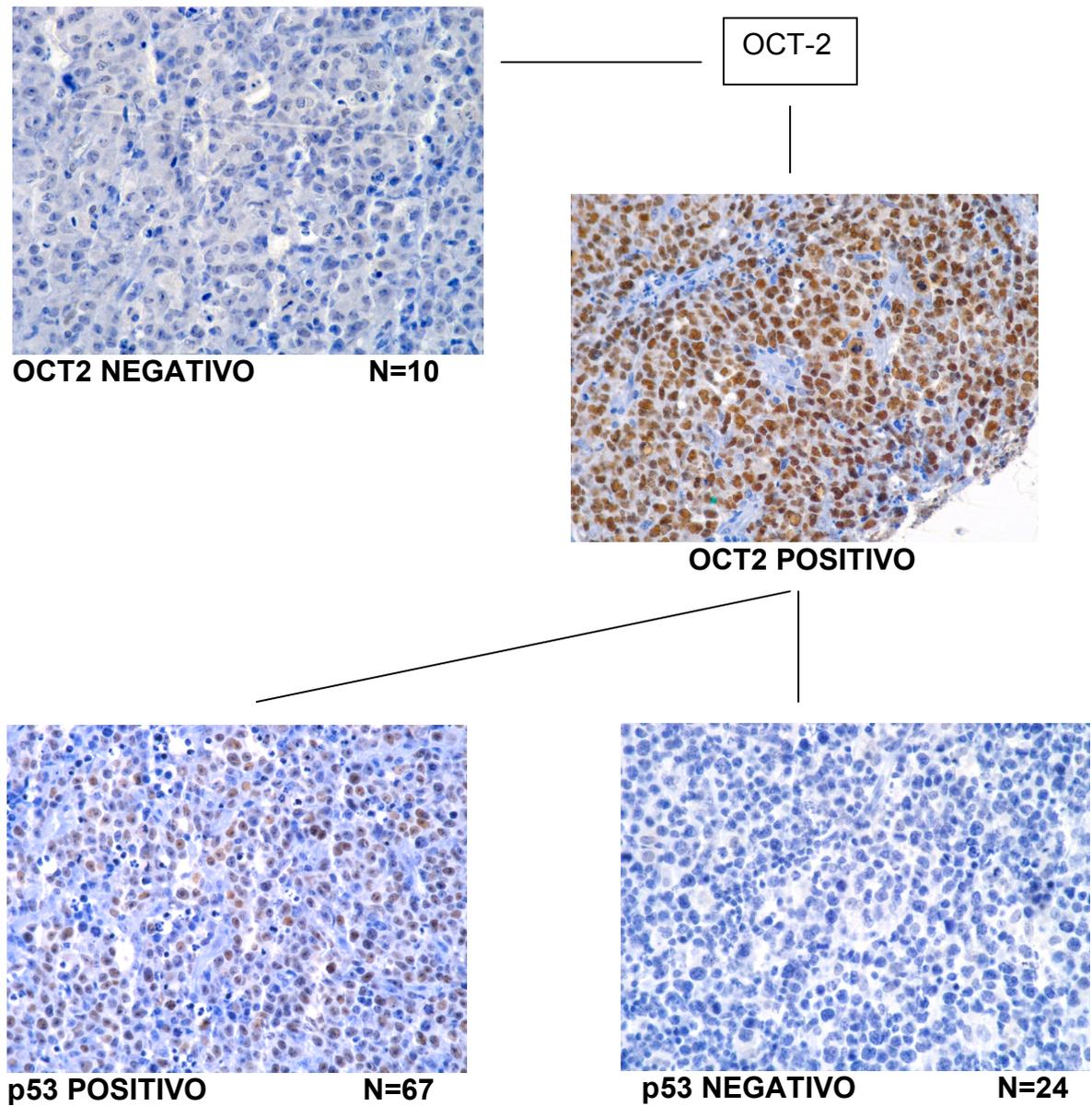


Figura 34 - Algoritmo elaborado a partir das variáveis moleculares OCT2 e p53 para classificação do risco de evolução desfavorável após tratamento padrão em pacientes com linfoma difuso de grandes células B.

Tabela 11 - Sobrevida câncer-específica e sobrevida mediana dos grupos OCT2 negativo, OCT2negativo/p53positivo e OCT2positivo/p53negativo ($p=0,02$).

Categoria	n	Sobrevida Câncer-Específica 5 anos (%)
OCT2 neg	10	0
OCT2+/p53+	67	36,5
OCT2+/p53-	24	65,6

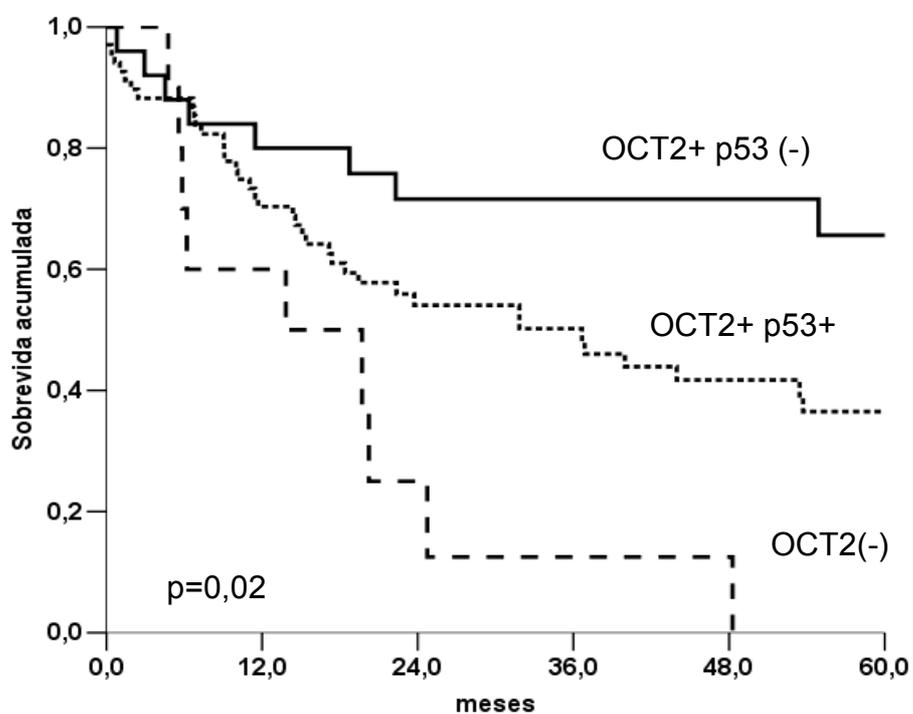


Figura 35 - Gráfico de comparação das curvas de sobrevida câncer específica entre os grupos OCT2(-), OCT2+/p53+ e OCT2+/p53(-)

5 DISCUSSÃO

A categoria LDGCB da O.M.S. inclui um grupo heterogêneo de linfomas agressivos com uma grande proporção dos pacientes apresentando resposta insatisfatória ao tratamento ou morte pelos efeitos colaterais deste. As expectativas são de se refinar melhor os critérios diagnósticos e os fatores prognósticos/preditivos para se individualizar as opções de tratamento. Nós analisamos tanto variáveis clínicas como variáveis moleculares por imunistoquímica, referentes a diferentes funções celulares, incluindo o ciclo celular, a apoptose, a diferenciação do linfócito e a fatores de transcrição de respostas a citocinas. Identificamos pela análise multivariada duas variáveis clínicas, IPI e remissão completa, como as mais relevantes para o prognóstico dos pacientes adultos com LDGCB nodal pós-tratamento. Variáveis moleculares como P53, OCT2, NF- κ B, as ciclinas G1 e B1 e BCL2 mostraram-se estatisticamente significantes na análise univariada ou agregam algum refinamento prognóstico ao IPI.

A população estudada apresenta algumas características particulares que merecem considerações:

1. A casuística exibiu uma idade mediana ao diagnóstico de 54 anos (21 a 83), sendo esta 10 anos menor do que o esperado para o LDGCB
2. Observamos uma proporção maior do que esperado de casos com estágio clínico III ou IV quando comparado aos dados da literatura (63,6% vs. 50,0%).

O Hospital do Câncer AC Camargo é uma instituição com nível

terciário de atenção à saúde, especializada no tratamento de oncologia, onde os pacientes são encaminhados de todo o Brasil e mais raramente de alguns países da América do Sul. Muitas vezes são encaminhados para uma segunda opinião pacientes portadores de doenças avançadas, considerados fora de possibilidade terapêutica em suas cidades de origem. Esta situação outrora usual começa agora a ocorrer com menor frequência a medida que novos centros de tratamento oncológico estão em funcionamento no país. Entretanto, nossa casuística retrata a realidade das décadas de 1980 e 1990. Ainda assim, as taxas de óbito pela doença/tratamento e SCE-5 (63,3% e 39,3%) se mostraram semelhantes às esperadas para o LDGCB. Além disto, a SCE-5 observada nos grupos com IPI de baixo risco (55,7%) e IPI de alto risco (25%) são taxas esperadas para cada uma destas situações. Por isto, reconhecemos um viés na seleção dos pacientes mas entendemos que este viés não influenciou significativamente nas análises que se seguem.

Para este estudo utilizamos o método de *Tissue Microarrays* para análise da expressão protéica imunoistoquímica em larga escala. Avanços recentes na caracterização molecular por quantificação de cDNA evidenciaram a existência de subtipos de LDGCB com evolução clínica distinta, baseado nas similaridades da célula neoplásica com determinados estágios da maturação do linfócito B. Por razões práticas a tradução do conhecimento obtido através dos estudo de cDNA microarrays (perfis moleculares) para o nível protéico é necessária.

A maior preocupação dos críticos da utilização do TMA é a

representação da lesão considerando a pequena amostra estudada. Pode-se defender a idéia do uso do TMA lembrando que patologistas cirúrgicos trabalham sobre amostragem e nunca a representação de um tumor por um corte convencional é realmente completa. As lâminas convencionais são na verdade amostras selecionadas a partir do exame macroscópico e mesmo que todo o tumor tenha sido incluído em parafina não o examinaremos por completo. Podemos exemplificar considerando um tumor esférico de 2,0 cm de diâmetro e tomado apenas um corte de 1cm^2 por $4\mu\text{m}$ de espessura. O tumor tem o volume de $8,0\text{ cm}^3$, enquanto que o corte analisa apenas $0,004\text{ cm}^3$, ou seja, $0,0005\%$ do tumor. Por outro lado, se analisarmos nas lâminas de TMA amostras de tecido de 1,0 mm de diâmetro, estaremos o fazendo 100 vezes menos, portanto $0,00004\text{ cm}^3$. O mais importante, entretanto, é a seleção da amostra para o TMA a partir da lâmina original. Um corte convencional usualmente não contém 100% da amostra com células tumorais, enquanto que na amostra de TMA são selecionadas áreas de tumor com alta densidade celular. Além disso, um corte representa somente uma área do tumor. Estão corretos aqueles que defendem que um tumor é heterogêneo e, portanto, diferentes áreas deveriam ser selecionadas para representar toda a diversidade morfológica e neste ponto há uma vantagem nas amostras do TMA. É mais representativo observar áreas provenientes de diversos blocos de tumor do que de um único segmento, por maior que ele seja. Com a utilização do TMA, podem-se analisar lâminas com diferentes níveis de profundidade. Um bloco de TMA pode dar origem a até 200 lâminas na dependência da profundidade dos cilindros nele contidos. Se

considerarmos lâminas cortadas com 5µm, e utilizarmos um marcador com 40 cortes de diferença, estaremos com 200µm de distância entre os níveis e nenhuma célula presente no corte 1 estará representada no corte 40. Esta avaliação em dois níveis pode ter uma melhor representação do que no corte original (CAMP et al. 2000; MUCCI et al. 2000).

No nosso estudo fomos capazes de identificar os grupos LDGCB-CG e LDGCB-A pela imunistoquímica, embora não tenhamos identificado uma diferença significativa na SCE-5 ($p=0,610$). Este achado já foi reportado por outros autores (COLOMO et al. 2003; DE PAEPE et al. 2005). A classificação molecular dos LDGCB usando antígenos de diferenciação do linfócito B como o CD10, BCL6, MUM1 e CD138 obteve sucesso em alguns estudos mas é vista com algum ceticismo por outros (SHIPP et al. 2002; COLOMO et al. 2003; CHANG et al. 2004; HANS et al. 2004). De fato, os dados disponíveis atualmente não mostram consenso no que diz respeito a classificação dos LDGCB por imunistoquímica. Na nossa casuística 34 de 109 LDGCB (33,0%) foram classificados como LDGCB-CG comparados com 15 de 38 (39,4%) no estudo de CHANG et al. (2004) e 64 de 152 LDGCB (42%) no estudo de HANS et al. (2004)

O grupo LDGCB-CG é definido como CD10 ou BCL6 positivo e MUM1 negativo. O algoritmo de HANS et al. (2004) considera a CD10 como a proteína determinante, isto é, casos CD10 positivo são considerados como perfil “centro germinativo” e apenas casos CD10 negativo têm a possibilidade de serem classificados como perfil “linfócito ativado”, devendo para isto combinar a negatividade para a proteína BCL6 e positividade para

MUM1. Casos BCL6 positivo e MUM1 negativo são classificados como perfil “centro germinativo” mesmo com CD10 negativo.

As proteínas CD10 e BCL6 têm sido tratadas como altamente específicas do estágio de diferenciação do centro germinativo. Entretanto, sua expressão não é restrita a linfomas B do centro germinativo. CD10 e BCL6 podem apresentar positividade em linfomas T (linfoblástico e angioimunoblástico), e já foram demonstradas as positivities em casos bem caracterizados de linfomas da zona marginal, considerados pós centro-germinativo (KWON et al. 2003). Falini e colaboradores demonstraram em 2000 a co-expressão de MUM1 e BCL6 em cerca de 50% dos casos de LDGCB. A identificação de um perfil do centro germinativo baseado na positividade de CD10 e BCL6 deve ser cuidadosa. REE et al. (1999 e 2001) e DOGAN et al. (2000) caracterizaram os padrões de positividade do BCL6 em linfonodos reacionais, linfomas foliculares, linfomas difusos de grandes células B, linfomas do manto, linfomas de Burkitt e linfomas de células T. Tomados em conjunto os dados destes trabalhos sugerem que uma identificação confiável do perfil “centro germinativo” em LDGCB depende de uma expressão combinada de CD10 e BCL6, com frequência e intensidade da reação semelhante ao centro germinativo reacional, linfoma folicular ou linfoma de Burkitt, isto é, marcação forte e difusa. Por outro lado a expressão de MUM1 é muito mais restrita a linfócitos ativados (das linhagens B e T), não sendo expressos nas etapas iniciais da maturação no centro germinativo. Pelo discutido, julgamos inapropriado o uso do CD10 como a proteína mais importante no algoritmo para classificação molecular

dos LDGCB segundo o perfil ontogenético. O uso do MUM1 nesta posição de destaque no algoritmo é mais racional. Mesmo assim, durante a análise estatística fizemos simulações com o algoritmo descrito por HANS et al. (2004) que não mostraram melhores resultados.

Cento e quatro casos foram informativos para a expressão de CD10: negativo em 82 (78.8%), fraco em 8 (7.7%), moderado em 9 (8.7%) e forte em 5 (4.8%). Percebemos uma melhor SCE-5 para os pacientes CD10 positivos embora em um nível estatisticamente não significativo ($p=0,155$). Observamos também a co-expressão de CD10/BCL6 e MUM1 em 29 pacientes, em consonância com a observação de SAEZ et al. (2004), mostrando que no LDGCB pode não preservar o padrão de diferenciação do linfócito normal e a célula tumoral ter uma vantagem extra pela co-expressão destas moléculas. Pelo algoritmo de HANS et al. (2004) um caso CD10 e MUM1 positivos, seria classificado como centro germinativo, a despeito da evidência de ativação.

Observamos uma proporção maior do que esperada de casos BCL6 negativo e marcações fracas mesmo após a repetição e variação dos protocolos em duas instituições diferentes com anticorpos policlonais e monoclonais. Diante da dificuldade local, enviamos lâminas para o preparo das reações no laboratório do Instituto Português de Oncologia em Lisboa, sob os cuidados do Dr. Jose Cabeçadas, que exibiu publicamente e afirmou ter bons resultados com este anticorpo. Noventa e dois casos foram informativos e os resultados foram: 69 negativos, 11 fracos (1+), 16 moderados (2+) e apenas 3 fortes (3+). A presença de alguns poucos casos

com coloração forte atesta a fidelidade dos reagentes utilizados. Também não observamos uma coloração inespecífica de fundo significativa.

Nenhuma diferença estatística significativa foi observada na SCE-5 entre estes grupos BCL6 positivo e BCL6 negativo ($p=0.706$). A maioria dos estudos aponta o BCL6 como um fator associado a evolução favorável mas é possível também encontrar estudos antigos e recentes onde o BCL6 não esteve associado a um melhor prognóstico, ou mesmo esteve associado a um pior prognóstico, seja pela pesquisa da translocação como pela pesquisa da expressão protéica (PESCARMONA et al. 1997; KRAMER et al. 1998; BARRANS et al. 2002; COLOMO et al. 2003; CHANG et al. 2004; HANS et al. 2004; LOSSOS et al. 2004; OHNO, 2004; DE PAEPE et al. 2005; VAN IMHOFF et al. 2006).

Por outro lado, a proteína BCL6 tem um papel importante na classificação molecular proposta atualmente baseada na ontogênese do linfócito. A escassez de casos BCL6+ ajudou a distorcer a proporção de casos com perfil “centro germinativo” versus perfil “linfócito ativado” e pode ter contribuído para a irrelevância estatística que observamos para esta classificação nesta amostra. Consideramos que há uma importante dificuldade operacional com anticorpo BCL6 e portanto este anticorpo não deveria fazer parte do painel a ser utilizado rotineiramente para avaliação prognóstica/preditiva dos LDGCB.

COLOMO et al. (2003) concluíram que o perfil de diferenciação “centro germinativo” esteve associado com características particulares mas não com uma melhor sobrevida.

Usando arrays de oligonucleotídeos SHIPP et al. (2002) foram capazes de identificar os subtipos LDGCB-CG e LDGCB-A mas não encontraram correlação com a evolução dos pacientes. Por outro lado, identificaram outros 3 genes (NOR1, PDE4B and PKC- β) com funções relacionadas a apoptose, ciclo celular e resposta linfóide após estimulação do receptor de células B associados a evolução clínica.

Na nossa casuística identificamos pela análise univariada proteínas de diferentes funções celulares associadas com a evolução dos pacientes quando categorizadas em “negativo” e “positivo”: ciclina B1 ($p=0,002$), ciclina G1 ($p=0,021$), p53 ($p=0,024$), NF- κ B ($p=0,044$) e OCT-2 ($p=0,009$). A ciclina B1, embora tenha demonstrado relevância estatística apresenta apenas dois indivíduos no grupo “negativo” e oitenta e cinco indivíduos no grupo “positivo” configurando portanto um resultado com poder estatístico muito pequeno. SAEZ et al. publicaram em 2004 um modelo multivariado para prever a evolução, construído através da pesquisa imunohistoquímica de 52 proteínas em TMA contendo biópsias de 152 pacientes. Apesar da aparente semelhança no design do estudo estes autores usaram variados pontos de corte para a positividade de cada anticorpo o que dificultou uma análise comparativa dos resultados finais. Ainda assim, alguns paralelos puderam ser traçados entre os dois estudos. Neste referido estudo, também não foi possível estabelecer correlação entre as variáveis moleculares consideradas úteis para a construção do modelo e a classificação molecular proposta por ROSENWALD et al. (2003)

A proteína OCT2 foi detectada na grande maioria dos casos,

entretanto, sua negatividade esteve fortemente associada com uma evolução desfavorável ($p=0,009$).

OCT2 é um potente ativador da transcrição dos genes das imunoglobulinas. Aparentemente OCT2 é necessária quando as células B são induzidas a diferenciar em células secretoras de anticorpos porque o seu silenciamento afeta dramaticamente a diferenciação terminal do linfócito B. Além disto, OCT2 é essencial para uma resposta proliferativa a estímulos policlonais (CORCORAN e KARVELAS 1994) Neste processo OCT2 atua na fase precoce de ativação de G1, durante a qual as células B se comprometem a progredir no ciclo celular e dividir.

Em resumo, das proteínas relacionadas à diferenciação do linfócito apenas a OCT2 se correlacionou com a evolução dos pacientes. Outros fatores de transcrição de imunoglobulinas já se mostraram estatisticamente significantes para a evolução clínica de linfomas não-Hodgkin (TORLAKOVIC et al. 2006).

Quanto a expressão protéica relacionada a apoptose observamos que há uma expressão freqüente de proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas, com variável intensidade e em sua maioria sem uma correlação com o comportamento biológico do linfoma após o tratamento quimioterápico. Três proteínas relacionadas a apoptose mostraram alguma relevância estatística (p53, NF- κ B e bcl2) embora com um papel secundário ao IPI. A expressão das proteínas p53 e NF- κ B mostraram significância estatística na análise univariada, ambos associados com evolução desfavorável, possivelmente relacionados a um aumento da resistência a apoptose pós-quimioterapia

($p=0,024$ e $p=0,044$, respectivamente). A expressão da proteína BCL2 mostrou uma associação com a evolução desfavorável quanto a SCE-5 nos pacientes com IPI de baixo risco ($p=0,029$) e na sobrevida livre de doença ($p=0,028$). De fato, a proteína BCL2 há muito tem sido considerada um poderoso preditor do comportamento biológico dos LDGCB e em alguns estudos foi considerada entre as proteínas mais importantes para a elaboração de algoritmos para a classificação molecular ao lado do CD10 ou MUM1. (BIASOLI et al. 2005; BARRANS et al. 2002; MURRIS et al. 2006)

O gene TP53 estimula a transcrição dos genes relacionados à apoptose e ao ciclo celular em resposta a uma grande variedade de estímulos tóxicos e oncogênicos, dependendo do contexto biológico de cada célula. O gene TP53 está frequentemente mutado nas neoplasias humanas incluindo os linfomas não-Hodgkin. A hiperexpressão da proteína p53 tem sido relacionada com agressividade clínica e resistência a quimioterapia nos LDGCB, como um fator independente em algumas séries (FARRUGIA et al. 1994; PIRIS et al. 1994; ICHIKAWA et al. 1997; KODURU et al. 1997; WILSON et al. 1997; MOLLER et al. 1999; SANCHEZ-BEATO et al. 2001).

Além disto o status do p53 é considerado um fator prognóstico bem estabelecido nos LDGCB pelo livro da OMS 2001 (GATTER E WARNKE 2001). A expressão protéica detectada por imunistoquímica não se correlaciona exatamente com a presença da mutação do gene, mas existem outras maneiras de inativação do p53 como por exemplo pela hiperexpressão da proteína moduladora MDM2. Pelo seu aspecto prático a imunistoquímica é o método mais usado na rotina para a detecção da

anormalidade deste gene.

A via do Fator Nuclear κ B (NF- κ B; do inglês Nuclear Factor κ B) regula a sobrevivência de células normais e neoplásicas através do controle da expressão de genes envolvidos na morte celular através das vias intrínseca e extrínseca da apoptose. Heterodímeros inativos (p50 e cREL, RELA, RELB e outros) do NF- κ B existem no citoplasma sobre o controle do seu inibidor (I κ B). Em resposta a estímulos diversos o I κ B é fosforilado, se desliga dos heterodímeros que ativados migram para o núcleo onde induzem a transcrição dos genes alvo. Estudos prévios já relacionaram a via do NF- κ B com a sobrevivência dos LDGCB e níveis maiores de ativação da via NF- κ B foram descritas no LDGCB-A (KUPPERS et al. 1999; DAVIS et al. 2001). FEUERHAKE et al. (2005) descreveram uma maior concentração de cREL no citoplasma dos LDGCB-CG mas este dado não se correlacionou com a ativação da via NF- κ B. Ao contrário muitos dos seus alvos como IRF-4(MUM1), BCL2 e ciclina D2 apresentavam altos níveis nos LDGCB-A.

Nossos resultados da análise univariada mostram uma significância estatística para a pior SCE-5 observada nos pacientes com positividade imunohistoquímica do NF- κ B (c-REL) ($p=0.044$) e provavelmente este achado está relacionado a uma maior resistência a apoptose pós-quimioterapia.

Quanto ao ciclo celular também observamos uma grande variação na expressão das proteínas estimuladoras e reguladoras. Destacamos a associação da expressão da ciclina G1 com evolução favorável. A ciclina B1 também exibiu uma diferença estatisticamente significativa mas os casos negativos (associados com prognóstico desfavorável) foram tão incomuns

que o poder estatístico desta informação é muito pequeno. A ciclina A1 esteve expressa em todos os casos e ciclina E foi negativa em todos os casos. Os LNH são divididos em indolentes (baixa fração proliferativa) e agressivos (alta fração proliferativa), ressaltando a importância desta função celular no comportamento biológico desta neoplasia. Os linfomas agressivos, onde se incluem os LDGCB, contam com alterações nas mais diversas etapas do ciclo celular.

Segundo revisto por SHERR em 2000 na transição G1-S três vias estão envolvidas e alteradas em virtualmente 100% dos linfomas agressivos: a) p16-ciclinaD-CDK4-pRb, b) p14-MDM2-p53-p21 e c) p27-ciclinaE-CDK2.

As proteínas reguladoras do ciclo celular também exibiram uma expressão variável. A proteína p16, relacionada com a inibição da CDK4, que se liga à ciclina D, não foi detectada em cerca de 90% dos casos e quando expressa tem intensidade fraca, sugerindo sua inativação. Esta negatividade para a proteína p16 nos linfomas é exclusiva para os subtipos agressivos e tem sido implicada na transformação de linfomas indolentes (L. Folicular, L. MALT) em LDGCB (VILLUENDAS et al. 1998). A proteína Rb, cuja perda de expressão já foi descrita como um fator prognóstico relevante nos LDGCB (SANCHEZ et al. 1998), foi positiva cerca de 80% dos casos, sem nenhuma associação com a evolução clínica.

A proteína p27, inibidora da CDK2, que se liga à ciclina E, não foi detectada em cerca de 70% dos casos e a ciclina E foi negativa em todos os casos. Na casuística de SAEZ et al. (2004) entretanto, a ciclina E hiperexpressa foi um importante fator preditor de evolução clínica com risco

relativo de 3,3. A proteína p21, com funções muito semelhantes às aquelas descritas para a p27 apresentava expressão quase oposta, com cerca de 80% dos casos mostrando alguma positividade.

Quanto a expressão proteica dos outros fatores transcricionais observamos uma expressão freqüente das proteínas STAT1 e STAT2 e uma expressão infrequente para as proteínas cJUN e JUNd, sendo que a positividade para STAT1 e cJUN estiveram associadas com o IPI de baixo risco ($p=0,017$ e $p=0,041$, respectivamente).

cJun, JunD e cFos fazem parte de um complexo molecular ativador transcricional (AP-1) de genes envolvidos com a resposta ao stress oxidativo, regulando diversas funções celulares, como a apoptose, o ciclo celular e a diferenciação. Especificamente nos linfomas estas proteínas já foram relacionadas à sensibilização da célula tumoral à apoptose mediada pelo anticorpo monoclonal anti-CD20 Rituximab e a melhor resposta ao inibidor de protease Bortezomib (CITTERA et al. 2005; SHRINGARPURE et al. 2006). Esta ação depende de uma interação com outros fatores de transcrição, especificamente o STAT-1, o NF- κ B e OCT2 (DE GRAZIA et al. 1994; XU et al. 2003; JAZIREHI e BONAVIDA 2005).

STAT1 é uma proteína latente do citoplasma que serve a vias de sinalização como transdutor do sinal e ativador da transcrição em resposta a diferentes citocinas incluindo IFN- α,β (DARNELL et al. 1994; BRISCOE et al. 1996a e b; IHLE 1996; DARNELL 1997; BOWMAN et al. 2000; BRIVANLOU e DARNELL 2002). Já se demonstrou o papel crucial do STAT1 na modulação dos *checkpoints* do ciclo celular após lesões no DNA, durante a

parada do ciclo celular e apoptose, pela ativação da proteína p21 e modulação da via ATM-Chk2-p53 (CHIN et al. 1996; TOWNSEND et al. 2004; TOWNSEND et al. 2005). A inibição da ativação da STAT1 por antagonistas farmacológicos pode evitar a parada do ciclo celular das células dos linfomas sensíveis to IFN- α e grandes diferenças na duração da ativação da STAT1 entre as linhagens malignas sensíveis e resistentes a quimioterapia (BROMBERG et al. 1996; GRIMLEY et al. 1998; KAPLAN et al. 1998). Assim estas duas proteínas associadas com IPI de baixo grau podem pelo menos em parte explicar a boa resposta destes pacientes ao tratamento quimioterápico padrão.

Considerando a complexidade patogénica dos LDGCB seria mais racional para uma classificação molecular o uso de moléculas envolvidas nas diversas funções celulares do que apenas a diferenciação linfocitária. Nosso estudo aponta proteínas relacionadas com a diferenciação (OCT2), com a apoptose (p53 e NF- κ B), com o ciclo celular (ciclina G1) com papel relevante na sobrevida dos pacientes com LDGCB após tratamento com quimioterapia. Todas estas variáveis apresentaram um papel secundário em relação ao IPI. O IPI é um índice clínico de grande valor preditivo. Isto não nos surpreende uma vez que o estágio clínico do paciente ou o tamanho e disseminação tumoral são em última análise a resultante de todas as vias metabólicas hiper e hipo-funcionantes. Dificilmente uma única via metabólica ou um único marcador tumoral conseguirá identificar todos os pacientes de pior ou melhor prognóstico. Por outro lado, embora o IPI forneça boas informações sobre os qual paciente tem maior ou menor chance de cura

com a quimioterapia, não temos através dele nenhuma idéia específica sobre a biologia da célula tumoral, alvos terapêuticos ou estratégias de quimioterapia individualizadas. Neste estudo identificamos moléculas associadas com o IPI de baixo risco com plausibilidade biológica para este fenômeno, o que abre espaço para novas investigações neste campo a fim de se estabelecer terapêuticas individualizadas para os pacientes de baixo risco e alto risco.

Consideramos que há proteínas do ciclo celular, da apoptose e multifuncionais como a p53 que já foram suficientemente estudadas e validadas como fatores prognósticos e poderiam compor o painel fenotípico para classificação dos LDGCB de forma mais racional do que aquele baseado apenas na diferenciação do linfócito. Há de se levar em consideração também que os anticorpos a serem incluídos no painel desta classificação molecular devem ser tecnicamente reprodutíveis, de fácil interpretação, sob o risco de se criar uma classificação com pouca aplicabilidade clínica. Por este motivo, desaconselhamos o uso dos anticorpos bcl6 atualmente disponíveis para este painel preditivo.

Elaboramos um algoritmo molecular alternativo contendo elementos de múltiplas vias celulares (apoptose, ciclo celular, diferenciação linfocitária) para avaliar sua utilidade como fator preditivo nos LDGCB. Neste algoritmo a diferenciação linfocitária está contemplada pela proteína OCT2 e tem um papel de destaque. Além desta, a negatividade para proteína p53 ajuda a identificar os pacientes com maior chance de evolução favorável.

Ainda é precoce a incorporação na rotina da classificação molecular

dos linfomas principalmente por falta de validação suficiente. Embora os estudos publicados até aqui sejam animadores há uma grande variação nas etapas de seleção dos pacientes, tipo de espécime e metodologias aplicadas, protocolos, tratamentos e análise estatística. Há uma necessidade de estudos prospectivos com metodologias reprodutíveis e métodos estatísticos robustos, com validações em séries independentes antes de se por em rotina estes modelos preditivos.

Soma-se a isto o fato dos pacientes estarem sendo submetidos recentemente a tratamentos com anticorpos monoclonais (Rituximab) em associação ao esquema tradicional CHOP (R-CHOP). A maioria dos estudos já feitos são retrospectivos e incluem pacientes da era pré-Rituximab. Além disto, conhecer os mecanismos pelos quais as novas modalidades terapêuticas são eficazes, como as vias relacionadas com a inibição do CD20 e a inibição do proteassoma podem nos fazer repensar a melhor maneira de classificar os LDGCB segundo a resposta a terapias específicas.

6 CONCLUSÕES

1. Sobre o padrão de expressão protéica dos LDGCB diagnosticados no Hospital do Câncer A.C. Camargo entre 1980 e 2001:
 - a. Proteínas da Apoptose: analisadas em conjunto, as proteínas relacionadas a apoptose, seja com função pró-apotótica ou anti-apotótica, estão frequentemente expressas nos LDGCB, com intensidade variável e em sua maioria sem relação significativa com o comportamento biológico do linfoma após o tratamento quimioterápico. As exceções são a proteína p53 e a proteína BCL2 que apresentaram uma relevância estatística dependente do IPI em situações específicas. A proteína BCL2 está associada a um pior prognóstico dos pacientes com IPI de baixo risco e na sobrevida livre de doença, enquanto a expressão proteína p53, conjugada com a perda da expressão do fator de transcrição da diferenciação linfocitária OCT2 identifica bem os pacientes com maior chance de evolução desfavorável.
 - b. As proteínas do ciclo celular mais frequentemente expressas foram as ciclinas A, B1 e G1, esta última associada com evolução favorável pela análise univariada. A ciclina E foi negativa em todos os casos e a ciclina D1 foi positiva em raros casos, sem associação com a evolução. Os inibidores de

CDK's p16 e p21 mostraram-se negativos em 90% e 70% respectivamente, enquanto a p27 mostrou-se positiva em 80% dos casos, todos sem associação com a evolução clínica pós-tratamento.

c. As proteínas relacionadas com resposta à citocinas e metabolismo oxidativo STAT-1, STAT2, NF-kB, JUNd e OCT2 mostraram-se positivos em mais de 75% dos casos. CJUN esteve expresso em 60% dos casos. A expressão da proteína STAT1 e cJUN estiveram associadas ao IPI de baixo risco e a perda da expressão da proteína OCT-2 esteve associada com evolução desfavorável.

2. A classificação dos LDGCB segundo a ontogênese do linfócito B (centro germinativo versus células ativadas): não observamos significado estatístico na população estudada. Existem problemas técnicos com a pesquisa da proteína BCL6 que impactam na reprodutibilidade desta classificação. Nenhuma variável molecular isolada teve papel independente do IPI e remissão completa.

3. Elaboração de um painel útil na avaliação rotineira dos pacientes portadores de LDGCB: os anticorpos OCT2 e p53 são de fácil interpretação e podem compor o painel molecular para avaliação preditiva do LDGCB, como representantes da diferenciação linfocitária e apoptose/ciclo celular respectivamente. A proteína BCL2 é útil no refinamento desta informação, com um papel adverso na SCE-5 e sobrevida livre de doença.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, o estudo de perfis moleculares definitivamente mudou a forma de abordagem para a classificação das neoplasias e identificou uma série de possíveis biomarcadores ou modelos preditivos da sobrevida nos LDGCB. O potencial para estes fatores prognósticos e preditivos é enorme e possivelmente, os modelos preditivos moleculares associados à variáveis clínicas, farão parte da rotina em breve. Entretanto, a melhor forma de usar este conhecimento nos LDGCB ainda não está clara. OCT2 e p53 são marcadores imunoistoquímicos de fácil interpretação e estiveram relacionados com o desfecho dos pacientes após o tratamento quimioterápico padrão. STAT-1 e cJUN são fatores de transcrição em resposta a citocinas e sua positividade se relacionou com IPI de baixo risco, expondo uma nova área de investigação para a elaboração de terapias moleculares. BCL2 mostrou-se uma fator de pior prognóstico tanto para SCE-5 quanto para sobrevida livre de doença com um papel dependente de variáveis clínicas. Estes resultados reforçam a hipótese que os LDGCB tem uma patogênese complexa e um sistema que aborde as diversas vias funcionais pode ser uma maneira mais racional de se classificar esta neoplasia. Além disto vários dos fatores de transcrição clinicamente relevantes por este estudo são alvo de terapias específicas e podem oferecer opções terapêuticas para os pacientes portadores de LDGCB (HEMANN et al. 2004; CHUNG e KIM 2005; HARTMAN et al. 2005)

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

Armitage JO. Clinical relevance of the revised European-American Classification of Non-Hodgkin's Lymphomas. In: Knowles DM, editor. **Neoplastic hematopathology**. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p.755-771.

Bai M, Skyras A, Agnantis NJ, et al. Diffuse large B-cell lymphomas with germinal center B-cell-like differentiation immunophenotypic profile are associated with high apoptotic index high expression of the proapoptotic proteins bax bak and bid and low expression of the antiapoptotic protein bcl-xl. **Mod Pathol** 2004; 17:847-56.

Barrans SL, O'Connor SJ, Evans PA, et al. Rearrangement of the BCL6 locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. **Br J Haematol** 2002; 117:322-32.

Barrans SL, Carter I, Owen RG, Davies FE, Patmore RD, Haynes AP, Morgan GJ, Jack AS. Germinal center phenotype and bcl-2 expression combined with the International Prognostic Index improves patient risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma. **Blood** 2002; 199:1136-43.

Biasoli I, Morais JC, Jesus PS, Pulcheri W, Nucci M, Spector N. Application of an adapted international prognostic index for aggressive non-Hodgkin's

lymphomas: Good discrimination and lower survival rates in Rio de Janeiro Brazil. **Oncol Rep** 2000; 8:41-44.

Biasoli I, Morais JC, Scheliga A, Milito CB, Romano S, Land M, Pulcheri W, Spector N. CD10 and Bcl-2 expression combined with the International Prognostic Index can identify subgroups of patients with diffuse large-cell lymphoma with very good or very poor prognoses. **Histopathology** 2005 Mar;46(3):328-33.

Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. **Oncogene** 2000; 19:2474-88.

Briscoe J, Guschin D, Rogers NC, et al. JAKs STATs and signal transduction in response to the interferons and other cytokines. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 1996a; 351:167-71.

Briscoe J, Kohlhuber F, Muller M. JAKs and STATs branch out. **Trends Cell Biol** 1996b; 6:336-40.

Brivanlou AH, Darnell JE Jr. Signal transduction and the control of gene expression. **Science** 2002; 295:813-8.

Bromberg JF, Horvath CM, Wen Z, Schreiber RD, Darnell JE Jr. Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1996; 93:7673-8.

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

Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. **Lab Invest** 2000; 80:1943-9.

Chang CC, McClintock S, Cleveland RP, et al. Immunohistochemical expression patterns of germinal center and activation B-cell markers correlate with prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. **Am J Surg Pathol** 2004; 28:464-70.

Chin YE, Kitagawa M, Su WC, You ZH, Iwamoto Y, Fu XY. Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. **Science** 1996; 272:719-22.

Chung YJ, Kim JW. Novel oncogene HCCR: its diagnostic and therapeutic implications for cancer. **Histol Histopathol** 2005; 20:999-1003.

Cittera E, Onofri C, D'Apolito M, et al. Rituximab induces different but overlapping sets of genes in human B-lymphoma cell lines. **Cancer Immunol Immunother** 2005; 54:273-86.

Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. **N Engl J Med** 2002; 346:235-42.

Coiffier B. Immunochemotherapy: the new standard in aggressive non-Hodgkin's lymphoma in the elderly. **Semin Oncol** 2003; 30(1 Suppl 2):21-7.

Coiffier B. State-of-the-art therapeutics: diffuse large B-cell lymphoma. **J Clin Oncol** 2005; 23:6387-93.

Coiffier B, Reyes F. Best treatment of aggressive non-Hodgkin's lymphoma: a French perspective. **Oncology (Williston Park)** 2005; 19(4 Suppl 1):7-15.

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

Corcoran LM, Karvelas M. Oct-2 is required early in T cell-independent B cell activation for G1 progression and for proliferation. **Immunity** 1994; 1:635-45.

Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. **Science** 1994; 264:1415-21.

Darnell JE Jr. STATs and gene regulation. **Science** 1997; 277:1630-5.

Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. **J Exp Med** 2001; 194:1861-74.

de Grazia U, Felli MP, Vacca A, et al. Positive and negative regulation of the composite octamer motif of the interleukin 2 enhancer by AP-1 Oct-2 and retinoic acid receptor. **J Exp Med** 1994; 180:1485-97.

De Paepe P, Achten R, Verhoef G, et al. Large cleaved and immunoblastic lymphoma may represent two distinct clinicopathologic entities within the group of diffuse large B-cell lymphomas. **J Clin Oncol** 2005; 23:7060-8.

Dogan A, Bagdi E, Munson P, Isaacson PG. CD10 and BCL-6 expression in paraffin sections of normal lymphoid tissue and B-cell lymphomas. **Am J Surg Pathol** 2000; 24:846-52.

Du M, Peng H, Singh N, Isaacson PG, Pan L. The accumulation of p53 abnormalities is associated with progression of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. **Blood** 1995; 86:4587-93.

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

Farrugia MM, Duan LJ, Reis MD, Ngan BY, Berinstein NL. Alterations of the p53 tumor suppressor gene in diffuse large cell lymphomas with translocations of the c-MYC and BCL-2 proto-oncogenes. **Blood** 1994; 83:191-8.

Feuerhake F, Kutok JL, Monti S, et al. NFkappaB activity function and target-gene signatures in primary mediastinal large B-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma subtypes. **Blood** 2005; 106:1392-9.

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

Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, et al. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. **Blood** 1997; 90:244-51.

Gatter KC, Warnke RA. Diffuse large B-cell lymphoma. In: Jaffe ES, Harris NL HS, Stein H, Vardiman JW. **Pathology and genetics of haematopoietic and lymphoid tissues**. Lyon: IARC Press; 2001. p.171-4. (World Health Organization Classification of Tumours, 3).

Grimley PM, Fang H, Rui H, et al. Prolonged STAT1 activation related to the growth arrest of malignant lymphoma cells by interferon-alpha. **Blood** 1998; 91:3017-27.

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

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

Hartman SE, Bertone P, Nath AK, et al. Global changes in STAT target selection and transcription regulation upon interferon treatments. **Genes Dev** 2005; 19:2953-68.

Hemann MT, Zilfou JT, Zhao Z, Burgess DJ, Hannon GJ, Lowe SW. Suppression of tumorigenesis by the p53 target PUMA. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2004; 101:9333-8.

Hill ME, MacLennan KA, Cunningham DC, et al. Prognostic significance of BCL-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. **Blood** 1996; 88:1046-51.

Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. **Lab Invest** 2001; 81:1331-8.

Ichikawa A, Kinoshita T, Watanabe T, et al. Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. **N Engl J Med** 1997; 337:529-34.

Ihle JN. STATs: signal transducers and activators of transcription. **Cell** 1996; 84:331-4.

Iqbal J, Sanger WG, Horsman DE, et al. BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. **Am J Pathol** 2004; 165:159-66.

Jacobson JO, Wilkes BM, Kwaiatkowski DJ, Medeiros LJ, Aisenberg AC, Harris NL. bcl-2 rearrangements in de novo diffuse large cell lymphoma. Association with distinctive clinical features. **Cancer** 1993; 72:231-6.

Jaffe ES, Harris NL HS, Stein H, Vardiman JW. **Pathology and genetics of haematopoietic and lymphoid tissues**. Lyon: IARC Press; 2001. Summary of the WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues; p.10-1. (World Health Organization Classification of Tumours, 3).

Jazirehi AR, Bonavida B. Cellular and molecular signal transduction pathways modulated by rituximab (rituxan anti-CD20 mAb) in non-Hodgkin's lymphoma: implications in chemosensitization and therapeutic intervention. **Oncogene** 2005; 24:2121-43.

Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, et al. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95:7556-61.

Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:301-10.

Koduru PR, Raju K, Vadmal V, et al. Correlation between mutation in P53 p53 expression cytogenetics histologic type and survival in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. **Blood** 1997; 90:4078-91.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nat Med** 1998; 4:844-7.

Kramer MH, Hermans J, Parker J, et al. Clinical significance of bcl2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. **J Clin Oncol** 1996; 14:2131-8.

Kramer MH, Hermans J, Wijburg E, et al. Clinical relevance of BCL2 BCL6 and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. **Blood** 1998; 92:3152-62.

Kuppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. **N Engl J Med** 1999; 341:1520-9.

Kuppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:251-62.

Kwon MS, Go JH, Choi JS, et al. Critical evaluation of Bcl-6 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma of the stomach and small intestine. **Am J Surg Pathol** 2003; 27:790-8.

Lennert K. [Pathologico-anatomical classification of malignant lymphoma]. **Strahlentherapie (Sonderb)** 1969; 69:1-7.

Lloyd RV, Erickson LA, Jin L, et al. p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. **Am J Pathol** 1999; 154:313-23.

Lossos IS, Jones CD, Warnke R, et al. Expression of a single gene BCL-6 strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. **Blood** 2001; 98:945-51.

Lossos IS, Czerwinski DK, Alizadeh AA, et al. Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. **N Engl J Med** 2004; 350:1828-37.

Lossos IS. Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. **J Clin Oncol** 2005; 23:6351-7.

Lossos IS, Morgensztern D. Prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma. **J Clin Oncol** 2006; 24:995-1007.

Lu X, Nechushtan H, Ding F, et al. Distinct IL-4-induced gene expression proliferation and intracellular signaling in germinal center B-cell-like and activated B-cell-like diffuse large-cell lymphomas. **Blood** 2005; 105:2924-32.

Lukes RJ, Collins RD. New approaches to the classification of the lymphomata. **Br J Cancer** 1975; 31 Suppl 2:1-28.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Distribuição da incidência de Linfoma não-Hodgkin segundo o RCBP e período de referência dos dados.** Disponível em: URL: <http://www.inca.gov.br/regpop/2003/index.asp?link=localizacoes.asp&ID=8>. [2006 jun12]

Mircean C, Tabus I, Kobayashi T, et al. Pathway analysis of informative genes from microarray data reveals that metabolism and signal transduction genes distinguish different subtypes of lymphomas. **Int J Oncol** 2004; 24:497-504.

Moller MB, Ino Y, Gerdes AM, Skjodt K, Louis DN, Pedersen NT. Aberrations of the p53 pathway components p53 MDM2 and CDKN2A appear independent in diffuse large B cell lymphoma. **Leukemia** 1999; 13:453-9.

Moller MB, Nielsen O, Pedersen NT. Frequent alteration of MDM2 and p53 in the molecular progression of recurring non-Hodgkin's lymphoma. **Histopathology** 2002; 41:322-30.

Monni O, Joensuu H, Franssila K, Klefstrom J, Alitalo K, Knuutila S. BCL2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma. **Blood** 1997; 90:1168-74.

Monti S, Savage KJ, Kutok JL, et al. Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. **Blood** 2005; 105:1851-61.

Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, et al. Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2--associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). **Blood** 2003; 101:4279-84.

Mucci NR, Akdas G, Manely S, Rubin MA. Neuroendocrine expression in metastatic prostate cancer: evaluation of high throughput tissue microarrays to detect heterogeneous protein expression. **Hum Pathol** 2000; 31:406-14.

[NCI] National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. **Cancer** 1982; 49:2112-35.

Muris JJ, Meijer CJ, Vos W, van Krieken JH, Jiwa NM, Ossenkoppele GJ, Oudejans JJ. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. **J Pathol.** 2006 Apr; 208:714-23.

[NCI] National Cancer Institute. **Cancer Statistics Fact Sheets - Non-Hodgkin Lymphoma.** Available from: <URL: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/nhl.html>> [2006 jun 12].

Nishiu M, Yanagawa R, Nakatsuka S, et al. Microarray analysis of gene-expression profiles in diffuse large B-cell lymphoma: identification of genes related to disease progression. **Jpn J Cancer Res** 2002; 93:894-901.

Offit K, Louie DC, Parsa NZ, et al. Clinical and morphologic features of B-cell small lymphocytic lymphoma with del(6)(q21q23). **Blood** 1994; 83:2611-8.

Ohno H. Pathogenetic role of BCL6 translocation in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. **Histol Histopathol** 2004; 19:637-50.

Oppezio P, Magnac C, Bianchi S, et al. Do CLL B cells correspond to naive or memory B-lymphocytes? Evidence for an active Ig switch unrelated to phenotype expression and Ig mutational pattern in B-CLL cells. **Leukemia** 2002; 16:2438-46.

Pasqualucci L, Migliazza A, Fracchiolla N, et al. BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95:11816-21.

Pescarmona E, De Sanctis V, Pistilli A, et al. Pathogenetic and clinical implications of Bcl-6 and Bcl-2 gene configuration in nodal diffuse large B-cell lymphomas. **J Pathol** 1997; 183:281-6.

Pileri SA, Dirnhofer S, Went P, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: one or more entities? Present controversies and possible tools for its subclassification. **Histopathology** 2002; 41:482-509.

Piris MA, Pezzella F, Martinez-Montero JC, et al. p53 and bcl-2 expression in high-grade B-cell lymphomas: correlation with survival time. **Br J Cancer** 1994; 69:337-41.

Quintanilla-Martinez L, Thieblemont C, Fend F, et al. Mantle cell lymphomas lack expression of p27Kip1 a cyclin-dependent kinase inhibitor. **Am J Pathol** 1998; 153:175-82.

Rappaport H. [New concepts in the classification of malignant hemopathies]. **Bull Cancer** 1974; 61:11-22.

Ree HJ, Kadin ME, Kikuchi M, Ko YH, Suzumiya J, Go JH. Bcl-6 expression in reactive follicular hyperplasia follicular lymphoma and angioimmunoblastic T-cell lymphoma with hyperplastic germinal centers: heterogeneity of intrafollicular T-cells and their altered distribution in the pathogenesis of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. **Hum Pathol** 1999; 30:403-11.

Ree HJ, Yang WI, Kim CW, et al. Coexpression of Bcl-6 and CD10 in diffuse large B-cell lymphomas: significance of Bcl-6 expression patterns in identifying germinal center B-cell lymphoma. **Hum Pathol** 2001; 32:954-62.

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

Saez A, Sanchez E, Sanchez-Beato M, et al. p27KIP1 is abnormally expressed in diffuse large B-cell Lymphomas and is associated with an adverse clinical outcome. **Br J Cancer** 1999; 80:1427-34.

Saez AI, Saez AJ, Artiga MJ, et al. Building an outcome predictor model for diffuse large B-cell lymphoma. **Am J Pathol** 2004; 164:613-22.

Sanchez E, Chacon I, Plaza MM, et al. Clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma is dependent on the relationship between different cell-cycle regulator proteins. **J Clin Oncol** 1998; 16:1931-9.

Sanchez-Beato M, Camacho FI, Martinez-Montero JC, et al. Anomalous high p27/KIP1 expression in a subset of aggressive B-cell lymphomas is associated with cyclin D3 overexpression. p27/KIP1-cyclin D3 colocalization in tumor cells. **Blood** 1999; 94:765-72.

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

Sander CA, Yano T, Clark HM, Harris C, Longo DL, Jaffe ES, Raffeld M. p53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas. **Blood** 1993; 82:1994-2004.

Sauter G, Mirlacher M. Tissue microarrays for predictive molecular pathology. **J Clin Pathol** 2002; 55:575-6.

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

Shen HM, Peters A, Baron B, Zhu X, Storb U. Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. **Science** 1998; 280:1750-2.

Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. **Cancer Res** 2000; 60:3689-95.

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

Shringarpure R, Catley L, Bhole D, et al. Gene expression analysis of B-lymphoma cells resistant and sensitive to bortezomib. **Br J Haematol** 2006; 134:145-56.

Tilly H, Lepage E, Coiffier B, et al. Intensive conventional chemotherapy (ACVBP regimen) compared with standard CHOP for poor-prognosis aggressive non-Hodgkin lymphoma. **Blood** 2003; 102:4284-9.

Tome ME, Johnson DB, Rimsza LM, et al. A redox signature score identifies diffuse large B-cell lymphoma patients with a poor prognosis. **Blood** 2005; 106:3594-601

Townsend PA, Scarabelli TM, Davidson SM, Knight RA, Latchman DS, Stephanou A. STAT-1 interacts with p53 to enhance DNA damage-induced apoptosis. **J Biol Chem** 2004; 279:5811-20.

Townsend PA, Cragg MS, Davidson SM, et al. STAT-1 facilitates the ATM activated checkpoint pathway following DNA damage. **J Cell Sci** 2005; 118:1629-39.

van Imhoff GW, Boerma EJ, van der Holt B, et al. Prognostic impact of germinal center-associated proteins and chromosomal breakpoints in poor-risk diffuse large B-cell lymphoma. **J Clin Oncol** 2006; 24:4135-42.

Villuendas R, Sanchez-Beato M, Martinez JC, et al. Loss of p16/INK4A protein expression in non-Hodgkin's lymphomas is a frequent finding associated with tumor progression. **Am J Pathol** 1998; 153:887-97.

Weiss LM, Warnke RA, Sklar J, Cleary ML. Molecular analysis of the t(14,18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. **N Engl J Med** 1987; 317:1185-9.

Wiestner A, Staudt LM. Towards molecular diagnosis and targeted therapy of lymphoid malignancies. **Semin Hematol** 2003; 40:296-307.

Wilson WH, Teruya-Feldstein J, Fest T, et al. Relationship of p53 bcl-2 and tumor proliferation to clinical drug resistance in non-Hodgkin's lymphomas. **Blood** 1997; 89:601-9.

Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2003; 100:9991-6.

Xu W, Comhair SA, Zheng S, et al. STAT-1 and c-Fos interaction in nitric oxide synthase-2 gene activation. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 2003; 285:L137-48.

Yang X, Lee K, Said J, Gong X, Zhang K. Association of Ig/BCL6 translocations with germinal center B lymphocytes in human lymphoid tissues: implications for malignant transformation. **Blood** 2006; 108:2006-12.

ANEXOS

Anexo 1 - Estadiamento de Ann Arbor para Linfomas.

Estágio	Extensão do Linfoma	Sub-estágio
I	Cadeia linfonodal única	
	Localização/órgão extra-linfático único	I _E
II	<ul style="list-style-type: none"> Duas ou mais cadeias linfonodais do mesmo lado do diafragma Local/órgão extra-linfático único, localizado, com seus linfonodos regionais, ± outras cadeias do mesmo lado do diafragma 	II _E
III	<ul style="list-style-type: none"> Cadeias linfonodais em ambos os lados do diafragma ± Localização/órgão extra-linfático único Baço Ambos 	III _E III _S III _{E+S}
IV	Comprometimento difuso ou multifocal de órgão(s) extra-linfático(s) ± linfonodos(s) regional(is); órgão extra-linfático isolado e linfonodos não-regionais	
Complemento	<ul style="list-style-type: none"> Sem perda de peso/febre/sudorese Com perda de peso/febre/sudorese 	A B

São consideradas estruturas linfáticas:

1. Linfonodos
2. Anel de Waldeyer
3. Baço
4. Apêndice
5. Timo
6. Placas de Peyer

O comprometimento hepático é considerado doença extra-linfática difusa.

O comprometimento pulmonar limitado a um lobo, ou a extensão peri-hilar associada com linfadenopatia homolateral, ou derrame pleural unilateral com ou sem comprometimento pulmonar, mas com linfadenopatia hilar, é considerado como doença extra-linfática localizada.

No estadiamento patológico os seguintes sítios devem ser apontados quando biopsiados, seguidos dos sinais de + e – quando estiverem comprometidos ou livres, respectivamente:

Pulmonar *PUL ou L*

Medula *MAR ou M ou MO*

Óssea *OSS ou O*

Pleural *PLE ou P*

Hepática *HEP ou H*

Peritoneal *PER*

Cerebral *BRA ou CER*

Supra-renal *ADR*

Linfonodal *LYM ou N ou LIN*

Pele *SKI ou D ou CUT*

Outras *OTH ou OUT*

Anexo 2 - Critérios de avaliação da capacidade física do paciente (Performance Status).

Índice	Descrição da Capacidade Física
0	Atividades normais
1	Sintomático mas ambulatorial
2	Acamado em menos de 50% do tempo
3	Acamado em mais de 50% do tempo
4	Acamado permanente

1 8 7 6 9 2 .	0	1	1	0	1	.	0
1 8 9 9 3 5 .	1	1	1	1	1	1	.
1 9 0 4 6 7 .	0	0	1	0	0	0	1
1 9 0 5 6 6 .	1	1	1	1	1	1	1
1 9 2 2 2 8 1	1	1	.	1	1	1	1
1 9 2 7 7 8 .	0	1	.	1	1	1	1
1 9 3 0 1 6 .	1	1	1	1	1	1	1
1 9 4 9 7 5 .	1	1	1	1	1	1	1
1 9 5 3 8 5 .	0	1	1	0	1	1	1
1 9 6 4 5 3 .	.	1	1	1	1	1	1
2 0 1 1 6 1 .	1	1	1	1	1	1	1
2 0 2 2 7 1 .	1	1	1	1	1	1	1
2 0 2 4 0 6 .	1	1	1	1	1	1	1
2 0 3 1 3 5 .	1	1	1	0	1	1	1
2 0 4 0 3 6 .	1	1	1	1	1	1	1
2 0 5 1 9 5 .	1	1	1	1	1	.	.
2 0 8 1 5 2 .	1	1	1
2 0 9 4 6 7 .	1	1	1	1	1	1	1
2 0 9 6 8 8 .	1	1
2 1 0 3 4 6 .	1	1	1	1	1	1	1
2 1 2 8 8 5 1	0	0	0	0	0	.	.
2 1 6 7 6 6 1	1	1
2 1 8 7 5 5 .	.	1	1	1	1	1	1
2 2 1 4 4 2 .	1	1	1	1	1	1	1
2 2 3 6 7 5 .	1	1	1	1	1	.	.
2 2 3 7 1 2 .	1	1	1	1	1	1	1
2 2 4 9 3 8	1	1
2 2 8 6 3 2 .	0	1	0	0	0	1	1
2 2 9 7 2 9 .	.	1	1	1	1	.	.
2 2 9 7 3 7 .	1	1	1	1	1	1	1
2 3 4 7 0 7 .	1	1	1	1	1	1	1
2 3 4 9 6 5 .	.	1	1	1	1	1	1
2 3 5 2 4 7 .	1	1	1	1	1	1	1
2 3 6 0 9 5 .	1	1	1	1	1	1	1
2 3 7 6 6 7 .	1	1	1	1	1	1	1
2 3 8 0 7 4 .	1	1	1	1	1	1	.
2 3 8 2 7 6 1	1	1	1	1	1	1	1
2 4 1 1 2 7 1	1	1	1	1	1	1	1
2 4 1 5 4 9	1	1
2 4 8 8 2 4 .	0	0	0	0	0	0	.
2 4 8 8 3 4 .	1	1	1	1	1	1	1
2 4 9 7 6 1 .	1	1	1	1	1	1	1
2 4 9 7 9 5 .	1	1	1	.	1	1	.
2 5 1 8 2 0 .	1	1	1	1	.	.	.
2 5 3 2 0 1	0	1	1	1
2 5 4 4 3 0 .	.	1	1	1	1	1	1
2 5 4 8 4 4 .	1	1	1	1	1	1	1
2 5 5 7 4 5 .	1	1	1	1	1	1	1
2 5 6 1 0 2 .	.	1	1	1	1	1	1
2 5 6 7 1 8 .	.	1	1	1	1	1	1
2 5 6 8 5 1 .	1
2 5 7 3 6 8	1	1	1
2 5 8 3 3 0 .	1	1	1	1	1	1	1
2 5 8 5 6 5 1	1	1	1	1	1	1	1
2 6 0 3 9 2 .	.	1	1	1	1	1	1
2 6 1 7 7 4 .	.	1	1	1	1	1	1
2 6 3 0 7 3 .	1	1	1	0	1	1	1
2 6 3 2 4 0 .	.	1	1	1	1	1	1
2 6 4 1 9 0	1	1
2 6 4 3 4 4 .	1	1	.	.	0	1	1

264887	.	.	1	1	0	1	1	1
266549	.	.	1	1	1	1	1	1
266604	.	.	1	1	1	1	1	1
267260	.	.	1	1	1	1	1	1
268341	.	1	1
268362	.	.	1	1	1	1	1	1
270833	.	1	1	1
271024	.	.	1	1	1	1	1	1
271442	1	1	1	1	1	1	1	1
272710	.	.	1	1	1	1	1	1
273068	.	.	1	1	1	1	1	1
275817	.	0	0
277252	.	1	1	1	1	1	1	1
277729	.	1	1	1	1	1	1	1
278383	.	1	1	1	1	1	1	1
278505	.	.	1	.	1	1	1	1
278901	.	1	1	1	1	1	1	1
279965	.	.	1	1	1	1	1	1
280128	.	1	0	0	0	0	.	.
281564	.	1
282009
282505	.	1	1	1	1	1	1	.
283022	.	1	1	1	1	1	1	1
283121	1	1	1
283140	1	1	1	1	1	1	1	1
283215	0	0	1	1	1	.	.	.
283937	.	1	1	1	1	1	1	1
284167	.	.	.	0	0	1	1	.
284231	.	1	1	1	1	1	1	1
284301	.	1	1	0	1	1	1	1
284316	.	1
284464	.	0	0
284863	.	1	1	1	1	1	1	1
287625	.	1	1	1	1	1	1	1
287641	.	1	1	1	1	.	.	.
289271	.	1	0	0	0	.	.	.
289715	.	.	1	1	1	.	.	.
290721	.	1	1	1	1	1	1	1
291894	.	1	1	1	1	1	1	1
292283	1	1	1	1	1	1	0	1
292426	.	1	1	1	1	1	1	1
297208	1	1	1	1	1	1	1	1
297879	.	1	1	1	1	1	1	1
298102	.	1	1	1	1	1	1	1
300744	.	0
301332	.	1	1	1	0	.	.	.
301811	.	.	1	1	1	1	1	1
302216	.	1	1	0	1	1	0	0
302506	.	1	1	1	1	1	1	1
302754	.	.	1	1	1	1	1	1
303692	.	.	.	1	1	1	1	1
305238	.	1	1	1	1	1	1	1
305895	.	0	1	.	.	0	0	.
305905	.	1	1	1	1	1	1	1
307563	.	1	1	1	1	1	1	1
308149	1	1	1	1	1	1	1	1
308245	.	.	1	1	0	0	.	.
308772	1	1	1	1	1	1	0	1
309269	.	1	1	1
309975	.	.	1	1	1	1	1	1

3 1 0 0 8 6 .	.	.	1	1	1	1	1	1
3 1 3 2 2 2 .	1
3 1 4 4 3 3 .	.	.	1	1	1	1	1	1
3 1 5 9 8 7 .	1	1	1	1	1	.	.	.
3 1 7 1 2 9 .	1	1	1	1	1	1	1	1
3 1 7 8 1 2 .	.	1	1	1	1	1	1	1
3 1 8 1 0 5 .	1	1	1	1	1	1	1	1
3 1 9 2 3 6 .	1	1	1	1	1	1	1	.
3 1 9 4 0 1 .	.	1	1	1	1	1	1	1
3 2 0 3 7 5 .	1	1	1	1	1	1	1	0
3 2 1 7 1 8 .	0	.	0	0	0	0	0	.
3 2 1 7 6 2	1	1	1	1	1	1	1	1
3 2 2 2 5 9	1	1	1	1	1	1	1	1
3 2 2 3 0 5 .	1	1
3 2 3 1 0 3 .	.	.	1	1	1	1	1	1
3 2 4 2 4 3 .	.	1	1	1	1	1	1	1
3 2 5 8 8 1 .	.	1	1	1	1	1	1	1
3 2 6 4 5 7	1	1	1	1
3 2 7 2 7 1 .	.	1	1	1	1	1	1	1
3 2 7 6 8 3 .	1	1	1	1	1	.	.	.
3 2 9 5 3 5 .	1	1	1	1	1	1	1	1
3 3 0 5 7 3 .	1	1
3 3 0 7 5 5 .	1	1	1	0	0	0	0	0
3 3 3 1 6 4	1	1	1
3 3 4 1 6 9 .	.	1	1	1	1	1	1	1
3 3 4 1 8 8 .	1	1	1	.	1	1	1	1
3 3 5 3 4 5 .	1	1
3 3 5 7 7 2 .	1	1	1	0	0	0	.	.
3 3 5 9 6 0	1	0	0
3 3 6 0 6 6 .	1	1	1	1	0	0	.	.
3 3 6 3 1 6 .	.	.	1	1	1	1	1	1
3 3 6 3 5 9 .	1	1	1	1	1	1	1	1
3 3 6 8 9 8 .	1	1	1	1	1	1	1	1
3 3 7 2 1 8	1	1	1	1
3 3 7 6 9 5 .	1	1	1	1	1	1	1	1
3 3 8 0 2 1 .	.	1	1	1	1	1	1	1
3 3 9 8 7 6 .	.	1	1	1	1	1	1	1
3 4 0 3 6 6 .	1	1	1	1	1	1	1	1
3 4 0 6 6 8 .	.	1	1	1	1	1	1	1
3 4 1 0 1 6 .	1	1	1
3 4 1 1 7 4 .	1	1
3 4 1 4 1 9 .	1	1
199700809	1	1	1	1	.	1	.	.
199700849 .	1	1	1	1	1	1	1	1
199701120 .	.	0	.	1	1	1	1	1
199701701 .	1	1	1	1	1	1	1	1
199702173 .	1	1	1	1	1	.	1	1
199702202 .	1	1	1	1	1	.	.	.
199702414 .	1	1	1	1	1	1	1	1
199703826 .	1	1	1	1	1	1	1	1
199704506 .	.	.	1	1	1	1	1	1
199704670 .	.	.	0	1	0	1	1	1
199705488 .	.	.	0	.	.	1	1	1
199706242 .	1	1	1	1	1	1	1	1
199706597 .	.	.	1	1	1	1	1	1
199706658	1	1	1	1	1	1	.	.
199706790	1	.	1	1	1	1	1	1
199707356	1	.	1	1	1	1	1	.
199707538	1	1	1	1	1	1	1	1
199800218 .	.	1	1	1	1	1	1	1

199800547	1	1	1	0	0	.	.
199801341	.	1	1	1	1	1	1
199802496	.	1	1	1	1	1	1
199803746	1
199803769	.	.	1	1	1	1	1
199805570	1	1
199805890	0	1
199805940	1	0	1
199807862
199809196	.	1	1	1	1	1	1
199809748	1	1	1
199901333	1	1	1	1	1	1	1
199901525	.	1	1	1	1	1	1
199901765	.	.	1	1	1	1	1
199902006	.	1	1	1	1	1	1
199902561	.	1	1	1	1	1	1
199902578	.	1	1	1	1	1	1
199902827	1	1	1	1	1	1	1
199903034	.	.	.	1	1	1	1
199903183	1	1	1
199903364
199903441	1	1	1
199904680	.	.	.	1	1	1	1
199905615	.	.	1	1	1	1	1
199906390	0	.	1	0	1	1	1
199906660	.	0
199907562	.	1	0	0	0	.	.
199907653	1	.	.	.	1	1	1
200000342	.	1	1	1	1	1	1
200000484	0	1	1
200000673	.	1	1	1	1	1	1
200000929	.	1	1	1	1	0	0
200000937	1	1	1
200001136	.	1	1	1	1	1	1
200001411	1	1
200001723	1	1
200003767	0	1	1
200003785	.	.	1	1	1	1	1
200004007	.	.	.	1	1	1	1
200004130	.	.	1	1	1	1	1
200004389	.	1	1	1	1	1	0
200004732	1	1	1
200004738	.	1	1	1	1	1	1
200004788	.	.	0	0	0	0	1
200006164	.	1	1	1	1	1	1
200006288	1	1	1
200006464	.	1	0	0	1	1	0
200006492	1	1	1
200006805	.	0
200006895	.	.	.	0	1	1	1
200006897	.	.	1	1	1	1	1
200009206	.	.	1	1	1	1	1
200009639	.	1	1	1	1	1	1
200010180	1	1	1
200010822	1	1	1
200100517	.	1	1	1	1	1	1
200101775	0	0	1
200101988	.	.	0	0	0	0	0
200102741	1
200102743	1

200103163	1	1
200103282	1	1	1
200105139	.	.	1	1	1	1	1
200105278	.	.	1	1	1	1	1
200105330	.	.	1	1	1	1	1
200105538	.	.	1	1	1	1	1
200106304	1	1	1
200108038	.	.	1	1	1	1	1
200108105	.	.	1	1	1	1	1
200109116	.	.	1	1	1	1	1
200109527	1	1	1
200110911	.	.	1	1	1	1	1
200111259	.	.	1	1	0	0	1
200111801	.	.	0	1	1	1	1
200111830	1	1
3 2 1 7 5 6	.	.	1	1	1	.	1

Anexo 4 - Identificação das lâminas obtidas a partir do Bloco TMA A.

Grupo de Marcadores	Anticorpo Primário	Número da Lâmina BLOCO A
Hematoxilina eosina	e -----	01-30-60-90-100-120-150-170
	CD5	02-46-135
	CD10	03-47-91-136
	CD20	04-48-92-137
	CD23	05-49-93-138
	CD30	06-50-94-139
	CD44v6	07-51-95-140
	CD79a	08-52-96-141
	CD138	09-53-97-142
	BCL6	10-54-98-143 -18-63-107-152-102-160
	HLA-DR	11-55-99-144
	IRF-4 (MUM-1)	12-56-101-145
	Reserva	13-115-146
	p73	14-58-103-147
	p21 ^{waf1}	15-59-104-148
	p27 ^{kip1}	16-61-105-149
	p16 ^{ink4}	17-62-106-151
	Ki-67	19-64-108-153
	PRb	20-65-109-154
	Ciclina A	21-66-110-155
	Ciclina B1	22-67-111-156
	Ciclina D1	23-68-112-157
	Ciclina E	24-69-113-158
	Ciclina G1	25-70-114-159
	p53	27-72-116-161
	BCL-2	28-73-117-162
	BAX	29-74-118-163
	BAK	31-75-119-164
	BCL-x	32-76-121-165
	FAS/CD95	33-77-122-166
	FASL	34-78-123-167
	Mcl1	35-79-124-168
	BAG1	36-80-125-169
	Caspase 8	37-81-126-171
	Casp 3 cleaved	38-82-127-172
	Caspase 3	39-83-128
	Caspase 9	40-84-129
	STAT1	41-85-130
	STAT2	42-86-131
	c-REL (NF-κB)	43-87-132
	BOB1	44-88-133
	OCT2	45-89-134

Anexo 5 - Identificação das lâminas obtidas a partir do bloco TMA B.

Grupo de Marcadores	Anticorpo Primário	Número da Lâmina BLOCO B
Hematoxilina eosina	e -----	01-30-60-90-100-120-150-170
	CD138	06-14-22-
	bcl6 (repetições)	54-90-98
	CiclinaD1	08-16-24-
	junD	05-13-21
	cJun	04-12-19
	cox2	02-09-17
	MUM1	07-15-23
	cFos	03-11-18
	Reserva	25-39, 41-49, 51-59, 61-79, 81-99
	Outros projetos	30, 50, 60, 80
	Reserva	12-56-101-145
		13-57-102-146
		14-58-103-147
		15-59-104-148
		15-61-105-149
		17-62-106-151
		18-63-107-152
		19-64-108-153
		20-65-109-154
		21-66-110-155
		22-67-111-156
		23-68-112-157
		24-69-113-158
		25-70-114-159
		26-71-115-160