

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS
NA ETIOPATOGENIA DO LINFOMA
GÁSTRICO MALT**

CARMEN SILVIA VIEITAS VERGUEIRO

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

Área de concentração: Oncologia

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

**São Paulo
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Vergueiro, Carmen Silvia Vieitas

Expressão de proteínas envolvidas na etiopatogenia do linfoma gástrico MALT / Carmen Silvia Vieitas Vergueiro – São Paulo, 2008.
119p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. LINFOMA MALT. 2. IMUNOHISTOQUÍMICA. 3. HELICOBACTER PYLORI. 4. CÂNCER GÁSTRICO. 5. PROTEINAS REGULADORAS DA APOPTOSE. 6. NF-KAPPA B. 7. RESPOSTA IMUNE DE MUCOSA. 8. ÓXIDO NÍTRICO SINTETASE. 9. ANTÍGENOS HLA-DR. 10. PROTEINAS S100.

DEDICATÓRIA

Ao Marcelo,
fonte de apoio, criatividade, tolerância e
respeito;
pela expressão constitutiva de amor.

Renata e Helena,
por trazerem outra dimensão para minha
vida.

Fernando e Carmen,
Por tudo que plantaram em mim.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi integralmente financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP registrada sob o número de processo 2006/52879-2.

AGRADECIMENTOS

De tudo, a possibilidade de freqüentar o ambiente comprometido e capacitado a desenvolver pesquisa científica com qualidade, foi o ganho maior do período em que freqüentei a Pós-Graduação do Hospital do Câncer.

À Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, instituições que me acolheram, fornecendo os meios necessários para meu crescimento, devo-lhes grande parte da minha formação.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, agradeço a incansável disposição. Disposição em aceitar uma pós-graduanda clínica, desconhecida e impertinente. Disposição ao rever milhares de vezes as lâminas deste trabalho. Disposição para oferecer seu conhecimento e método. Aceitar e viabilizar meu projeto. Obrigada por ser esta pessoa preparada e disposta a aceitar sempre mais um desafio.

Ao Prof. Dr. Carlos Sérgio Chiattonne, mestre e amigo, por todos os ensinamentos da especialidade, mas sobretudo pelo exemplo de retidão de caráter, princípios e valores.

Ao Prof. Dr. Roberto Pinto Paes e ao Departamento de Anatomia Patológica da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, pelo auxílio no desenvolvimento do projeto e disponibilização de material para este estudo.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Lima Reis, que talvez não saiba da importância que tem seu modelo para todos nós, pós-graduandos do A.C.Camargo. Agradeço a seriedade com que conduz nossas atividades, a transparência de suas colocações e a ampla visão de ensino e pesquisa.

Ao Prof. Dr. José Humberto Tavares Guerreiro Fregnani pela orientação e dedicação na análise dos resultados.

À Profa. Dra. Dulciene Queiroz, agradeço as sugestões muito oportunas e enriquecedoras. Obrigada pela atenção e contribuição que deu à esta aluna.

Às amigas e sobrinho, Julia, Renata, Mara, Clhoé e Arthur, pela leitura criteriosa, sugestões e sobretudo, pela amizade.

Aos técnicos do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer e do Instituto Ludwig: José Ivanildo Neves, Sueli Nonogaki, Carlos F. Nascimento, Severino da Silva Ferreira pela presteza e habilidade no preparo das lâminas e reações imunoistoquímicas.

Às bibliotecárias do Hospital do Câncer, agradeço a seriedade, tolerância e competência que demonstraram ao longo destes anos - minha gratidão eterna.

Aos amigos que ficaram após à Pós: que viva nossa amizade!

Aos colegas da Hematologia da Santa Casa de São Paulo agradeço o companheirismo, as trocas de informações e experiências.

Aos colegas do Laboratório de Histocompatibilidade da Santa Casa de São Paulo, a seriedade com que vocês exercem seu trabalho, permitiu-me a tranquilidade para este estudo.

Aos colegas da Associação da Medula Óssea-AMEO, agradeço a compreensão da minha ausência e a inestimável amizade.

Aos meus irmãos, sobrinhos e familiares, agradeço o constante estímulo e confiança que depositam no meu trabalho.

Aos amigos da vida, reservo o direito de tê-los sempre presentes, como fonte de amor e inspiração.

Ao Prof. Dr. Marcelo Mercadante, pela leitura, sugestões, correções e participações especiais, obrigada, obrigada, obrigada.....

RESUMO

Vergueiro CSV. **Expressão de proteínas envolvidas na etiopatogenia do linfoma gástrico MALT**. São Paulo; 2007 [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

INTRODUÇÃO: O linfoma gástrico do tecido linfóide associado à mucosa (MALT) representa o tipo mais freqüente de linfoma MALT e é associado à infecção crônica pelo *Helicobacter pylori*. A infecção da mucosa gástrica pelo *Helicobacter pylori* ocorre em mais da metade da população mundial determinando cursos clínicos extremamente variáveis: gastrite assintomática, úlcera péptica, carcinoma gástrico e linfoma MALT. A diversidade da manifestação clínica é determinada por fatores do hospedeiro e da bactéria cuja interação determina padrões distintos de resposta. **OBJETIVO:** Determinar o padrão de expressão de proteínas envolvidas na via extrínseca de apoptose, na resposta imune e inflamatória e na via de sinalização NF- κ B do linfoma gástrico MALT e compará-lo com o padrão encontrado nas gastrites e no estômago normal. **MATERIAL e MÉTODOS:** Descrevemos a expressão de proteínas envolvidas nas vias de apoptose (FAS, FAS-L, Caspase 8 e Granzima B), na resposta imunológica e inflamatória (HLA-DR, STAT-1, S-100 e NOS-2) e das proteínas que participam da via de ativação do NF- κ B (Bcl-10 e c-rel), do linfoma gástrico MALT, avaliadas por imunohistoquímica. Avaliamos fragmentos de biópsia representativos de 56 casos de linfoma gástrico MALT, 28 de gastrite e 35 de mucosa gástrica normal. O teste não paramétrico de Kruskal Wallis foi utilizado para comparar a intensidade de expressão dos marcadores entre os 3 grupos (alfa=5%). Para as comparações múltiplas adotou-se o teste de Mann-Whitney com a correção de Bonferroni para o erro alfa (alfa=1,67%). **RESULTADOS:** Observamos diminuição da expressão do FAS-L e do FAS no tumor, quando comparados à gastrite ($p < 0,001$, $p < 0,001$ respectivamente) e ao tecido normal ($p < 0,001$, $p < 0,001$ respectivamente). O linfoma apresenta

áreas claramente negativas para o FAS. A expressão da Caspase-8 foi mais freqüente nas gastrites comparando ao linfoma MALT e ao normal ($p=0,006$, $p=0,04$ respectivamente). A Granzima B foi mais freqüente no MALT, havendo diferença estatística em relação ao normal ($p<0,001$) e às gastrites ($p=0,014$).

A expressão de HLA-DR, STAT-1, S-100 foi mais freqüente no tumor quando comparadas ao normal ($p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$, respectivamente) e à gastrite ($p<0,001$, $p<0,01$, $p<0,001$, respectivamente). A expressão da NOS-2 foi menos frequente no grupo do linfoma MALT e a diferença em relação às gastrites e ao normal foi significativa ($p<0,001$ e $p=0,001$ respectivamente). O c-Rel foi mais freqüente no MALT quando comparado ao normal ($p<0,001$) e à gastrite ($p<0,001$). A expressão predominantemente nuclear do Bcl-10 com forte intensidade só foi observada no tumor, em 11 das 54 amostras avaliadas. CONCLUSÃO: No linfoma MALT o padrão de expressão das proteínas estudadas difere dos grupos controle. Nossos resultados sugerem comprometimento da via extrínseca de apoptose nos linfomas MALT devido à reduzida expressão de FAS-FAS-L e ausência de sinais de ativação da caspase-8. As proteínas envolvidas na apresentação de antígenos estão muito expressas no MALT, (HLA-DR, STAT-1 e S-100), o que pode ser consequência da estimulação antigênica e determinante da proliferação de células B. Encontramos intensa expressão do c-Rel nos linfomas MALT, o que pode significar que esta subunidade do NF- κ B participe da gênese do processo neoplásico, seja por indução da proliferação, seja por estar envolvida na gênese de inibidores da apoptose.

SUMMARY

Vergueiro CSV. **[Protein expression involved in the etiopathogenesis of gastric MALT lymphoma]**. São Paulo; 2007 [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: The gastric lymphoma of the mucosal associated lymphoid tissue (MALT) represents the most frequent MALT lymphoma and is associated with chronic *Helicobacter Pylori* infection. The gastric mucosal infection by *Helicobacter pylori* occurs in more than half of the world population, thus leading to a broad spectrum of clinical presentations including asymptomatic gastritis, peptic ulcer, gastric carcinoma, and MALT lymphoma. The diverse clinical manifestations are determined by host factors and bacterial interactions leading to different types of responses. Objective: To determine the pattern of protein expression involved in the extrinsic apoptotic pathway, in the immune and inflammatory responses, and in the signaling pathway of NF- κ B of the Gastric MALT Lymphoma and to compare it with the standard pattern found in gastritis and the normal stomach. Material and methods: We described the expression of proteins involved in the apoptotic pathways (FAS, FAS-L, Caspase 8 and Granzyme B), in the immune and inflammatory responses (HLA-DR, STAT-1, S-100 and NOS-2), as well as the proteins that participate in the activation of NF- κ B (Bcl-10 and c-Rel), in the MALT Gastric Lymphoma via Immunohistochemistry. We analyzed 56 biopsy specimens of gastric MALT lymphoma, 28 biopsy specimens of gastritis, and 35 normal gastric tissues. The Kruskal Wallis non parametric test was used to compare the intensity of marker expression amongst the three groups ($\alpha=.05$). For the multiple comparisons, the Mann-Whitney test was used with the Bonferroni correction for alpha error ($\alpha= .0167$). Results: We observed a decrease in the expression FAS-L and FAS in the tumor when compared to gastritis and normal mucosa ($p<0,001$, $p<0,001$ respectively). The lymphoma has areas that are clearly negative for

FAS. The expression of Caspase-8 was more frequent in gastritis than in MALT lymphoma and in normal tissue ($p=0,006$, $p=0,04$ respectively). The presence of Granzyme B in the MALT lymphoma was more frequent with statistical significance when compared with normal tissue ($p<0,001$) and gastritis ($p=0,014$). The expression of the HLA-DR, STAT-1, S-100 was more frequent in the tumor than the normal mucosa ($p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$ respectively) and gastritis ($p<0,001$, $p<0,01$, $p<0,001$ respectively). The presence of NOS-2 expression was less frequent in the group with MALT lymphoma and the difference between gastritis and normal mucosa was statistically significant ($p<0,001$ and $p=0,001$). c-Rel expression was higher in MALT lymphoma compared to normal tissue ($p<0,001$) and gastritis ($p<0,001$). The predominantly nuclear and intense expression of Bcl-10 was only observed in the tumor in 11 of the 54 specimens that were analyzed.

CONCLUSION: In the MALT lymphoma, the patterns of protein expression differ from the control groups. Our results suggest a compromised extrinsic apoptotic pathway in the MALT lymphomas due to a reduced expression of the FAS-FAS-L and the absence of activation signals of caspase-8. The proteins involved in antigen presentation (HLA-DR, STAT-1 and S-100) are highly expressed in MALT lymphoma, which may be a consequence of antigenic stimulation and may be responsible for B cell proliferation. We found intense expression of c-Rel in the MALT lymphomas, suggesting that this NF- κ B subunit participates in the initiation of the neoplastic process, either through induction of proliferation or through the synthesis of inhibitors of apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	As translocações mais frequentes no linfoma MALT	10
Figura 2	Imunopatologia da úlcera péptica induzida pelo HP (<i>Helicobacter pylori</i>) e mediada por células T	19
Figura 3	Representação esquemática da indução de regulação cruzada da resposta Th1 e Th2.	23
Figura 4	Fotomicrografias da reação imunoistoquímica para o <i>Helicobacter pylori</i> em mucosa gástrica.	53
Figura 5	Fotomicrografia da reação imunoistoquímica para FAS-L em mucosa gástrica.	56
Figura 6	Fotomicrografias da reação imunoistoquímica para FAS em mucosa gástrica.	59
Figura 7	Fotomicrografias da reação imunoistoquímica para o Caspase-8 (sub-unidade p-18) em mucosa gástrica.	62
Figura 8	Fotomicrografias da reação imunoistoquímica para a Granzima B em mucosa gástrica.	65
Figura 9	Fotomicrografias da reação imunoistoquímica para STAT-1 em mucosa gástrica	68
Figura 10	Fotomicrografias da reação imunoistoquímica para HLA-DR na mucosa gástrica.	72
Figura 11	Fotomicrografias da reação imunoistoquímica para HLA-DR no tumor.	73
Figura 12	Fotomicrografias da reação imunoistoquímica para NOS-2 na mucosa gástrica.	76
Figura 13	Fotomicrografias da reação imunoistoquímica para S-100 na mucosa gástrica.	79
Figura 14	Fotomicrografias da reação imunoistoquímica para c-Rel na mucosa gástrica.	82
Figura 15	Fotomicrografias da reação imunoistoquímica para Bcl-10 na mucosa gástrica.	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número e percentual das amostras segundo a expressão do <i>Helicobacter pylori</i> .	51
Tabela 2	Número e percentual das amostras segundo a expressão protéica do FAS-L.	55
Tabela 3	Número e percentual das amostras segundo a expressão protéica do FAS.	57
Tabela 4	Número e percentual das amostras segundo a expressão protéica da Caspase 8.	60
Tabela 5	Número e percentual das amostras segundo a expressão protéica da Granzima B.	63
Tabela 6	Número e percentual das amostras segundo a expressão protéica da STAT-1.	67
Tabela 7	Número e percentual das amostras segundo a expressão protéica do HLA-DR no epitélio.	70
Tabela 8	Número e percentual das amostras segundo a expressão protéica do HLA-DR nos linfócitos.	71
Tabela 9	Número e percentual das amostras segundo a expressão protéica do NOS 2.	74
Tabela 10	Número e percentual das amostras segundo a expressão protéica do S-100.	78
Tabela 11	Número e percentual das amostras segundo a expressão protéica do c-Rel.	81
Tabela 12	Número e percentual das amostras segundo o padrão de expressão protéica do Bcl-10.	84
Tabela 13	Intensidade de expressão imunohistoquímica dos marcadores biomoleculares segundo os três grupos de estudo: análise considerando todos os pacientes.	86
Tabela 14	Valores dos níveis descritivos do teste de Mann-Whitney para múltiplas comparações dois a dois (com correção de Bonferroni): análise considerando todos os pacientes.	87

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Anticorpos utilizados, seus clones, diluições de trabalho, concentração protéica inicial, origem e tecido utilizado como controle positivo.	44
Quadro 2	Escala de gradação imunoistoquímica para FAS e FAS-L, Caspase 8, STAT-1, HLA-DR, S-100, NOS-2 e c-Rel.	45
Quadro 3	Escala de gradação imunoistoquímica para Granzima B.	45
Quadro 4	Escala de gradação para o Bcl-10.	46

LISTA DE ABREVIATURAS

API-2	Proteína inibidora da apoptose
Bcl-2	Bcell CLL/linfoma2, família de proteínas antiapoptose
Bcl-10	Bcell CLL/linfoma10, molécula que contém CARD e ativa NF- κ B
BCR	Receptor de célula B
Bfl-1	Similar ao Bcl-2 (proteína A1 relacionada ao Bcl-2)
Bid	Molécula pró-apoptose
Cag-A	Citotoxina associada ao gene A
CARD	Domínio recrutador de caspase
CD	Designação clonal
CD	Célula Dendrítica
CIITA	Transativador de Classe II
COX-2	Ciclo - oxigenase 2b
c-Rel	Proteína proto - oncogénica (semelhante ao v-Rel da reticuloendoteliose aviária)
DC-SIGN	Receptor de células dendríticas
DHL	Desidrogenase láctica
DNA	Ácido Deóxidoribonucleico
FADD	Molécula adaptadora do domínio de morte
FAS	APO1/CD95, receptor de morte da família TNF
FAS-L	Ligante do receptor de morte FAS
FOXP-1	Forkhead Box P-1
HL	Doença de Hodgkin
HLA	Antígeno Humano Leucocitário
HP	<i>Helicobacter pylori</i>
IFN	Interferon
IGH	Imunoglobulina de cadeia pesada
I-KB	Inibidor de NF- κ B
IL	Interleucina

iNOS	Sintetase induzível de óxido nítrico (NOS2)
JAK	Janus Kinase
LCDL	Linfoma difuso de grandes células B
LPS	Lipopolisacaride
LTβR	Receptor de Linfotoxina β
MAMP	Padrão Molecular associado ao micróbio
MALT	Tecido linfóide associado à mucosa
MALT-1	MALT associated translocation protein
Mcl-1	Sequência 1 da célula da leucemia mielóide (proteína relacionada ao Bcl)
MM	Mieloma Múltiplo
NAP	Proteína ativadora de neutrófilos
NF-κB	Fator Nuclear-κB
NK	Natural Killer
NOS	Sintase de óxido nítrico
PAI-Cag	Ilha patogênica Cag
PCR	Reação em cadeia da polimerase
ROS	Espécies de oxigênio reativas
STAT-1	Tradutor e ativador da transcrição de sinal
SIGN	“ICAM-grabbing non integrin”
TCR	Receptor de célula T
TNF	Fator de necrose tumoral
Th	T helper
Vac-A	Citotoxina vacuolizante-A

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Linfoma MALT: o conceito	2
1.2	Manifestação Clínica e Diagnóstico	4
1.3	Patogênese	8
1.4	Resposta Imune e inflamatória ao <i>Helicobacter pylori</i>	12
1.5	Fatores Moleculares	24
1.5.1	FAS-L	24
1.5.2	FAS	25
1.5.3	Caspase-8	26
1.5.4	Granzima B	27
1.5.5	STAT-1	28
1.5.6	HLA-DR	29
1.5.7	S-100	31
1.5.8	NOS-2	32
1.5.9	c-Rel	33
1.5.10	Bcl-10	36
2	OBJETIVOS	38
3	CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1	Casuística	41
3.2	Amostra	42
3.3	Fatores moleculares – Imunoistoquímica	43
3.4	Análise microscópica dos fatores moleculares	44
3.5	Análise estatística	46
4	RESULTADOS	48
4.1	Imunoistoquímica	51
4.1.1	<i>Helicobacter pylori</i>	51

4.2	Fatores moleculares envolvidos na via extrínseca da apoptose	54
4.2.1	FAS-L	54
4.2.2	FAS	57
4.2.3	Caspase-8	60
4.2.4	Granzima B	63
4.3	Fatores moleculares envolvidos na resposta imune adaptativa e no processo inflamatório	66
4.3.1	STAT-1	66
4.3.2	HLA-DR	69
4.3.3	NOS-2	74
4.3.4	S-100	77
4.4	Fatores moleculares envolvidos na via de ativação NF-KB	80
4.4.1	c-Rel	80
4.4.2	Bcl-10	83
5	DISCUSSÃO	88
5.1	<i>Helicobacter pylori</i> e o câncer	89
5.2	A resposta imunológica e inflamatória	90
5.3	A via extrínseca da apoptose	97
5.4	Ativação do NF-kB	101
5.4.1	c-Rel	101
5.4.2	Bcl-10	103
6	CONCLUSÕES	105
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

ANEXOS

Anexo 1 Comparação dos sistemas de estadiamento propostos para o linfoma gástrico MALT

Anexo 2 Protocolo de reações imunoistoquímicas

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 LINFOMA MALT: O CONCEITO

Os linfomas não-Hodgkin são um grupo heterogêneo de neoplasias do tecido linfóide. O diagnóstico de linfoma nos remete imediatamente à clínica de um paciente com adenomegalias. Entretanto, o linfoma não-Hodgkin pode ter início em qualquer localização do organismo, existindo ou não um tecido linfóide organizado no órgão acometido. Aproximadamente 40% dos linfomas têm início em sítios que não são os órgãos linfóides e estes recebem a denominação de linfomas extranodais, enquanto os linfomas que se originam nos órgãos linfóides são designados linfomas nodais. A diferença entre os linfomas nodais e extranodais não reside apenas na questão anatômica, o comportamento biológico é diferente (ISAACSON e WRITE 1984).

A distribuição anatômica e a estrutura dos linfonodos são adaptadas para receber antígenos trazidos ao linfonodo pelas vias linfáticas aferentes que drenam linfa de regiões distantes. As mucosas, especialmente do trato gastrointestinal e do trato respiratório, estão constantemente expostas a antígenos do meio ambiente e desenvolvem um sistema imunológico próprio, natural, denominado tecido linfóide associado à mucosa, ou MALT, com características morfológicas específicas diferentes do tecido linfóide do baço e dos linfonodos. Alguns órgãos desenvolvem este tecido depois de

exposição a estímulos antigênicos crônicos ou à exposição a auto-anticorpos, como a tireóide quando agredida por anticorpos na tireoidite de Hashimoto, o estômago através da infecção crônica pelo *Helicobacter pylori* ou da gastrite auto-imune, as glândulas salivares agredidas por anticorpos na Síndrome de Sjogren (ISAACSON e WRITE 1984).

Em 1983 ISAACSON e WRITE observaram que certos linfomas de células B de baixo grau do trato gastrintestinal exibiam características morfológicas do tecido linfóide associado à mucosa (MALT), cujo padrão histológico é similar ao das placas de Peyer, com folículos linfóides apresentando zona marginal proeminente. A descrição foi feita inicialmente no estômago e posteriormente em outros órgãos: tireóide, pulmão, pele, glândulas salivares, conjuntiva ocular, intestino delgado e fígado (ISAACSON e WRITE 1983, 1984).

WOTHERSPOON et al. (1991) observaram que o linfoma gástrico poderia originar-se do processo inflamatório crônico desencadeado pelo *Helicobacter pylori*. De fato, a causa mais comum de gastrite crônica é a infecção pelo *Helicobacter pylori*, que determina com freqüência um padrão histológico muito semelhante ao linfoma de células B da zona marginal extranodal do tecido linfóide associado à mucosa (linfoma MALT), com presença de grau variável de infiltrado linfoplasmocitário, podendo apresentar-se com pequenos agregados linfóides até folículos linfóides. Em decorrência destas observações e da verificação de que em 92% dos 101 pacientes com diagnóstico de linfoma gástrico foi detectada a presença do *Helicobacter pylori*, os autores formularam a hipótese de que a infecção

seria uma condição necessária a partir da qual poderia desenvolver-se o linfoma gástrico MALT.

O conceito de que a neoplasia estaria relacionada à presença do *Helicobacter pylori* foi sustentado por algumas evidências. Em primeiro lugar, pelo achado de positividade para *Helicobacter pylori* na maioria dos pacientes com diagnóstico de linfoma gástrico do tipo MALT, em segundo, pela evidência epidemiológica de que nas regiões da Itália em que a prevalência de *Helicobacter pylori* é alta, há maior número de casos de indivíduos acometidos pelo linfoma gástrico MALT e em terceiro lugar pela evidência de regressão do linfoma MALT depois da erradicação do *Helicobacter pylori* com antibioticoterapia (WOTHERSPOON et al. 1991; DOGLIONI et al. 1992; WOTHERSPONN et al. 1993; ROGGERO et al. 1995). O novo conceito contribuiu muito para que antigos dogmas fossem reformulados. A hipótese de que o estímulo antigênico crônico fosse responsável pelo desenvolvimento de um clone de células neoplásicas e de que estas células permanecessem por um longo período responsivas ao estímulo antigênico era inédita (HUSSELL et al. 1993).

1.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO

O linfoma da zona marginal extranodal B do tecido linfóide associado à mucosa (linfoma MALT) foi reconhecido como uma entidade clínica isolada na classificação da Organização Mundial de Saúde em 2001, encontrando-se entre as neoplasias de células B periféricas. O linfoma MALT é extranodal

e representa 8% das neoplasias linfóides B. Clinicamente tem comportamento indolente, permanecendo localizado por muito tempo e desenvolvendo-se lentamente ao longo dos anos (ISAACSON et al. 2001). Este fenômeno é conhecido como “homing”, as células linfomatosas, guiadas por suas moléculas de adesão, tendem a se instalar nos tecidos que apresentem seus ligantes (KUNKEL e BUTCHER 2002; SACKSTEIN 2005). Curiosamente, a disseminação, quando ocorre, compromete outros sítios extranodais e a medula óssea. A maior parte dos linfomas MALT acomete o trato gastrointestinal (50%), sendo o estômago o sítio mais freqüente (85%). Outros sítios freqüentes são: pulmão (14%), olhos e anexos (12%), pele (11%), tireóide (4%) e mama (4%). Em muitos casos de linfoma MALT existe um precedente de um processo inflamatório crônico, freqüentemente de doença auto-imune, que resulta no desenvolvimento do tecido linfóide extranodal (ISAACSON et al. 2001).

A apresentação clínica dos linfomas MALT varia de acordo com o sítio envolvido na apresentação, mas existem algumas características em comum. A maior parte dos pacientes, ao diagnóstico, apresenta-se em bom estado geral, sem perda de peso, febre ou sudorese noturna; os marcadores biológicos, desidrogenase láctica (DHL) e β 2-microglobulina, estão dentro da normalidade em 80% dos casos. A doença é localizada na maioria dos pacientes, mas múltiplas localizações estão presentes em 34 a 37% dos pacientes. O envolvimento da medula óssea é freqüente, detectado em 20% dos casos. A disseminação da doença ocorre para outros sítios de mucosas ou, mais freqüentemente para o baço, medula óssea e fígado. O linfoma

gástrico MALT tem algumas manifestações próprias: acomete indivíduos entre 50 e 60 anos de idade, com predomínio no sexo feminino (1:1,7). Os sintomas iniciais são relacionados ao local de manifestação do linfoma, o estômago, o que determina dor epigástrica ou abdominal, dispepsia, náusea, vômito e perda de peso em 30% dos casos. A anemia por deficiência de ferro é multifatorial, a perda oculta de sangue nas fezes ocorre em 30% dos casos ao diagnóstico. Sangramento maciço e perfuração não são frequentes, mas podem ser o primeiro sintoma da doença. A obstrução intestinal pode ocorrer em tumores muito volumosos. Dentro do estômago a localização mais frequente é o antro (41%), seguido do corpo gástrico (12%) e do fundo (11%); o comprometimento é multifocal em um terço dos casos. O acometimento de linfonodos peri-gástricos é encontrado em metade dos pacientes e relaciona-se com a profundidade de infiltração do linfoma na parede gástrica (THIEBLEMONT e COIFFIER 2004).

O método diagnóstico de escolha é a endoscopia digestiva, que permite múltiplas biópsias de cada região do estômago e de todas as áreas comprometidas. A presença do *Helicobacter pylori* deve ser sempre investigada pela coloração histológica. Quando a histologia é negativa, a pesquisa da bactéria por outra metodologia, como cultura, teste respiratório e teste sorológico se impõem. A avaliação da extensão local da doença se torna muito melhor com a realização da ultrassonografia endoscópica, que permite a avaliação do grau de comprometimento da parede gástrica e identifica pacientes com risco de sangramento ou de perfuração. A disseminação da doença é avaliada por exame físico completo, tomografia

computadorizada de tórax, abdômen e pélvis, que podem evidenciar aumento de linfonodos, baço, fígado, ou presença de nódulos tumorais nestes e em outros órgãos. A biópsia de medula óssea é realizada sistematicamente. O estadiamento proposto em Ann Arbor para o linfoma de trato gastrointestinal é o mais utilizado embora exista controvérsia sobre a melhor forma de estadiamento. Vários são os sistemas de estadiamento propostos além deste, o de Musshoff (1977), e a modificação proposta por Rohatiner (1994) em Lugano, citados por THIEBLEMONT e COIFFIER (2004, p.69). Quando há disponibilidade de ultrassonografia endoscópica, o sistema de estadiamento TNM proposto para o carcinoma gástrico pode ser utilizado (Anexo 1).

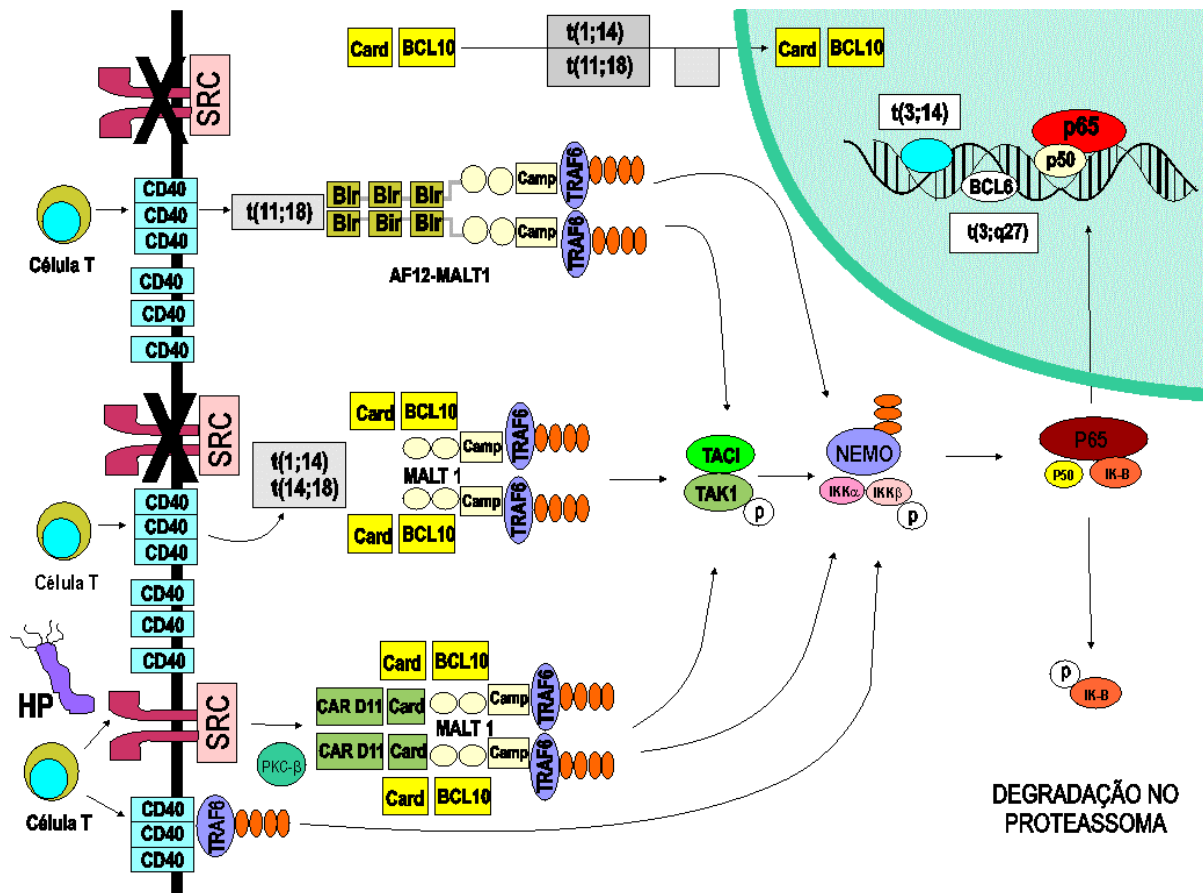
Histologicamente, o linfoma MALT é um linfoma extranodal, caracteriza-se por apresentar um grupo heterogêneo de linfócitos, incluindo células da zona marginal (“centrocitos-like”), linfócitos pequenos B, células B com citoplasma abundante, conferindo um aspecto monocitóide, com presença de centroblastos e imunoblastos em grau variável. Alguns casos apresentam diferenciação plasmocitóide. As células neoplásicas proliferam na zona marginal dos folículos linfóides B reacionais. Nos tecidos epiteliais, as células neoplásicas podem infiltrar o epitélio, levando à lesão característica linfo-epitelial. As células do linfoma expressam os antígenos associados à zona marginal CD21 e CD35. Não há um marcador característico imunoistoquímico para definir o linfoma MALT até o presente. As células tumorais expressam tipicamente IgM, menos freqüentemente IgA ou IgG e mostram restrição de cadeias leves (ISAACSON et al. 2001).

O diagnóstico diferencial entre a gastrite e o linfoma MALT pode ser particularmente difícil, principalmente no material obtido por biópsia endoscópica devido à pequena quantidade de amostra tecidual. A demonstração da restrição de cadeias leves é informativa, mas não define o diagnóstico. A análise de rearranjo do gene da imunoglobulina por reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de monoclonalidade pode falhar em mais de 15% dos casos podendo produzir resultados falso positivos. A monoclonalidade isoladamente não é suficiente para definir a neoplasia: células B monoclonais foram encontradas em pacientes que não apresentavam linfoma, sendo frequentes os relatos de “gastrites monoclonais” (WÜNDISCH et al. 2003; ISAACSON e DU 2005; GEORGOPOULOS et al. 2005).

1.3 PATOGÊNESE

Apesar de tratar de uma entidade reconhecida do ponto de vista clínico e histológico, a compreensão da participação dos fatores citogenéticos e moleculares na patogenia do linfoma MALT só vêm sendo esclarecida recentemente. Nos últimos anos várias alterações citogenéticas comuns aos linfomas MALT têm sido identificadas. As trissomias do 3, 12 e 18, mutações do p53/LOH, e deleção do p16 podem estar presentes isoladamente ou associadas. Algumas alterações citogenéticas são mutuamente exclusivas e vêm sendo correlacionadas especificamente ao linfoma MALT: t(11;18)(q21;q21), t(1;14)(p22;q32) e t(14;18)(q32;q21). A

translocação (11;18)(q21;q21) funde o N-terminal do transcrito API-2 ao Carboxi-terminal do transcrito MALT-1 e gera um produto funcional denominado API-2-MALT1. As translocações t(1;14)(p22;q32) e t(14;18)(q32;q21) colocam os genes BCL10 e o MALT1, respectivamente, próximos ao da imunoglobulina IGH e desregulam sua expressão. Acredita-se que os transcritos derivados das translocações citogenéticas, resultem na ativação de uma via comum, a ativação do fator nuclear Kappa B (NF-κB) via receptor de antígenos (ISAACSON e DU 2005; FARINHA e GASCOYNE 2005).



Legenda: A sinalização fisiológica durante a infecção pelo *Helicobacter pylori* (HP) no estômago ocorre através da ativação dependente de antígeno e de células T, do receptor de antígeno da célula B, produzindo a oligomerização do complexo BCL10-MALT-1 junto com o receptor associado ao TNF (TRAF-6). Este ativa a Ik-B kinase- γ (IKK- γ), que por sua vez fosforila a Ik-B, preparando-a para a degradação e permitindo a translocação do NF- κ B livre para o núcleo. Desta forma há aumento da regulação dos genes responsivos ao NF- κ B. As translocações t(1,14) e t(1,18) aumentam a expressão de BCL10 e MALT1 respectivamente. A translocação t(11,18) resulta na proteína de fusão API2-MALT-1, que é capaz de sobrepor-se a ativação normal e ativar o IKK diretamente. A translocação da proteína BCL10 para o núcleo ocorre tanto na t(1,14) como na t(1,18) e parece ser importante na biologia do MALT, embora o mecanismo exato seja desconhecido. A importância das duas novas translocações identificadas, FOX-P1 e BCL6 não é completamente compreendida, mas as duas sendo fatores de transcrição, provavelmente agem no núcleo. Ainda não é claro se agem na via NF- κ B. Casp = caspase; CARD= domínio recrutador de caspase; Bir baculovirus inibidor repetido de apoptose; PKC- β = proteína-kinase C Beta; TACI=ativador transmembrana; TAK1= fator de crescimento da kinase B ativada; NEMO=modulador essencial NF- κ B.

Fonte: FARINHA e GASCOYNE (2005).

Figura 1 - As translocações mais frequentes no linfoma MALT.

O NF- κ B é um fator de transcrição que tem importância crucial na inflamação, na imunidade, na proliferação celular e na apoptose. Encontra-se normalmente inativo no citoplasma da célula, ligado a uma molécula inibitória (I- κ B). A fosforilação e degradação da molécula inibitória I- κ B determina a ativação do NF- κ B, sua migração para o núcleo onde exerce a função de fator de transcrição, aumentando a expressão de genes responsivos (FARINHA e GASCOYNE 2005).

Em circunstâncias normais, a sinalização através do receptor de antígenos (TCR e BCR) promove a interação entre Bcl10 e MALT1, que agem sinergicamente para ativar o fator de transcrição NF- κ B. A expressão das duas proteínas é descrita primariamente nos tecidos linfóides, predominantemente no citoplasma de células B ativadas do centro germinativo. O linfoma MALT, quando comparado ao tecido linfóide normal, mostra padrões variáveis de expressão destas duas proteínas, dependendo da translocação subjacente. Na gastrite associada ao *Helicobacter pylori* e durante as fases iniciais do linfoma MALT, os antígenos do *Helicobacter pylori* e as células T auxiliaadoras específicas sinalizam através do receptor de antígenos das células B policlonais e promovem a interação das proteínas normais Bcl10 e MALT1, levando à ativação do NF- κ B. Com a evolução do processo, pode surgir um subclone com uma das translocações características do linfoma MALT, que teria uma vantagem proliferativa. Nesta etapa, depois da ocorrência da translocação, os transcritos promovem a estimulação contínua, constitutiva do NF- κ B, eliminando a necessidade da infecção persistente para a manutenção do estímulo (Figura 1). Neste

estágio a doença não é mais responsiva ao estímulo antigênico do *Helicobacter pylori* (FARINHA e GASCOYNE 2005; VIATOUR et al. 2005; LIN e WANG 2004).

Evidências neste tema encontram-se em publicações recentes que estudaram a expressão imunistoquímica do Bcl-10, do MALT-1 e do NF-κB nos linfomas gástricos MALT. A expressão destas moléculas está particularmente alterada naqueles linfomas que não são responsivos ao tratamento do *Helicobacter pylori* cuja alteração citogenética leva à formação de um transcrito que propicia constitutivamente, a proliferação da célula B tumoral através da via do NF-κB (YEH et al. 2005; INAGAKI et al. 2004).

Recentemente a t(3;14)(p13;q32) foi identificada em linfomas MALT de tireóide, órbita e anexos, pele e estômago, assim como nos linfomas difusos de grandes células. Nos dois subtipos de linfoma a frequência da translocação é baixa e o significado do rearranjo do gene FOXP-1 ainda não é claro (STREUBEL et al. 2005).

1.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA E INFLAMATÓRIA AO *HELICOBACTER PYLORI*

O pré-requisito para a gênese do linfoma gástrico de baixo grau é o desenvolvimento do tecido linfóide, MALT, secundário ao processo inflamatório desencadeado pelo *Helicobacter pylori*.

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria gram negativa que está presente em 50% dos estômagos da população mundial. A infecção pelo *Helicobacter*

pylori ocorre na primeira infância e em geral permanece ao longo da vida. Em todos indivíduos infectados há instalação de um processo inflamatório cuja evolução é extremamente variável. A maior parte dos indivíduos acometidos são assintomáticos, no entanto, há uma percentagem que desenvolve gastrite sintomática, úlcera duodenal, úlceras gástrica, adenocarcinoma gástrico e linfoma MALT (MARSHALL e WINDSOR 2005).

Certamente existem vários fatores que interagem no processo inflamatório, características de virulência da bactéria e de resposta do hospedeiro, que são variáveis e acabam por determinar a evolução do processo inflamatório.

O *Helicobacter pylori* possui uma série de características que possibilitam sua orientação espacial e movimentação no muco, adesão às células epiteliais da mucosa gástrica, evasão da resposta imunológica, colonização persistente e transmissão. A bactéria é ingerida por via oral. Depois de ser ingerida ela deve se proteger do meio ácido inóspito e penetrar no muco gástrico. A produção de urease e a motilidade são essenciais para este primeiro passo da infecção. A urease hidroliza a uréia em dióxido de carbono e amônia permitindo que a bactéria sobreviva ao meio ácido. A presença de flagelos possibilita a orientação e motilidade da bactéria através do muco, até a superfície das células epiteliais (SUERBAUM e MICHETTI 2002).

O *Helicobacter pylori* raramente penetra na célula, é uma bactéria extracelular que adere às células epiteliais através de vários componentes de superfície, denominados fatores de adesão. Dentre estes, a adesina mais

caracterizada é a Bab A, que é uma proteína de membrana de 78-kD que se liga ao antígeno do grupo sanguíneo Lewis B fucosilado. Uma das descobertas mais interessantes dos projetos que sequenciaram o genoma do *Helicobacter pylori* é a descoberta de uma família de 32 proteínas de membrana externa, na maior parte adesinas, cujos genes podem ser “ligados” ou “desligados”. As proteínas codificadas por estes genes, que têm variação de fase, incluem enzimas que promovem modificação da estrutura antigênica de moléculas de superfície, controlam entrada de DNA externo na bactéria e influenciam na motilidade (SUERBAUM e MICHETTI 2002). É possível que esta capacidade de alterar sua estrutura antigênica, especialmente a do antígeno Lewis, permita que a bactéria module o padrão de resposta imune das células T auxiliaadoras (Th) do hospedeiro, entre resposta Th1 induzida por interleucina-12 (IL-12) e Th2 induzida por interleucina-4 (IL-4) (BERGMAN et al. 2006).

A maioria das cepas do *Helicobacter pylori* expressa VacA, uma citotoxina vacuolizante. A exotoxina se insere na membrana da célula epitelial e forma um canal anion seletivo através do qual o bicarbonato e ânions orgânicos podem ser liberados, possivelmente provendo a bactéria com nutrientes. A citotoxina vacuolizante, VacA atinge a membrana mitocondrial formando poros que causam a liberação do citocromo c e induzem à apoptose. Outras propriedades da VacA incluem a interação com proteínas do citoesqueleto, aumento da permeabilidade entre células epiteliais, formação de vacúolos intracelulares e supressão da função imunológica (BLASER e ATHERNON 2004; D'ELIOS et al. 2007).

Muitas cepas de *Helicobacter pylori* possuem um fragmento genômico que contém 29 genes denominado “ilha de patogenicidade *cag*” (*cag*-PAI). Vários destes genes formam um aparato de secreção que insere a proteína CagA dentro da célula do hospedeiro. Depois de entrar na célula do hospedeiro, a CagA é fosforilada e interage com uma série de vias de transdução de sinais afetando o fenótipo, a proliferação e a apoptose celular. As células epiteliais e os macrófagos, em resposta à introdução da CagA, produzem citocinas. A resposta inflamatória ao *Helicobacter pylori* e a produção de interleucinas (ILs) é mais pronunciada nas cepas CagA positivas (BLASER e ATHERTON 2004).

A resposta do hospedeiro é desencadeada pela adesão do patógeno à célula epitelial. As alterações que ocorrem nas células epiteliais dependem da translocação das proteínas codificadas pela *cag*-PAI, da urease, das NAP, das proteínas do choque térmico (hsp), das porinas e do VacA. A célula epitelial produz IL-8, quimiocina inflamatória, em resposta à proteína CagA, que tem papel quimiotático potente na ativação de neutrófilos, os quais ampliam a cascata inflamatória. A resposta inflamatória inicial consiste no recrutamento de neutrófilos seguidos por linfócitos T e B, células plasmáticas e macrófagos (D'ELIOS et al. 2003).

A produção de IL-8 pelas células epiteliais atrai e ativa neutrófilos que liberam espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO). Estas espécies não só agredem o patógeno, como podem induzir dano oxidativo do DNA, causando uma grande variedade de danos genéticos e podem contribuir para a aquisição das alterações citogenéticas do linfoma MALT

(ISAACSON e DU 2004). Sugere-se que o *Helicobacter pylori* seja capaz de limitar a produção de NO bactericida, o que lhe possibilita a sobrevivência em condições de stress oxidativo (ISRAEL e PEEK 2006).

A infecção pelo *Helicobacter pylori* induz uma resposta imunológica humoral sistêmica e localizada da mucosa, com produção de anticorpos pelas células linfóides B. A produção de anticorpos não leva à erradicação da infecção mas pode contribuir com o dano tissular. Alguns pacientes infectados têm uma resposta com formação de auto-anticorpos diretamente contra H⁺/K⁺-ATPase das células parietais gástricas, que se correlacionam com a atrofia do corpo gástrico (D'ELIOS et al. 2004).

A células T que infiltram a mucosa são essenciais para a defesa contra o patógeno. As células T auxiliaadoras são ponto chave da resposta imunológica e podem expressar padrões distintos de secreção de citocinas e padrões de resposta: Th1 ou tipo 1 e Th2 ou tipo 2.

O padrão Th1 estabelece-se quando o antígeno é um microrganismo intracelular, como vírus, fungos e micobactérias. Estes microrganismos apresentam padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) que são percebidos como sinal de alarme pelas células apresentadoras de antígeno (APCs). As APCs discriminam o patógeno pela interação dos PAMPs com seus receptores tipo Toll. Vários receptores são indutores de resposta inflamatória com padrão Th1, sendo o TLR4 (do inglês, "Toll Like Receptor 4) o mais conhecido. As APCs assim ativadas, além de apresentar antígenos e moléculas co-estimulatórias, produzem um sinal polarizador representado pela IL-12. A IL-12 induz as NK e células T CD4⁺, CD8⁺ a produzir

interferon- γ (IFN γ) dirigindo a resposta inflamatória para o padrão Th1 (MUSATTI et al.2006).

As células Th1 produzem IFN γ e TNF (fator de necrose tumoral) são fundamentais na defesa contra microorganismos intracelulares. O IFN γ leva à ativação de macrófagos e induz a expressão de moléculas HLA de Classe II nestes e em células B, favorecendo a apresentação de antígenos para os linfócitos T CD4+. Favorece a eliminação de células infectadas por vírus, aumentando a expressão de moléculas HLA de Classe I. Estimula a produção de imunoglobulinas de subclasse IgG1 pelas células B adequadas para mediar a fagocitose por macrófagos. O TNF, cuja principal fonte produtora é o macrófago, além de células NK e T ativadas, em conjunto com IFN determina o padrão Th1 (MUSATTI et al. 2006).

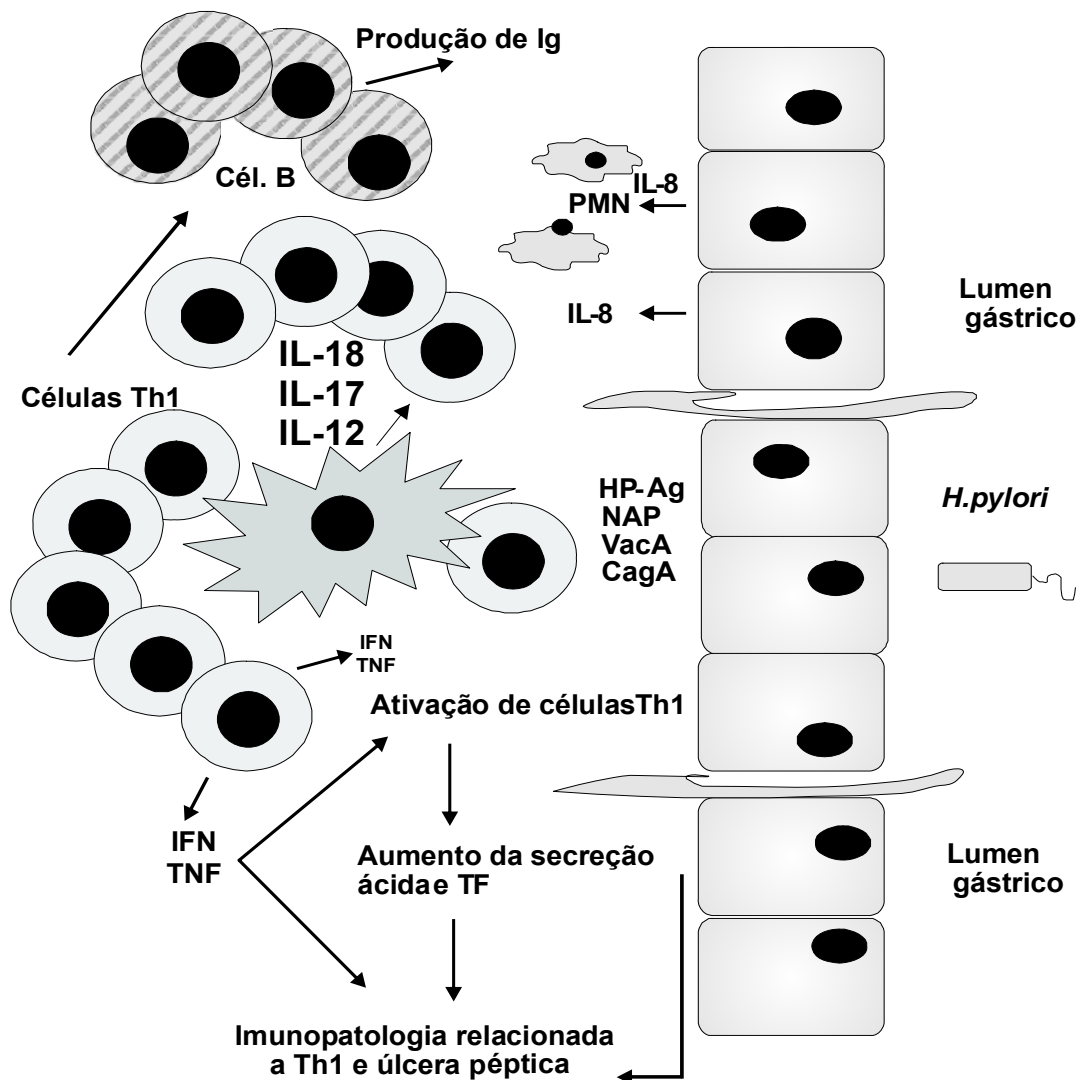
O padrão Th2 é predominantemente humoral e se estabelece quando o antígeno é um microorganismo extracelular, sendo desencadeado preferencialmente por parasitas intestinais e por alérgenos. Neste caso, os sinais percebidos pelas APCs levam à produção de IL-4 (MUSATTI et al. 2006).

As células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-13 que agem como fatores de crescimento e diferenciação para célula B. Desta forma a produção humoral é ampla, com produção característica de IgM, IgG e IgE, liberação de um grande número de substâncias farmacologicamente ativas pelos mastócitos. O componente celular é representado por eosinófilos, importante na destruição de ovos de parasitas (MUSATTI et al. 2006).

A polarização para um ou outro padrão de resposta será determinada por estímulos do meio ambiente, do patógeno e por fatores genéticos.

Nas análises das biópsias de úlcera péptica, o padrão predominante foi de IL-12, IFN γ e TNF, ou seja Th1, enquanto que nas gastrites sem úlcera, foram encontrados IL-4 e IFN- γ , padrão misto. A gravidade das lesões pode ser relacionada com a secreção *in situ* de IFN γ e TNF, correspondendo ao padrão Th1 (D'ELIOS et al. 2005).

A especificidade das células Th derivadas de pacientes com úlcera péptica mostra, em metade dos casos, reatividade específica para a proteína CagA e em um quarto, para urease. Estes dados sugerem que CagA seja o antígeno imunodominante específico para a resposta de células T na úlcera péptica. A grande maioria dos clones *Helicobacter pylori* específicos e particularmente aqueles específicos para CagA, mostram resposta com padrão Th1, com produção alta de IFN γ e sem IL-4 (Fig.2). Por outro lado, nas gastrites sem complicações a maior parte dos clones mostra padrão de resposta misto ocorrendo polarização para Th1 em apenas um terço dos casos. Até o presente, os resultados sugerem que o padrão misto Th1-Th2 está associado com menor índice de complicações e as citocinas IL-4 e IL-10 são importantes em regular e diminuir os efeitos deletérios da resposta polarizada para Th1 (D'ELIOS et al. 2005). No linfoma MALT o padrão predominante de resposta relatado é o Th2 (YAMASAKI et al. 2004), embora alguns autores descrevam o padrão misto, Th1-Th2 e a presença de células Th0 (D'ELIOS et al. 2003).



Legenda: HP e seus antígenos (Hp-Ag), como proteínas ativadoras de neutrófilos (NAP), CagA ou VacA induzem as células epiteliais a expressar IL-8, citocina inflamatória capaz de atrair leucócitos polimorfonucleados (PMN). Macrófagos ativados pelo HP (MØ) iniciam a produção de IL-12, IL-17 e IL-18. Este grupo de citocinas induz células Th1, HP específicas. Se não for modulada por citocinas Th2, a resposta das células T é polarizada para o padrão Th1, com secreção autócrida de IFN γ . As células Th HP específicas dão auxílio para a produção gástrica de opsonina e anticorpos fixadores de complemento pelas células B. O IFN e TNF secretados cronicamente pelas células Th1 podem levar à úlcera péptica porque as duas citocinas são capazes de induzir alterações funcionais das células gástricas e afetar a integridade da célula epitelial.

Fonte: D'ELIOS et al. (2003)

Figura 2 - Imunopatologia da úlcera péptica induzida pelo HP (*Helicobacter pylori*) e mediada por células T

No linfoma MALT, as células tumorais são linfócitos B de memória, responsivas aos sinais de diferenciação, CD40 e citocinas produzidas por células Th específicas para o *Helicobacter pylori*. HUSSELL et al. (1993), demonstraram que células Th específicas para o *Helicobacter pylori* que infiltravam o tumor eram responsáveis pela estimulação constante do clone de células B tumorais *in vitro* e a retirada dessas células da suspensão de células tumorais levava à redução da proliferação. Os clones de células Th derivados de linfomas MALT respondem com proliferação quando semeados em cultura com extrato do *Helicobacter pylori* e não respondem à CagA, VacA e à urease. Estes dados sugerem que existem antígenos do *Helicobacter pylori* importantes envolvidos na ativação das células T e na proliferação de células B ainda não identificados que participam da patogenia do linfoma MALT (D'ELIOS et al. 2005). Existem vários estudos procurando determinar o estímulo antigênico e o padrão de resposta imunológica predominante no linfoma gástrico MALT. De acordo com PEEK e BLASER (2001), a importância do gene *cagA* na fisiopatologia do linfoma MALT não é tão evidente quanto é para a fisiopatologia do adenocarcinoma gástrico. YAMASAKI et al. (2004) descrevem que a proteína de choque térmico 60 (hsp60) nas células mononucleares periféricas de pacientes com MALT é capaz de estimular, *in vitro*, a expressão do ligante de CD40 (CD40L) em células T CD4+ e IL-4, mas não o faz nas células de indivíduos normais ou de pacientes com gastrite. A produção de IL-4 e coexpressão de CD40L induz um perfil de resposta dominante Th-2 nos pacientes com MALT. Este padrão de resposta não ocorre em indivíduos normais. Assim sendo, os

autores propõem que no linfoma MALT, fatores genéticos do hospedeiro, como o sistema HLA e a consequente ativação de células T, seriam responsáveis pela susceptibilidade individual e determinariam em indivíduos susceptíveis resposta imunológica adaptativa específica para a hsp60, predominantemente Th2.

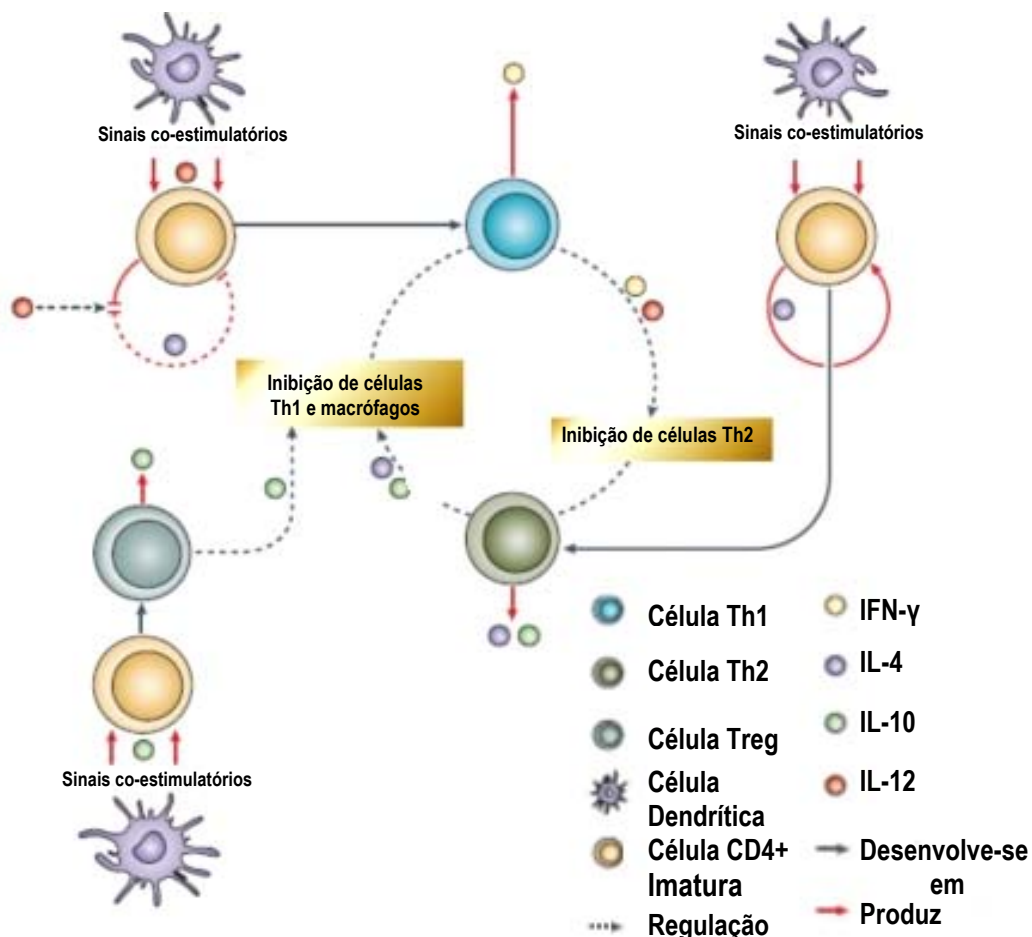
O mecanismo proposto para a evolução do processo inflamatório ao linfoma é baseado na observação de que nestes pacientes há estímulo para proliferação de células B e, simultaneamente, um controle deficiente da proliferação. Na gastrite, a função auxiliadora exercida pelos linfócitos Th aos linfócitos B, é regulada negativamente pela ação citolítica sobre as células B. As células T do linfoma MALT são incapazes de modular o auxílio que prestam as células B. Nenhum dos clones de células T foi capaz de expressar a citotoxicidade mediada pela perforina contra as células B autólogas. Na gastrite não complicada há indução de apoptose mediada por FAS e FAS-Ligante (Fas-L). Tanto a citotoxicidade mediada pela perforina como a indução da apoptose pelo FAS-FAS-L estão reduzidos nas células T que infiltram o linfoma MALT. Assim sendo, acredita-se que há uma exacerbação da apresentação de antígenos e proliferação de células B e concomitantemente uma deficiência no controle da proliferação. A razão para que as células T gástricas do linfoma exerçam sua função auxiliadora, mas não tenham controle sobre a proliferação das células B, é obscura. Sabe-se que a citotoxina VacA inibe a apresentação de antígenos e a ativação de células T, mas não interfere com a liberação de grânulos das células NK. Possivelmente mecanismos ainda desconhecidos afetam os

mecanismos citotóxicos das células T permitindo um acúmulo de células B (D'ELIOS et al. 1999).

Durante a resposta imunológica ao *Helicobacter pylori*, as células epiteliais da mucosa gástrica passam a apresentar moléculas de HLA Classe II, juntamente com moléculas B7-1 coestimulatórias o que sugere que elas possam se comportar como células apresentadoras de antígenos para as células T (ARCHIMANDRITIS et al. 2000).

As células dendríticas têm papel central na apresentação de antígenos e no desencadeamento da resposta imunológica celular. São elas que fazem o processamento de antígenos bacterianos e os apresentam por meio das moléculas HLA para os linfócitos T. O papel das células dendríticas no contexto do linfoma MALT ainda é pouco esclarecido. Recentemente, foi demonstrado seu papel na apresentação de antígenos às células T e produção de IL-12, induzida pelo *Helicobacter pylori*, mostrando que podem participar da resposta Th1 (HANSSON et al. 2006). Em um modelo interessante proposto por BERGMAN et al. (2006), as células dendríticas têm na sua superfície um receptor, DC-SIGN, que captura e internaliza antígenos. A ligação do *Helicobacter pylori* ao receptor DC-SIGN bloqueia a polarização da população de células T imaturas (CD4+CD45RA) para o padrão de resposta Th1, enquanto a ausência de ligação promove o perfil Th1. O *Helicobacter pylori* pode, através da variação de fase na expressão de antígenos do grupo sanguíneo Lewis, levar a um balanço entre a resposta Th1 e Th2, determinando uma imunomodulação que facilite a persistência da colonização (BERGMAN et al. 2006). Este modelo, proposto

para explicar a persistência da infecção em seres humanos é aplicável ao que conhecemos da evolução da infecção para o desencadeamento do linfoma gástrico MALT, onde a resposta celular tem padrão Th1 e Th2.



Legenda: Células dendríticas envolvidas na apresentação de antígenos dão às células T sinais co-estimulatórios diferentes na presença, ou na ausência de IL-12. Na presença de IL-12 a produção autócrida de IL-4 pelas células T CD4+ "naïve" é inibida e a IL-12 dirige a diferenciação destas células para a resposta Th1 que produz IFN γ e ativa a função dos macrófagos. Neste modelo de ativação de célula T, IL-12 inibe o desenvolvimento concomitante de células Th2. Na ausência de IL-12 as células T CD4+ são dirigidas pela IL-4 autóloga a diferenciar em células efetoras Th2, que induzem a diferenciação de células B e inibem a função dos macrófagos. Através dos estímulos de sinais co-estimulatórios e citocinas inibitórias como a IL-10 as células dendríticas ativam células T regulatórias CD4+CD25+ (Treg) e estas diminuem as respostas das células T e dos macrófagos por mecanismos diferentes, sinais solúveis e de membrana.

Fonte: BERGMAN et al. (2006)

Figura 3 - Representação esquemática da indução de regulação cruzada da resposta Th1 e Th2.

1.5 FATORES MOLECULARES:

As evidências de estudos científicos apontam para dois mecanismos principais envolvidos no desenvolvimento do linfoma MALT: a contínua proliferação de células B determinada pela resposta imunológica ao estímulo antigênico e a deficiência no controle da proliferação seja por comprometimento da via extrínscica da apoptose (FAS e FAS-L) ou da ação citotóxica dos linfócitos T e células NK (granzima B). Os fatores moleculares escolhidos para este estudo: STAT-1, HLA-DR, proteína S-100, NOS-2, c-Rel e Bcl-10, mapeiam etapas importantes de mecanismos relacionados à resposta inflamatória e imunológica ao antígeno do *Helicobacter pylori*, enquanto o FAS e FAS-L, Caspase-8 e Granzima B, as vias de controle da proliferação.

1.5.1 FAS-L

FAS Ligante (FAS-L/CD95L) é uma proteína transmembrana homotrimérica, expressa na superfície de células T ativadas e células NK, junto com o receptor FAS, participa na regulação e homeostasia das células T e B periféricas e induz a apoptose de células infectadas por vírus e células neoplásicas. O FAS-L pode ser clivado e encontrado em forma solúvel, a qual está especialmente elevada nas hepatites virais, AIDS e em alguns tumores. Embora as formas solúveis possam desencadear a apoptose, sua capacidade de induzi-la é mil vezes inferior à forma ligada à membrana (GUICCIARDI e GONES 2003).

1.5.2 FAS

FAS (CD95/APO-1) é uma proteína glicosilada de superfície celular expressa em vários tecidos, particularmente abundante no timo, coração, rim, fígado, nos linfócitos maduros ativados e em linfócitos transformados por vírus. Embora a forma ligada à membrana seja a predominante, existem formas solúveis e intracitoplasmáticas, particularmente no Complexo de Golgi (GUICCIARDI e GONES 2003).

A ligação do FAS ao seu ligante fisiológico FAS-L leva à formação de um complexo de sinalização intra-celular com trimerização do FAS, recrutamento do FADD e da procaspase-8. Quando recrutada a este complexo, a procaspase-8 é ativada por autoclivagem levando a apoptose e morte celular (GUICCIARDI e GONES 2003).

A apoptose induzida por FAS é responsável pela seleção negativa de linfócitos B no centro germinativo, tendo um papel importante na eliminação de células B auto-reativas e na regulação da homeostase dos linfócitos periféricos. Suspeita-se que o *Fas* possa ter um papel importante na supressão de tumores. Aproximadamente 20% dos linfomas de células B derivados do centro germinativo, ou pós-centro germinativo, apresentam mutações somáticas no gene *Fas* (Folicular, MALT, Linfoma Difuso de Grandes Células B, Mieloma Múltiplo, Doença de Hodgkin). A maior parte das mutações somáticas são deletérias, comprometendo o domínio de morte, levando à formação de proteínas mutantes que se comportam como formas negativas dominantes (SÁNCHEZ-BEATO et al. 2003). Mutações da linhagem germinativa do gene *Fas* são associadas à síndrome

linfoproliferativa auto-imune e predisõem ao desenvolvimento de linfomas de células B (VAN DEN BERG e MAGGIO 2002; POPPEMA et al. 2004). Existe uma série de estudos recentes que avalia a expressão das proteínas envolvidas na apoptose, em linfoma. Os resultados são controversos, em alguns a expressão de FAS e FAS-L foi associada à evolução favorável do subtipo de linfoma difuso de grande células do centro germinativo (ESER et al. 2006, KOJIMA et al. 2006), outros não encontraram tal associação (ANDRADE e SOARES 2006). VASSALLO e al. (2004) compararam a imunexpressão de FAS em material parafinado de pacientes com gastrite e linfoma gástrico MALT e encontraram expressão mais fraca nos linfomas, sugerindo que a baixa densidade das proteínas reguladoras da apoptose poderia estar envolvida na patogênese do linfoma MALT. Outros autores sugerem que ao menos um subgrupo de linfomas MALT, independentemente da translocação (11;18)(q21;21), escapa da via de controle do *Fas* por mutação ou inativação deste (SEEBERGER et al. 2001; GREINER et al. 1999).

1.5.3 Caspase-8

As caspases são proteases que usam a cisteína como grupo nucleofílico para substrato de clivagem, clivam ligações peptídicas na região carboxi-terminal do ácido aspartico. São sintetizadas na forma de proenzimas inativas que requerem processamento de resíduos internos para desempenhar sua atividade catalítica completa. Estruturalmente, as caspases são organizadas em um prodomínio, uma unidade grande e uma

pequena. Depois da sua ativação, as subunidades grande e pequena se separam do prodomínio e sofrem nova clivagem. As caspases são geralmente tetrâmeros, com duas subunidades grandes e duas pequenas, possuindo dois sítios ativos. A Caspase-8 é uma caspase iniciadora, por ter um prodomínio longo e é recrutada por moléculas ativadoras de caspase, como o FADD. Após a ativação da caspase-8, uma cascata de ativação de caspases se segue e a proteólise de um grande número de proteínas celulares que determina a morte celular programada (MURPHY e MARTIN 2003). SCHRANTZ et al. (2001) mostraram em células da linhagem BL41 do linfoma de Burkitt, que é possível que outras vias, independentemente do FADD, estejam envolvidas na apoptose dos linfomas de células B.

1.5.4 Granzima B

Linfócitos T citotóxicos e células NK (natural killer) possuem grânulos que são liberados na superfície de células alvo. Estes grânulos contêm uma variedade de enzimas citotóxicas; destas, as de maior interesse são a Granzima B e a perforina. A perforina forma poros na superfície celular, facilitando a entrada de outros grânulos na célula alvo. A Granzima B é uma serino-protease que cliva os resíduos de aspartato; desta forma a Granzima B é capaz de ativar Caspases-8 e 3 em células intactas e ativar o Bid, levando à liberação do citocromo c e desencadeando a apoptose por via mitocondrial (MURPHY e MARTIN 2003).

A ação citolítica das células T é mediada por duas vias: liberação de perforina, com granzimas e ativação de receptores de morte. A resistência à

ativação da via de apoptose, mediada pelos receptores de morte, foi descrita em alguns linfomas de células B. A expressão do inibidor de protease-9 (PI-9), que inativa seletivamente a ação da granzima B, é considerada por alguns autores um mecanismo de escape da resposta imunológica em linfomas. No entanto, este assunto é debatido por outros autores que acreditam que a importância da Granzima B como efetora na morte de células tumorais encontrada *in vitro* não se reproduz *in vivo* (GODAL et al. 2006; BOTS et al. 2006; GODAL et al. 2006).

1.5.5 STAT-1

As citocinas são mediadores da resposta imunológica. Elas controlam muitas funções celulares incluindo proliferação, diferenciação, apoptose e expressão de numerosos genes. Existem várias citocinas sintetizadas a partir de estímulos diversos, por células que participam da resposta imunológica inata, como macrófagos, monócitos, células dendríticas e da resposta adaptativa como linfócitos T e B. Independentemente da ação fisiológica, o meio da citocina exercer seu papel é agindo através de receptores específicos. A maquinaria que é responsável pela resposta biológica às citocinas é complexa e envolve a transdução do sinal. A via mais conhecida da sinalização intracelular é composta por duas famílias de moléculas: JAK e STAT. Diferentes receptores de citocinas utilizam várias combinações de JAKs e STATs para transdução de seus sinais (FULOP et al. 2006).

Os STATs , fatores de transdução e ativadores de transcrição de sinal, são uma família de fatores citoplasmáticos latentes que mediam a sinalização intracelular iniciada pela ligação da citocina ao receptor de superfície e transmitem o sinal ao núcleo. STAT-1 é ativado pelo interferon- γ (IFN- γ). Após a sua ativação, STAT-1 migra para o núcleo e se liga a um promotor específico que regula a expressão gênica. Os genes regulados pelos STATs incluem o receptor Fc- γ , a sintetase de óxido nítrico induzida (iNOS), o complexo maior de histocompatibilidade classe II e a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) (GONGORA et al. 2000).

Nas leucemias mielóides crônicas, JAKs e STATs podem regular a proliferação e diferenciação celular. A inibição da proliferação pode ser observada pelo uso de indometacina (ZHANG e FU 2006). Nas leucemias de células T associadas ao HTLV-1, estudos *in vitro* mostram que há uma fosforilação constitutiva da Janus kinases e das proteínas transdutoras de sinais e ativadoras de transcrição (STATs) e mostram associação entre a ativação de JAK3, STAT-1, STAT-3, STAT-5 e a progressão do ciclo celular (TAKEMOTO et al. 1997). A STAT-1 tem papel importante na apoptose, pode mediar o aumento da expressão de FAS e FAS-L em tecidos isquêmicos e depois de exposição ao IFN- γ (STEPHANOU e LATCHMAN 2003).

1.5.6 HLA-DR

As moléculas de HLA Classe II são glicoproteínas de superfície celular de grande importância na resposta imunológica adaptativa por

apresentarem peptídeos, derivados principalmente de proteínas extracelulares, ao receptor de antígenos de células T CD4+. A apresentação de antígenos mediada por moléculas de HLA Classe II é essencial para: o processo de seleção positiva e negativa que ocorre durante o desenvolvimento de células T CD4+ no timo e determina o repertório do receptor de células T (TCR), manter a homeostasia da população de células T CD4+ maduras na periferia, para iniciar, amplificar e regular a resposta imunológica protetora aos patógenos e tumores. Ainda é de fundamental importância na manutenção de tolerância, assim como na quebra de tolerância que ocorre em doenças auto-imunes.

A expressão de moléculas HLA de Classe II é restrita à células epiteliais tímicas e células especializadas na captura e apresentação de antígenos extracelulares. Estas designadas coletivamente, células apresentadoras de antígenos (APCs), incluem células linfóides B, macrófagos e monócitos, células dendríticas e no homem, células linfóides T ativadas. Existe uma regulação bem definida para modular a expressão das moléculas de Classe II: há um aumento da expressão em células linfóides B estimuladas por IL-4 e lipopolissacarídes (LPS) e nos macrófagos estimulados por IFN- γ . Por outro lado, a diferenciação de células linfóides B em plasmócitos e a maturação das células dendríticas determina a interrupção de síntese de novas moléculas de Classe II. Outras células como: astrócitos, fibroblastos, células endoteliais e células epiteliais, não expressam moléculas HLA Classe II a menos que sejam expostas a

estímulos específicos, particularmente ao IFN- γ , que é produzido durante a infecção, inflamação ou trauma (REITH et al. 2005).

A análise experimental de arranjo tecidual de tecido gástrico de camundongos BALB/c infectados por *Helicobacter felis* mostra os genes MHC de classe I e II, além de outros receptores de superfície e moléculas sinalizadoras, hiperexpressos em lesões pré-malignas e malignas de células B linfóides, mas não nas células B normais (MUELLER et al. 2005). A expressão de moléculas HLA-DR foi correlacionada ao prognóstico de pacientes com linfomas MALT, em estudo realizado por DAROM et al. (2004, 2006). Embora outros estudos indiquem o aumento da expressão de moléculas HLA no linfoma MALT, seu significado não foi correlacionado ao prognóstico.

1.5.7 S-100

A proteína S-100 é uma fração heterogênea de polipeptídeos diméricos (subunidades α e β) que pode ser encontrada em vários tecidos e apresentar formas e combinações diferentes. A maior parte das células do sistema linforeticlar que são positivas para a proteína S-100 são células dendríticas envolvidas na resposta imunológica: células reticulares interdigitantes, células de Langerhans, células foliculares dendríticas, células dendríticas intersticiais e células do sistema fagocítico mononuclear S-100 positivas.

As células dendríticas não foliculares têm origem na medula óssea e dividem as etapas iniciais de maturação com os monócitos; a origem das

células foliculares dendríticas ainda é controversa. A coloração imunohistoquímica para a proteína S-100 pode ser útil para o estudo de certas doenças malignas do sistema imunológico, por caracterizar o microambiente de alguns linfomas e por auxiliar a classificação das doenças proliferativas de células dendríticas e de macrófagos (CARBONE et al. 1986; PILERI et al. 2002).

O *Helicobacter pylori* interage com as células dendríticas, promovendo sua maturação, migração e induzindo resposta imunológica e produção de citocinas (HAFSI et al. 2004; KAO et al. 2006). As células dendríticas respondem prontamente aos estímulos desencadeados por produtos bacterianos e têm papel central na apresentação de antígenos (WILSON e CRABTREE 2007). A participação de células dendríticas na infecção crônica pelo *Helicobacter pylori* e na patogenia do linfoma gástrico MALT tem sido pouco estudada, embora estas células estejam numericamente aumentadas e possam representar o ponto chave de interligação da resposta imunológica inata e da resposta adaptativa (KRAUSS-ETSCHMANN et al. 2005; MUELLER et al. 2005).

1.5.8 NOS-2

O óxido nítrico é produto de uma reação catalizada pela sintetase do óxido nítrico (NOS). Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que podem levar a danos no DNA são produzidas por neutrófilos ativados presentes na mucosa gástrica inflamada. Estas espécies reativas não agredem somente a mucosa, como também têm potencial para agredir organismos infectantes.

Estudos recentes mostraram que o *Helicobacter pylori* é capaz de induzir a produção de iNOS(indutor da sintetase de óxido nítrico) e ao mesmo tempo produzir arginase e RocF que competem com a iNOS ou com a espermina que inibe a sintetase de óxido nítrico induzível, possibilitando assim sua permanência na mucosa gástrica (ISRAEL e PEEK 2006). LI et al. (2004) observaram aumento da expressão imunohistoquímica para iNOS e COX-2 nos linfomas gástricos MALT e sugeriram que as duas proteínas podem contribuir em sinergia para o desenvolvimento do linfoma gástrico MALT.

1.5.9 c-Rel

A família de fatores de transcrição NF- κ B têm sido foco de investigação há duas décadas. Sua participação na regulação das respostas celulares de adaptação e plasticidade aos estímulos do meio ambiente se dá através da regulação da expressão de diversos genes. O papel mais importante do NF- κ B é na regulação da expressão de genes do sistema imunológico, no qual regula a expressão de citocinas, fatores de crescimento, enzimas efetoras produzidas em resposta à ligação de receptores envolvidos na resposta imunológica como: receptor de célula T (TCR), receptor de célula B (BCR), receptor do fator de necrose tumoral (TNF-R), CD-40, BAFFR, LT β R, e a família Toll/IL-1R. A família NF- κ B regula a expressão de outros genes, influenciando múltiplos aspectos da fisiologia normal e da patologia (HAYDEN e GHOSH 2004).

Os cinco membros da família NF- κ B: p-65 (Rel-A), RelB, c-Rel, p50/105 (NF- κ B1) e p-52/p100 (NF- κ B2) , encontram-se no citoplasma das

células não estimuladas na forma de homodímeros ou heterodímeros, ligados a um membro da família I- κ B. A característica das proteínas da família NF- κ B é possuir um domínio homólogo Rel (RHD) de 300 aminoácidos conservados, localizado no N terminal da proteína, responsável pela dimerização, interação com as proteínas I- κ B e ligação ao DNA. As proteínas inibitórias da família I- κ B impedem a translocação do complexo NF- κ B /I- κ B ao núcleo, mantendo o NF- κ B inativo no citosol. As proteínas p105 e p100, precursoras do p50 e p52, por possuírem um domínio semelhante ao da I- κ B, podem atuar como proteínas inibitórias. A ativação do complexo e transporte do NF- κ B ao núcleo exige a degradação do I- κ B, ou da p105 e p100, que ocorre por proteólise mediada pela ubiquitina (HAYDEN e GHOSH 2004).

Os membros da família NF- κ B têm funções específicas na linfopoese. O complexo que predomina nas células linfóides precursoras é o p50/p65. As células linfóides B maduras expressam constitutivamente c-Rel no núcleo, além do p50/p65, enquanto os plasmócitos e as células B estimuladas por LPS expressam todas as isoformas (p52, RelB, c-Rel, p50 e p65). A expressão do c-Rel nas linhagens linfóides maduras é a principal responsável pela ativação, expansão clonal e pelas funções efetoras (LIOU e HSIA 2003).

A zona marginal de células B do folículo linfóide é o local onde os antígenos microbianos são reconhecidos levando à diferenciação de células B maduras para plasmócitos e a produção de anticorpos. Em camundongos, a formação da zona marginal pode estar completamente ausente na

ausência de p50, ou muito prejudicada na ausência de c-Rel e p65 (LIOU e HSIA 2003).

O c-Rel é crucial para manter a viabilidade das células B e promover a progressão do ciclo celular. A deleção do c-rel nas células B promove a diminuição da expressão do gene das interleucinas IL-6, IL-10, e IL-15, o que favorece a sobrevivência dos linfócitos. Por outro lado, o c-Rel também está envolvido na expressão do Bcl-xL, Bfl-1 e Mcl-1, genes antiapoptóticos. Nas células linfóides T, ele é crítico para a expressão de IL-2, IL-3, GM-CSF e IFN- γ . Existem funções biológicas que são específicas do c-Rel. Foi demonstrado que células B sem c-rel são sensíveis a estímulos apoptóticos como irradiação gama, dexametasona e sinalização antigênica (LIOU e HSIA 2003).

A participação dos fatores de transcrição da família NF- κ B vem sendo amplamente estudada no desenvolvimento do câncer. As alterações nos genes *nf- κ b* ou *i κ b* foram descritas inicialmente em algumas neoplasias linfóides, em outras neoplasias, foram descritas disfunções relacionadas às vias de sinalização e ativação do NF- κ B (NERI et al. 1991; FRACCHIOLLA et al. 1993; TURCO et al. 2004). A ativação do NF- κ B pode determinar uma vantagem proliferativa interferindo na apoptose, induzindo a expressão de inibidores da caspase e membros da família bcl-2.

Notavelmente a única subunidade do NF- κ B oncogênica é o c-Rel. A amplificação do c-Rel é a descrita em linfomas de células B humanos. O c-Rel é o gene correspondente ao v-Rel, que causa leucemias e linfomas agressivos em camundongos transgênicos. A amplificação do c-Rel é

descrita em mais de 20% dos Linfomas de Grandes Células, nos linfomas de Hodgkin clássicos e em alguns linfomas foliculares e de mediastino. Nos linfomas de Hodgkin, há uma correlação da alteração do gene *c-Rel* com a expressão da proteína no núcleo celular, sugerindo uma ativação constitutiva do fator de transcrição (BARTH et al. 2003; TURCO et al. 2004; GILMORE et al. 2004).

A proteína de fusão, API-2 MALT-1, encontrada nos linfomas MALT com translocação (11;18) (q21;q21) também tem sido relacionada com a ativação de NF- κ B. HO et al. (2005) demonstraram experimentalmente, que em células B humanas (BJAB), a superexpressão do API-2-MALT1 e do MALT-1 determina aumento da atividade das subunidades do NF- κ B e da ativação da I- κ B kinase (IKK), induzida pelo estímulo do CD40. Simultaneamente, a expressão dos mesmos transgenes protege a célula BJAB da morte induzida por FAS (CD95), determinando uma vantagem proliferativa.

1.5.10 BCL-10

Alguns autores identificaram superexpressão do Bcl-10 em linfomas MALT t(1,14)(p22;32) e demonstraram que as formas mutantes do Bcl-10 não estavam envolvidas com a apoptose, como ocorre com a forma selvagem, mas conferiam uma vantagem proliferativa ao tumor (ZHANG et al. 1999).

A translocação t(1;14)(p22;32) leva à justaposição do gene *Bcl-10* ao gene da cadeia pesada da imunoglobulina, com subsequente

superexpressão do Bcl-10. O Bcl-10 contém um domínio recrutador de caspase que, nos linfócitos T e B faz a conexão entre os receptores de antígenos (TCR e BCR) e a ativação dos fatores NF- κ B (NERI et al. 1991; FRACCHIOLLA et al. 1993). Acredita-se que a superexpressão do Bcl-10 possibilite a oligomerização deste com o domínio CARD, sem que seja necessário o estímulo antigênico e assim ocorra a oligomerização do MALT-1 e a ativação aberrante do NF- κ B. No linfoma MALT com t(14,18)(q32;21), MALT-1 é superexpresso. A oligomerização do MALT1 é dependente do Bcl-10, levando à ativação do NF- κ B. Nos linfomas MALT com t(14,18)(q32;21), o Bcl-10 e o MALT-1 estão superexpressos no citoplasma (ISAACSON e DU 2004).

Neste estudo avaliaremos os fatores moleculares acima referidos em fragmentos de biópsias de pacientes com diagnóstico de linfoma gástrico MALT, procurando identificar o padrão de expressão no linfoma e as diferenças entre o padrão de expressão no tumor, nas gastrites e nos estômagos normais.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Baseado no conhecimento atual da etiopatogenia do Linfoma MALT, o presente estudo tem o objetivo de analisar a expressão protéica por imunohistoquímica de moléculas ligadas à (1) via extrínseca da apoptose, (2) resposta imunológica adaptativa e inflamatória e (3) a via de sinalização do NF- κ B, comparando casos humanos agrupados com processo inflamatório mínimo (estômago normal), gastrite crônica e linfoma MALT gástrico. As proteínas avaliadas são:

- 1 via extrínseca da apoptose: FAS, FAS-L, caspase-8 e granzima B;
- 2 resposta imunológica adaptativa e inflamatória: STAT-1, HLA-DR, S-100, sintase do óxido nítrico induzida (NOS-2);
- 3 a via de sinalização do NF- κ B: Bcl10.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Este é um estudo retrospectivo descritivo, onde foram avaliados casos diagnosticados como linfoma gástrico do Hospital do Câncer e da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, no período de 1980-2004. Os casos foram identificados pelo registro do Departamento da Anatomia Patológica e pela revisão de prontuários. Os blocos de parafina foram resgatados dos arquivos dos Departamentos de Anatomia Patológica e, aqueles que se encontravam disponíveis e em boas condições deram origem a novos cortes. O primeiro corte de cada bloco foi corado pela técnica tradicional de hematoxilina-eosina (HE). As lâminas obtidas foram revisadas e o material foi classificado segundo os critérios da O.M.S. 2001 (JAFFE et al. 2001). Os prontuários foram obtidos através do registro hospitalar. Os dados demográficos dos pacientes, registrados nos prontuários, foram tabulados e categorizados quanto a idade, cor da pele, sexo e estadiamento (Anexo 1). Este foi definido de acordo com dados do prontuário médico, seguindo o estadiamento de Ann Arbor (Anexo 2).

A revisão anatomo-patológica associada à revisão dos prontuários médicos possibilitou a seleção de casos com diagnóstico de linfoma MALT, cujo sítio de comprometimento primário foi o estômago. Foram incluídos casos que após o diagnóstico não foram acompanhados no serviço. Foram

excluídos os casos de linfoma gástrico cujo material era inadequado para o estudo e aqueles nos quais o componente de grandes células predominava. Os linfomas negativos para o anticorpo CD-20 ou CD-20 positivos com positividade para ciclina D1 e/ou CD5 foram excluídos.

O grupo controle foi constituído por amostras de biópsias endoscópicas encaminhadas seqüencialmente para exame anátomo-patológico no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo. Um grupo de 35 pacientes submetidos à biópsia gástrica com gastrite mínima, sem atividade ou atrofia, denominado estômago normal (grupo normal) e outro de 28 pacientes com diagnóstico de gastrite intensa e lesão tecidual (grupo gastrite) foi selecionado para análise comparativa. O grupo gastrite selecionado foi constituído de material de biópsia de 17 gastrites crônicas sem atividade evidente, 8 gastrites crônicas atróficas com metaplasia intestinal, 2 gastrites atróficas e 1 gastrite crônica em atividade. Assim o estudo foi realizado com o material obtido de três grupos: o primeiro, controle sem lesão tecidual, denominado doravante normal; o segundo, controle denominado gastrite e o terceiro, linfoma gástrico, denominado MALT.

3.2 AMOSTRAS

Foram analisadas 56 amostras de linfomas gástricos MALT, das quais 38 foram obtidas por endoscopia com biópsia gástrica e 18 por gastrectomia. Para otimizar o material e facilitar a análise, os cortes histológicos dos

blocos destes 56 linfomas MALT foram organizados em 18 conjuntos e fixados em 18 lâminas.

As amostras do grupo MALT, do grupo normal e das gastrites foram organizadas da mesma forma, em conjuntos e fixadas em 13 lâminas.

3.3 FATORES MOLECULARES – IMUNOISTOQUÍMICA

Todos os casos foram avaliados quanto à presença de *Helicobacter.pylori* através das colorações de hematoxilina-eosina, Giensa modificado e também utilizando o anticorpo policlonal obtido de coelho (CMA433, Cell Marque). Empregamos anticorpos comerciais para avaliar proteínas associadas à apoptose, FAS (sc715,Santa Cruz), FAS-L (sc834,Santa Cruz), Caspase-8 (NCL-Casp8, Novocastra) e Granzima B (M7235, DakoCytomation), proteínas associadas à apresentação de antígenos e ao processo inflamatório, STAT-1 (sc346, Santa Cruz), HLA-DR (NCL-LN3, Novocastra), S-100 (Z0311, DakoCytomation) e NOS-2 (N32020,BD Biosciences); e proteínas que participam da via de ativação do NF- κ B (Bcl-10 e c-Rel). As características de cada anticorpo estão descritas abaixo no Quadro 1 e o protocolo das reações imunoistoquímicas no Anexo 3.

Quadro 1 - Anticorpos utilizados, seus clones, diluições de trabalho, concentração protéica inicial, origem e tecido utilizado como controle positivo.

Anticorpos	Clones	Títulos	Concentração Proteica	Fabricantes/código	Controle da reação
<i>Helicobacter. Pylori</i>	Policlonal feito em Coelho	1:100	Sem informação	Cell Marque, Corp, Hot Spring, EUA, cod # CMC433	Mucosa gástrica infectada
FAS (C20)	Policlonal feito em Coelho	1:300	200 µg/ml	Santa Cruz cod # sc715	Amígdala
FAS-L (N20)	Policlonal feito em Coelho	1:300	200 µg IgG/ml	Santa Cruz cod # sc834	Amígdala
Caspase 8	11B6	1:50	Sem informação	Novocastra, cod # NCL-Casp8	Carcinoma lobular de mama
Granzima B	GrB7	1:200	60 mg/ml	DakoCytomation, cod # M7235	Baço, amígdala
STAT-1 p84-p91	Policlonal feito em Coelho	1:3000	200 µg/ml	Santa Cruz cod # sc346	Amígdala
HLA-Class II (DR)	LN-3	1:100	Sem informação	Novocastra, New Castle, Reino Unido, cod # NCL-LN3	amígdala ou linfonodo
Proteína S-100	Policlonal feito em Coelho	1:3000	4,5g/L	DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca, cod# Z0311	Linfonodo, cérebro, pele
NOS type II (i-NOS)	Ac feito em Coelho	1:50	250 µg/ml	BD Biosciences, San Jose, EUA, cod # N32020	pulmão
c-Rel (N466)	Policlonal feito em Coelho	1:200	200 µg/ml	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA, cod # sc272	amígdala
Bcl10	151	1:1000	184 µg/ml	Zymed, San Francisco, EUA, Cod# 18-0275	amígdala

3.4 ANÁLISE MICROSCÓPICA DOS FATORES MOLECULARES-

A presença de *Helicobacter pylori* foi considerada como positividade, independentemente do número de bactérias.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico e os resultados dos demais anticorpos classificados em relação ao número de células positivas.

As reações para avaliar a expressão protéica de FAS, FAS-L, caspase 8, STAT-1, HLA-DR, S-100, NOS-2 e c-Rel foram agrupadas à semelhança da escala proposta por VASSALLO et al. (2004) descrita no Quadro 2.

Quadro 2 - Escala de gradação imunoistoquímica para FAS e FAS-L, Caspase 8, STAT-1, HLA-DR, S-100, NOS-2 e c-Rel.

Gradação	Percentual de células reativas
0	Sem reatividade
+1	Até 10% de células reativas
+2	>10 a 40% de células reativas
+3	>40 a 90% de células reativas
+4	>90% de células reativas

Para a gradação da intensidade da reação da Granzima B, contamos o número de células com grânulos citoplasmáticos corados nos locais de maior infiltrado inflamatório em cinco campos de grande aumento (Quadro 3).

Quadro 3 - Escala de gradação imunoistoquímica para Granzima B.

Gradação	Percentual de células reativas/ cinco campos
0	Sem reatividade
+1	Até 10 células reativas
+2	>10 a 50 células reativas
+3	>50 de células reativas

O padrão de reatividade para o Bcl-10 foi escalonado de acordo com sua localização e intensidade (Quadro 4).

Quadro 4 - Escala de gradação para o Bcl-10.

Gradação	Padrão de reatividade
0	Sem reatividade
+1	Coloração apenas citoplasmática
+2	Coloração nuclear fraca
+3	Coloração nuclear forte

As leituras foram realizadas por dois observadores (FAS e CSVV), que avaliaram o conjunto com todos os casos, por anticorpo. Pacientes e controles foram observados no mesmo dia, para possibilitar menor variabilidade. A partir destas leituras foram descritos o padrão e o percentual de reatividade para cada anticorpo.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A casuística foi caracterizada através da estatística descritiva (média, mediana e proporções). A comparação da média de idade entre os três grupos foi realizada através da Análise de Variância (ANOVA), adotando-se o teste de Tukey HSD para as comparações múltiplas (post-hoc). Para verificar a associação de cor da pele e de gênero entre os grupos do estudo foi empregado o teste de qui-quadrado.

A comparação de prevalência de *Helicobacter pylori* entre os três grupos foi realizada pelo teste de qui-quadrado (alfa=5%). Para as múltiplas comparações dois a dois adotou-se a correção de Bonferroni estabelecendo-se o erro alfa em 1,67%.

A intensidade da expressão imunoistoquímica (variável ordinal) dos marcadores biomoleculares foi caracterizada através da mediana e também através da média dos postos obtida nas análises não paramétricas.

O teste não paramétrico de Kruskal Wallis foi utilizado para comparar a intensidade de expressão dos marcadores entre os 3 grupos (alfa=5%). Para as comparações múltiplas adotou-se o teste de Mann-Whitney com a correção de Bonferroni para o erro alfa (alfa=1,67%)

RESULTADOS

4 RESULTADOS

A casuística foi composta por uma combinação de casos recolhidos dos registros dos Departamentos de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer AC Camargo e da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

No banco de dados do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer AC Camargo foram registrados 130 casos com topografia “estômago” e diagnóstico de “linfoma” no período de 1984 à 2004. Após a revisão anátomo-patológica, 49 casos foram caracterizados como linfoma extranodal de células B da zona marginal do tecido linfóide associado à mucosa, ou linfoma gástrico do tipo MALT. Os demais 81 casos, excluídos do estudo, distribuíam-se em: 54 casos de linfoma difuso de grandes células, 3 casos de linfoma de Burkitt, 2 casos de linfoma folicular, 1 linfoma linfocítico, 1 linfoma esplênico da zona marginal, 1 linfoma T anaplásico de grandes células, 1 linfoplasmablastico e 18 casos não puderam ser avaliados por inadequação do material disponível. Dos 49 casos diagnosticados como linfoma gástrico do tipo MALT, 25 tinham blocos disponíveis e foram incluídos no estudo.

No Departamento de Anatomia Patológica da Santa Casa de São Paulo, o banco de dados continha 45 casos de linfoma gástrico registrados de 1991 a 2002, dos quais 24 blocos foram selecionados com diagnóstico de linfoma gástrico do tipo MALT. Além dos casos do Hospital Central da Santa Casa de São Paulo, sete casos de linfoma gástrico do tipo MALT, oriundos

dos Hospitais de Guarulhos e Santa Isabel, pertencentes à Irmandade de Misericórdia da Santa Casa de São Paulo, foram incluídos no estudo.

A casuística dos dois serviços possibilitou a avaliação de 56 casos de linfoma gástrico do tipo MALT, 28 do gênero masculino e 28 do gênero feminino. A idade variou de 25 a 85 anos (média= 55,84, DP=13,54, mediana=52). A cor da pele branca foi descrita em 89% dos pacientes (n=50), amarela em 7% (n=4) e preta em 4% (n=2). Em 34 casos havia descrição do estágio ao diagnóstico. Destes 47% (n=16) encontravam-se no estágio IE, 15% (n=5) estágio IIE, 11,7% (n=4) no estágio IIIE e 26,4% (n=9) no estágio IV E (Anexo 1).

O grupo controle normal foi constituído por 35 casos, a idade variou de 22 a 76 anos (média=52,76, DP=15,83, mediana=55), 15 casos do gênero masculino e 18 do feminino, dois casos não foram avaliados quanto ao gênero. A cor da pele foi descrita em 25 casos do grupo normal, sendo branca em 88% (n=22), amarela em 2% (n=1) e preta em 8% (n=2).

O grupo controle de gastrites foi constituído por 28 casos, a idade variou de 37 a 87 anos (média=63,08, DP=13,97, mediana=60), 15 casos do gênero masculino e 13 do feminino. A cor da pele foi descrita em 25 casos do grupo de gastrites, sendo branca em 92% (n=23) e preta em 8% (n=2).

Não houve diferenças entre os grupos quanto à cor da pele (p=0,998), gênero (p=0,816) e tampouco quando comparamos as idades do grupo MALT e do normal (p=0,591) e do grupo MALT com o grupo gastrite (p=0,089). A idade do grupo gastrite foi superior à do grupo normal (p=0,019).

4.1 IMUNOISTOQUÍMICA

4.1.1 *Helicobacter pylori*

Os resultados em relação à coloração imunoistoquímica para o *Helicobacter pylori* encontram-se na Tabela 1 e as fotos representativas, na Figura 3.

A presença do *Helicobacter pylori* pôde ser vista com a marcação imunoistoquímica em 41 dos 56 casos de linfoma gástrico MALT (73%). No normal, o *Helicobacter pylori* foi identificado em 3 de 35 casos (8,6%); na gastrite, em 12 dos 28 casos avaliados (42,86%).

A gradação para o *Helicobacter pylori* foi baseada no achado de bactéria nos cortes corados por imunistoquímica: 0 na ausência de bactérias visíveis (Tabela 1, Figura 4 A) e 1 na presença de bactérias (Figura 4 B e 4 C).

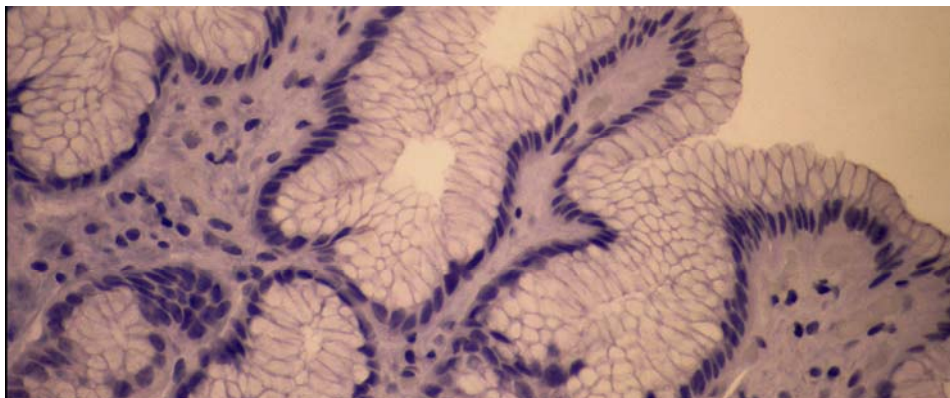
Tabela 1 - Número e percentual das amostras segundo a expressão do *Helicobacter pylori*.

	NORMAL(n)	%	GASTRITE (n)	%	MALT(n)	%
HP* neg0	31	88,57%	15	53,57%	14	25%
HP* pos1	3	8,57%	12	42,86%	41	73,21%
NA**	1	2,86%	1	3,57%	1	1,79%
Total (n)	35	100%	28	100%	56	100%

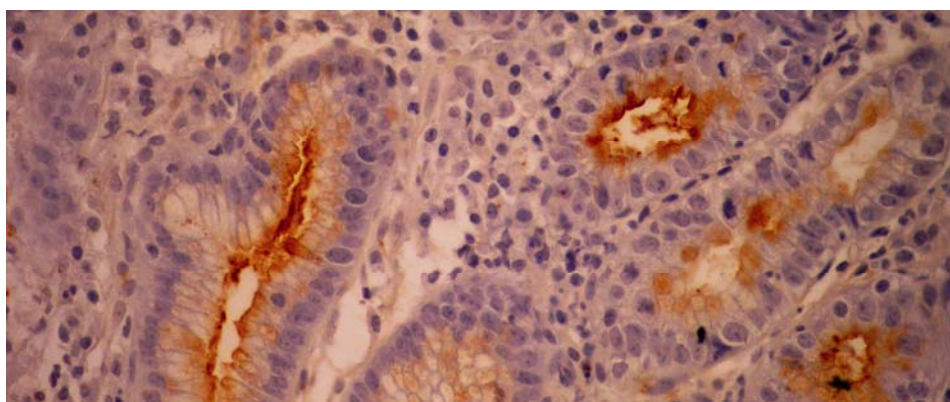
*HP= *Helicobacter pylori* , **NA= não avaliável

A análise estatística dos dados mostrou diferença na freqüência de *Helicobacter pylori* ($p < 0,0001$). Foi estatisticamente significativa a diferença

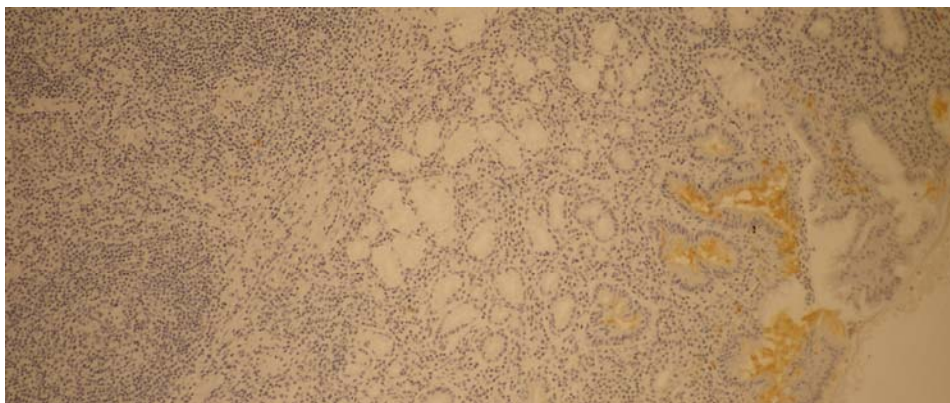
de positividade para o *Helicobacter pylori* entre os grupos normal e gastrite, normal e MALT e entre o grupo gastrite e MALT (considerando erro alfa de 1,67%; $p=0,0022$; $p<0,0001$ e $p=0,0149$ respectivamente).



4 A – Reação imunoistoquímica negativa, 400x.



4 B – Reação imunoistoquímica positiva, 400x.



4 C – Reação imunoistoquímica positiva, 40x.

Figura 4 - Fotomicrografias da reação imunoistoquímica para o *Helicobacter pylori* em mucosa gástrica.

4.2 FATORES MOLECULARES ENVOLVIDOS NA VIA EXTRÍNSECA DA APOPTOSE

4.2.1 FAS-L

Os resultados em relação à coloração imunoistoquímica para o FAS-L encontram-se na Tabela 2. Os dados da análise estatística encontram-se nas Tabelas 13 e 14.

O marcador imunoistoquímico para o FAS-L/CD95L apresentou padrão de coloração citoplasmática com reforço de membrana. No estômago normal, as poucas células inflamatórias coraram moderadamente. As células do processo inflamatório, na gastrite, tiveram marcação intensa e as células dendríticas e os plasmócitos que permeiam o processo inflamatório eram igualmente marcados. A coloração no interstício era intensa e difusa (“background”) o que dificultou a análise (Figura 5A).

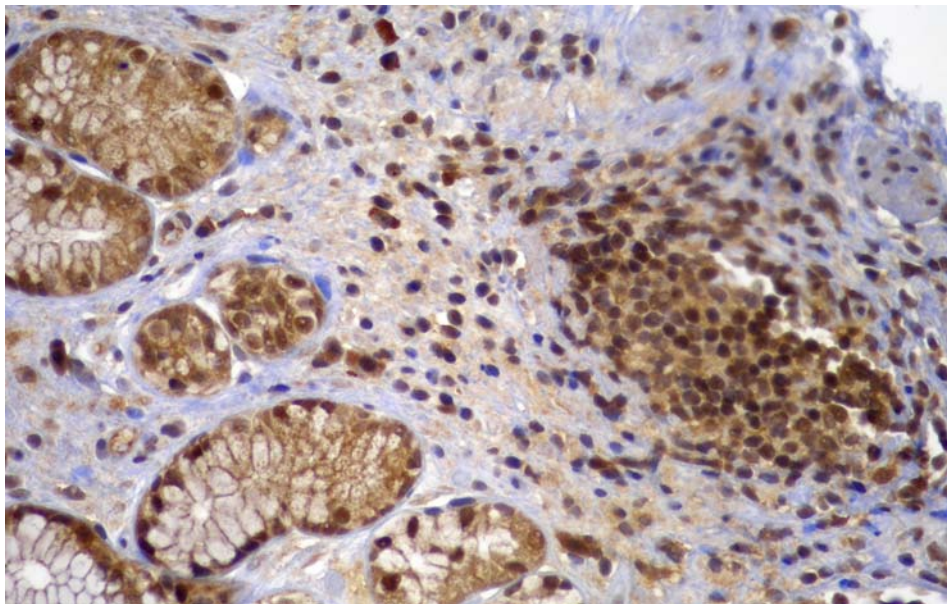
No grupo de pacientes com linfoma MALT, a marcação do FAS-L/CD95L foi vista com grande intensidade nas células do processo inflamatório e era positiva no centro germinativo reacional (Figura 5B). No entanto, as células tumorais apresentaram coloração fraca (Tabela 2).

Tabela 2 - Número e percentual das amostras segundo a expressão protéica do FAS-L.

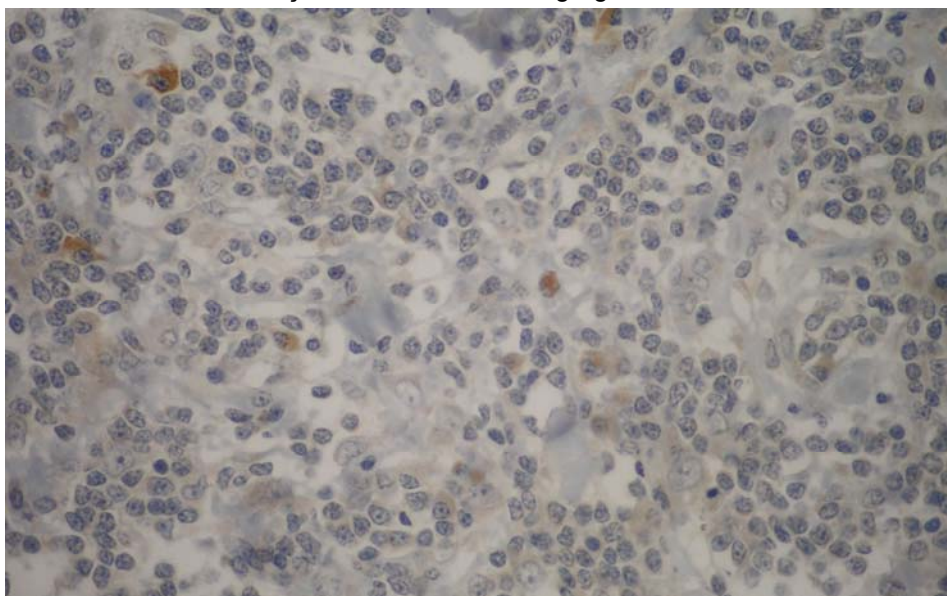
	NORMAL(n)	%	GASTRITE(n)	%	MALT(n)	%
FAS-L +1	0	0%	0	0%	36	64,29%
FAS-L +2	7	20%	1	3,57%	13	23,21%
FAS-L +3	22	62,86%	6	21,43%	7	12,50%
FAS-L +4	4	11,43%	18	64,29%	0	0%
NA*	2	5,71%	3	10,71%	0	0%
Total	35	100%	28	100%	56	100%

* NA =não avaliável

Para realizar a análise estatística excluimos os casos não avaliáveis. Houve diferença estatisticamente significativa da marcação para o FAS-L entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis $p < 0,001$). Na análise de múltiplas comparações foram observadas diferenças entre MALT e normal, MALT e gastrite, normal e gastrite ($p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$ respectivamente).



5 A – Reação inflamatória com agregado linfóide, 400x.



5 B – Células linfóides do tumor negativas, com raros linfócitos e plasmócitos Corados, 400x.

Figura 5 - Fotomicrografia da reação imunoistoquímica para o FAS em mucosa gástrica.

4.2.2 FAS

Os resultados em relação à coloração imunoistoquímica para o FAS encontram-se na Tabela 3. Os dados da análise estatística, nas Tabelas 13 e 14.

A reação para o FAS/CD95 tem expressão de membrana e citoplasmática. A coloração foi extremamente intensa em todas as células inflamatórias, sendo muito forte nas gastrites (Figura 6A).

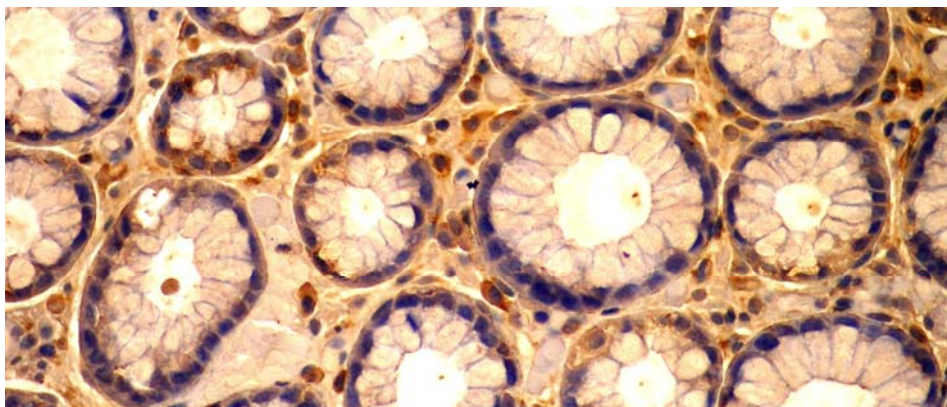
No linfoma MALT houve marcação moderada para o FAS/CD95 nas células tumorais, alguns agregados linfóides não coraram, existia faixas de tumor no meio do processo inflamatório claramente negativas (Figura 6B e 6C). Nas células epiteliais da superfície da mucosa gástrica havia positividade moderada, com maior intensidade na zona proliferativa da glândula gástrica (Tabela 3).

Tabela 3 - Número e percentual das amostras segundo a expressão protéica do FAS.

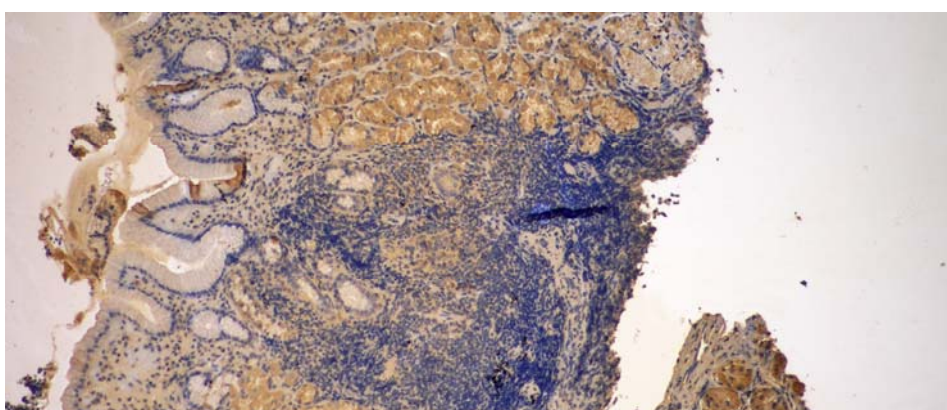
	NORMAL(n)	%	GASTRITE(n)	%	MALT(n)	%
FAS +1	0	0%	0	0%	3	5,36%
FAS +2	2	5,71%	0	0%	3	5,36%
FAS +3	3	8,57%	3	10,71%	29	51,78%
FAS +4	29	82,86%	24	85,72%	20	35,71%
NA	1	2,86%	1	3,57%	1	1,79%
Total	35	100%	28	100%	56	100%

* NA = não avaliável

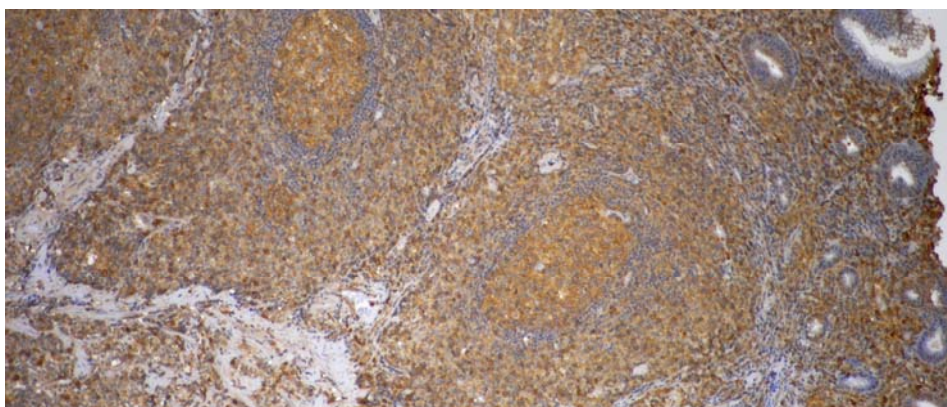
Para a análise estatística foram excluídos os casos não avaliáveis. Houve diferença estatisticamente significativa da expressão protéica de FAS entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis $p < 0,001$). Na análise de múltiplas comparações foram observadas diferenças entre MALT e normal, MALT e gastrite ($p < 0,001$, $p < 0,001$ respectivamente). Não houve diferença significativa entre o grupo gastrite e o grupo normal.



6 A – Padrão da reação nas células inflamatórias da gastrite, 400x.



6 B – Áreas tumorais que não coram, 40x.



6 C – Marcação moderada para o anticorpo no tumor, 40x.

Figura 6 – Fotomicrografias da reação imunoistoquímica para o FAS em mucosa gástrica.

4.2.3 Caspase-8

Os resultados em relação à coloração imunoistoquímica para a Caspase-8 encontram-se na Tabela 4, Figura 7. Os dados da análise estatística nas Tabelas 13 e 14.

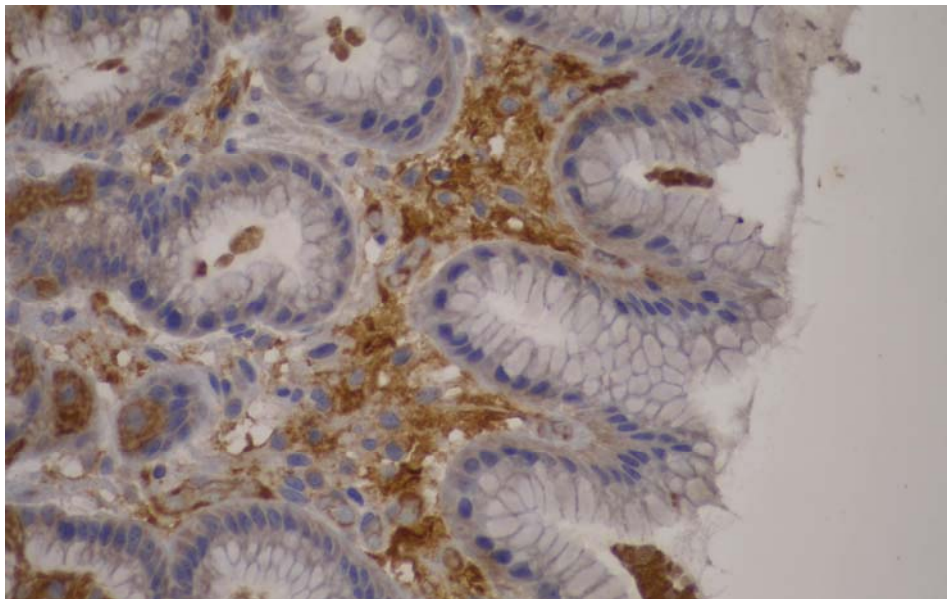
A reação para a Caspase 8, quando positiva, conferiu padrão citoplasmático granular. No grupo controle, estômago normal, foram poucas as células que coraram para Caspase 8. À medida em que aumentava o processo inflamatório, nas gastrites foi visto maior número de células coradas (Figura 7A). Nas células necróticas do processo inflamatório a marcação podia ser identificada no núcleo. No centro germinativo do folículo linfóide existiam algumas células coradas. No tecido tumoral a expressão foi variável, marcando intensamente o citoplasma das células de alguns tumores e fracamente de outros (Tabela 4, Figura 7B)

Tabela 4 - Número e percentual das amostras segundo a expressão protéica da Caspase 8.

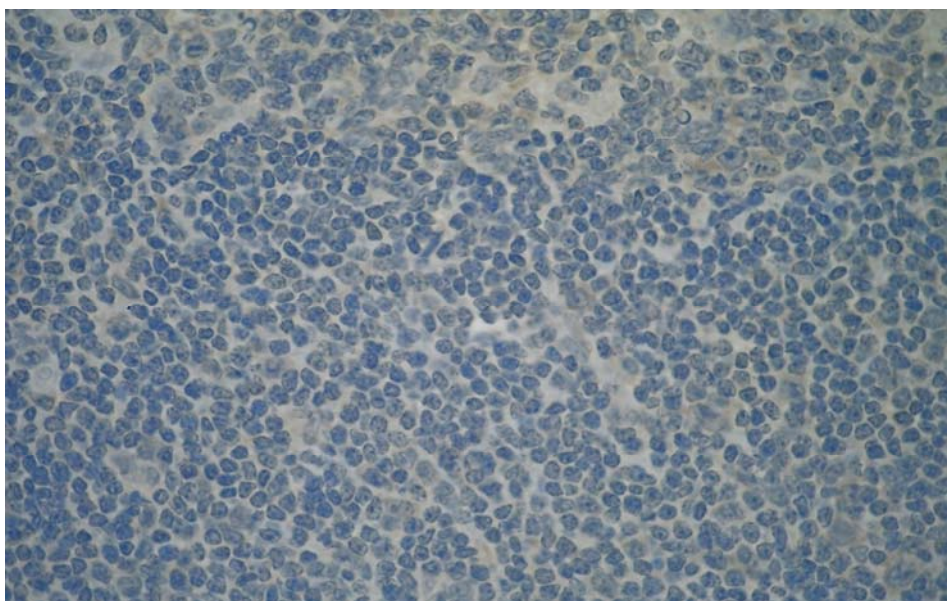
	NORMAL(n)	%	GASTRITE(n)	%	MALT(n)	%
*casp-8 +1	10	28,57%	6	21,43%	26	46,43%
*casp-8 +2	14	40%	4	14,29%	13	23,21%
*casp-8 +3	10	28,57%	14	50%	15	26,78%
*casp-8 +4	0	0%	2	7,14%	1	1,79%
NA*	1	2,86%	2	7,14%	1	1,79%
Total	35	100%	28	100%	56	100%

*caspase-8, ** NA =não avaliável

Foram excluídos os casos não avaliáveis para a análise estatística. Houve diferença estatisticamente significativa na marcação para a Caspase-8 entre os grupos ($p=0,017$). A análise de múltiplas comparações mostrou diferença significativa apenas entre o MALT e a gastrite ($p=0,006$).



7 A – Padrão de reação citoplasmática granular, corando intensamente as células inflamatórias da gastrite, 400x.



7 B – Células tumorais mostrando fraca reatividade para o anticorpo, 400x.

Figura 7 - Fotomicrografias da reação imunoistoquímica para o Caspase-8 (sub-unidade p-18) em mucosa gástrica.

4.2.4 Granzima B

Os resultados em relação à coloração imunoistoquímica para a Granzima B podem ser observados na Tabela 5. Os dados da análise estatística nas Tabelas 13 e 14.

A reação positiva para a Granzima B teve padrão granular citoplasmático. No controle da reação, realizado em tecido de amígdala, uma célula em meio a muitos linfócitos caracterizava a positividade, com fácil identificação devido ao padrão granular e intensidade moderada.

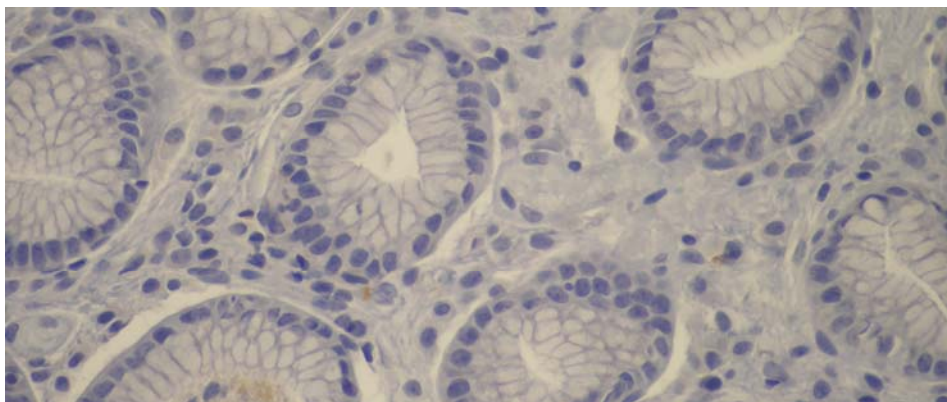
Para a gradação da freqüência da reação, contávamos o número de células com grânulos citoplasmáticos corados em cinco campos de grande aumento, nos locais com maior infiltrado inflamatório. No grupo normal, eram raras as células linfóides isoladas positivas (Figura 8A). Não foi observada positividade aumentada para anti-Granzima B nos processos inflamatórios mais intensos das gastrites (Tabela 5, Figura 8B). No grupo MALT a positividade aumentava significativamente (Figura 8C).

Tabela 5 - Número e percentual das amostras segundo a expressão protéica de Granzima B.

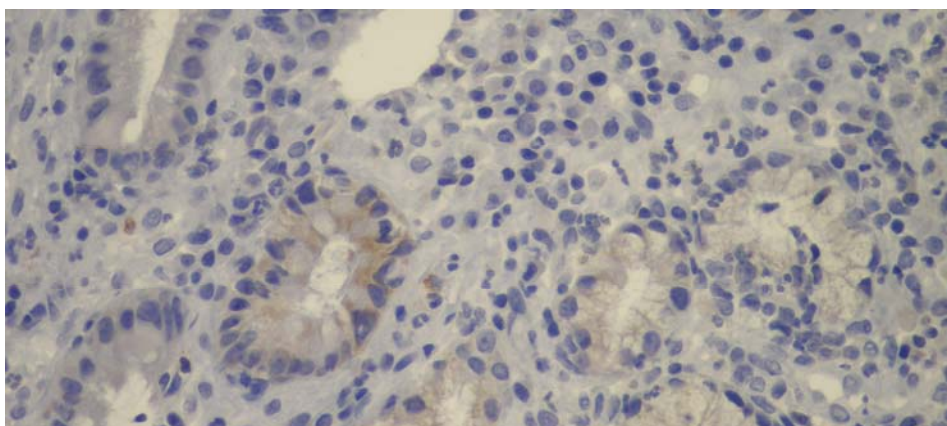
	NORMAL(n)	%	GASTRITE(n)	%	MALT(n)	%
Granzima B +1	14	40%	5	17,86%	7	12,50%
Granzima B +2	19	54,28%	20	71,43%	25	44,64%
Granzima B +3	1	2,86%	2	7,14%	7	12,50%
Granzima B +4	0	0%	0	0%	12	21,43%
NA*	1	2,86%	1	3,57%	5	8,93%
Total	35	100%	28	100%	56	100%

* NA = não avaliável

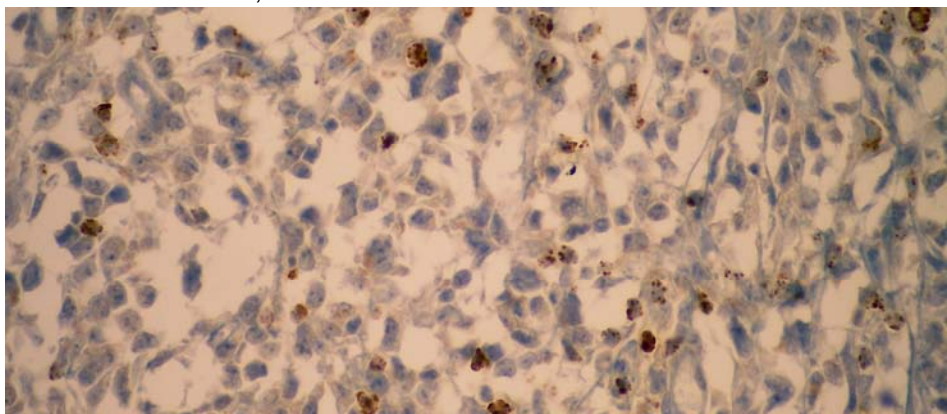
Para a análise estatística foram excluídos os casos não avaliáveis. Houve diferença estatisticamente significativa da marcação para a Granzima B entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis $p < 0,001$). A análise de múltiplas comparações mostrou diferença significativa entre o MALT e o normal ($p < 0,001$) e entre o MALT e a gastrite ($p = 0,014$). Não houve diferença significativa entre a gastrite e o normal.



8 A – No estômago normal, com raras células positivas, 400x.



8 B – Reatividade fraca para Granzima B nas gastrites com processo Inflamatório, 400x.



8 C – No tumor o padrão de reatividade é citoplasmático e granular, expressando-se com maior intensidade, 400x.

Figura 8 - Fotomicrografias da reação imunoistoquímica para a Granzima B em mucosa gástrica.

4.3 FATORES MOLECULARES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA ADAPTATIVA E NO PROCESSO INFLAMATÓRIO

4.3.1 STAT-1

Os resultados em relação à coloração imunoistoquímica para a expressão protéica de STAT-1 podem ser observados na Tabela 6, Figura 9. Os dados da análise estatística nas Tabelas 13 e 14.

A reação para STAT-1 teve padrão citoplasmático de expressão. Os fibroblastos marcavam fortemente para STAT-1 e serviram de controle positivo interno (Figura 9A). O epitélio normal aparecia corado, mas as bases das criptas não se coravam.

No grupo normal, a STAT-1 expressava-se em células epiteliais e células linfóides, o padrão era citoplasmático forte. Na medida em que o processo inflamatório aumentava nas gastrites, a coloração para STAT-1 ganhava maior intensidade (9B). O agregado linfóide corava muito intensamente. Não foi observado padrão nuclear, nem mesmo nas gastrites com agregado linfóide.

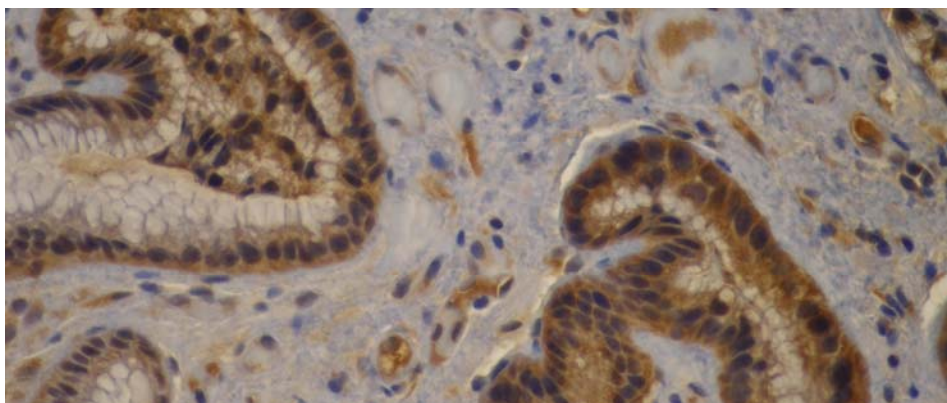
No grupo do MALT, a intensidade da coloração para STAT-1 era muito mais intensa que a do processo inflamatório (figura 9C). A coloração tinha padrão citoplasmático. O padrão nuclear podia ser visto nas células com características de grandes células. Os folículos coraram no centro germinativo e não coraram na zona do manto (Tabela 6).

Tabela 6 - Número e percentual das amostras segundo a expressão protéica de STAT-1.

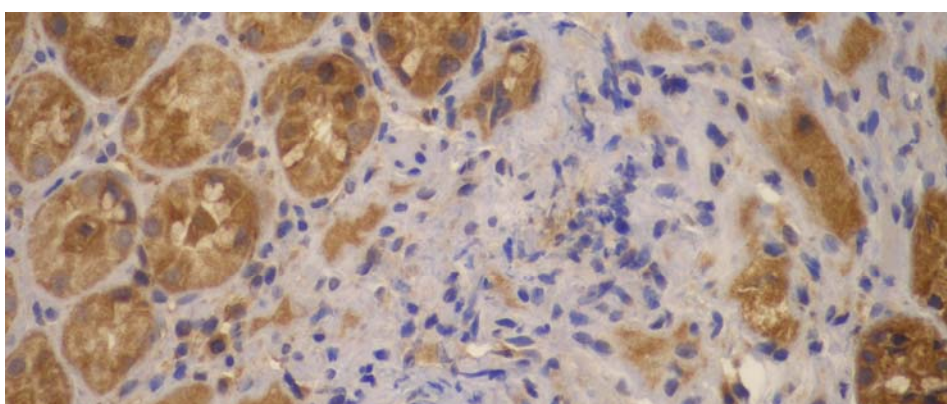
	NORMAL(n)	%	GASTRITE(n)	%	MALT(n)	%
STAT-1 +1	3	8,57%	0	0%	0	0%
STAT-1 +2	10	28,57%	3	10,71%	0	0%
STAT-1 +3	18	51,43%	12	42,86%	1	1,79%
STAT-1 +4	3	8,57%	12	42,86%	53	94,64%
NA*	1	2,86%	1	3,57%	2	3,57%
Total	35	100%	28	100%	56	100%

* NA = não avaliável

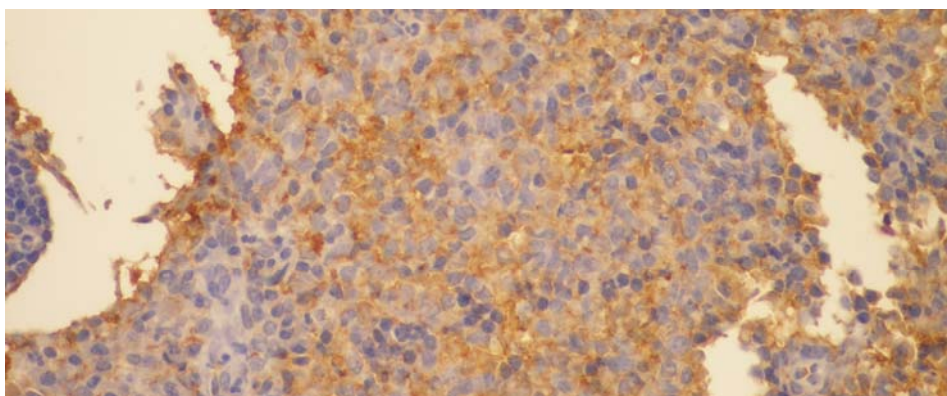
Para a análise estatística foram excluídos os caso não avaliáveis. Houve diferença estatisticamente significativa da marcação para STAT-1 entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis $p < 0,001$). Na análise de múltiplas comparações observamos diferença significativa entre o MALT e a gastrite ($p < 0,001$), entre o MALT e o normal ($p < 0,001$) e entre o normal e a gastrite ($p = 0,001$).



9 A – Gastrite com fibroblastos e alguns linfócitos que reagem com o anticorpo, 400x .



9 B – Processo inflamatório mais intenso, com maior número de células coradas, 400x.



9 C – No tumor há padrão de reatividade muito intenso, 400x.

Figura 9 - Fotomicrografias da reação imunoistoquímica para STAT-1 em mucosa gástrica.

4.3.2 HLA-DR

Os resultados da coloração pelo anticorpo anti-HLA-DR foram avaliados em dois aspectos: o primeiro comparando a coloração das criptas do epitélio (Tabela 7) e em seguida, comparando os linfócitos que infiltravam o tecido e os linfócitos tumorais (tabela 8). Os dados da análise estatística encontram-se nas Tabelas 13 e 14.

O critério adotado para avaliação do epitélio foi baseado na marcação vista na base das criptas do epitélio. Foi considerado positivo o colo da glândula corado, não o corpo.

A coloração imunoistoquímica para o HLA-DR, quando positiva, corou a membrana da célula.

No estômago normal, foram raros os linfócitos positivos, com coloração membranosa. As células parietais apresentavam coloração inespecífica, os plasmócitos eram negativos e as criptas não coravam. As poucas células dendríticas coravam intensamente, com padrão membranoso.

Nas gastrites (Figura 10A), quando cursaram com organização de tecido linfóide, a marcação do anti-HLA-DR ficava mais intensa, sendo observada nos agregados linfóides e nos centros germinativos de folículos linfóides. Os centros germinativos das gastrites coravam mais intensamente que o da amígdala, utilizada como controle. As criptas mostravam intensa coloração na base, que se tornava mais intensa quanto maior o processo inflamatório (Tabela 7, Figura 10B).

No MALT a expressão do anti-HLA-DR identificada pelo padrão membranoso de coloração, era intensa no tumor e nas células do centro

germinativo (Tabela 8). A positividade estava presente na superfície (células epiteliais) da mucosa gástrica, expressando-se nas membranas das células foveolares em intensidade de fraca a moderada (Figura 10C). A expressão nas glândulas era variável: mais intensa no colo da glândula e seguia perdendo a intensidade até ficar negativa na superfície basal. No epitélio regenerativo a expressão do HLA-DR foi negativa.

As Figuras 11A e 11B mostram o agregado linfóide fortemente corado. A Figura 11C mostra o tumor fortemente corado.

Tabela 7 - Número e percentual das amostras segundo a expressão protéica de HLA-DR no epitélio.

	NORMAL		GASTRITE		MALT	
*Epit 0	16	45,71%	7	25%	22	39,29%
*Epit +1	16	45,71%	13	46,43%	23	41,07%
*Epit +2	1	2,86%	5	17,86%	7	12,50%
NA**	2	5,72%	3	10,71%	4	7,14%
Total	35	100%	28	100%	56	100%

*Epitélio **NA= não avaliável

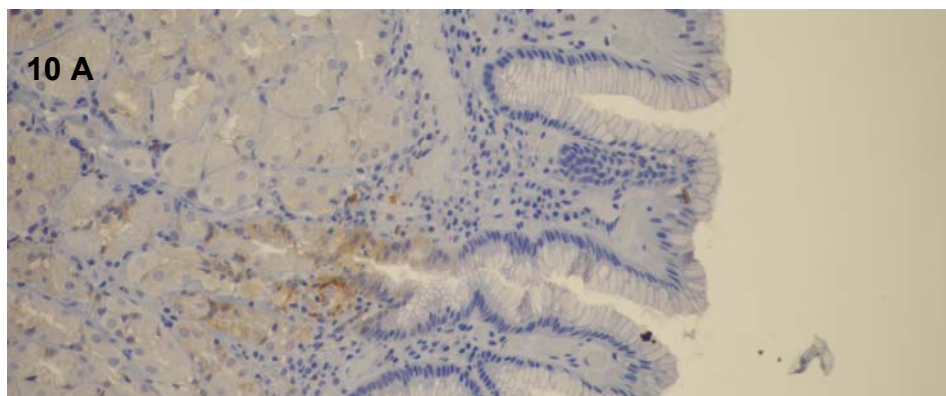
Para fazer a análise estatística excluímos os casos não avaliáveis. Não houve diferença estatisticamente significativa da marcação para o HLA-DR no epitélio entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis $p=0,132$).

Tabela 8 - Número e percentual das amostras segundo a expressão protéica do HLA-DR nos linfócitos.

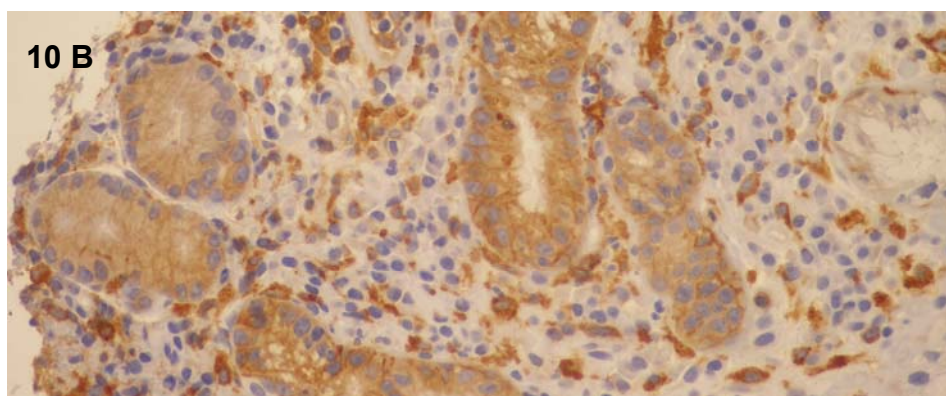
	NORMAL (n)	%	GASTRITE (n)	%	MALT (n)	%
HLA-DR +1	28	80%	4	14,29%	0	0%
HLA-DR +2	6	17,14%	8	28,57%	0	0%
HLA-DR +3	0	0%	12	42,86%	3	5,36%
HLA-DR +4	0	0%	2	7,14%	52	92,85%
NA *	1	2,86%	2	7,14%	1	1,79%
Total	35	100%	28	100%	56	100%

*NA= não avaliável

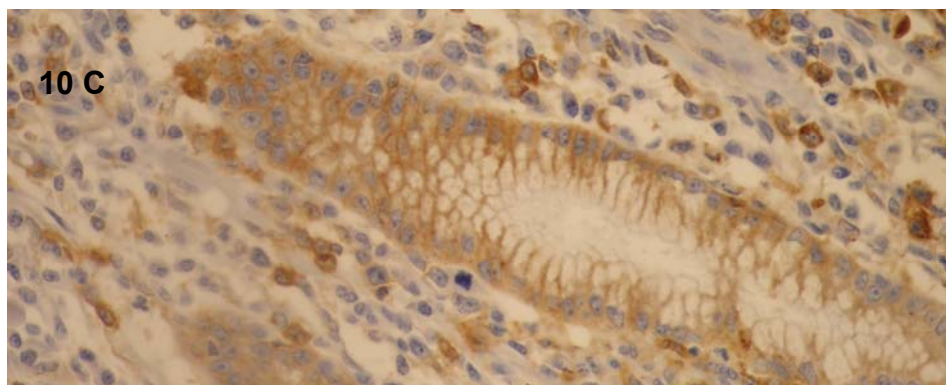
Os casos não avaliados foram excluídos para a análise estatística. Houve diferença da marcação para o HLA-DR nos linfócitos entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis $p < 0,001$). Na análise de múltiplas comparações observamos diferença significativa entre o MALT e o normal ($p < 0,001$), entre o MALT e a gastrite ($p < 0,001$) e entre o normal e a gastrite ($p < 0,001$).



10 A – Gastrite mostrando coloração na base da cripta da mucosa, 40x.

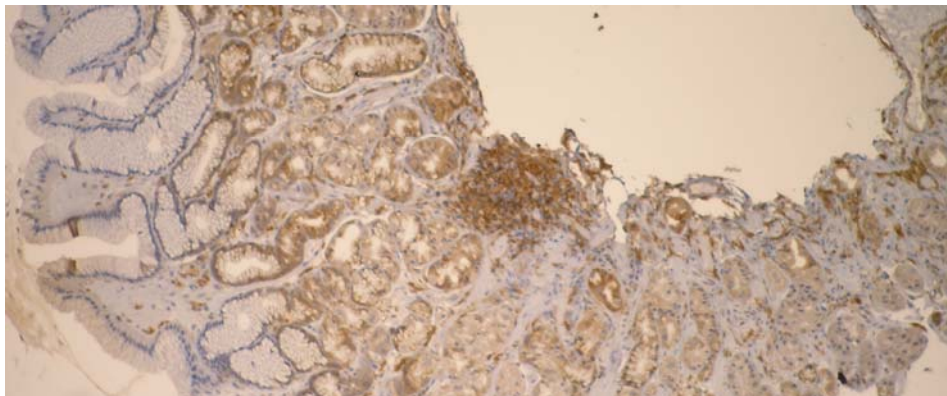


10 B – As criptas mostram coloração mais intensa, quanto maior o processo inflamatório, 400x.

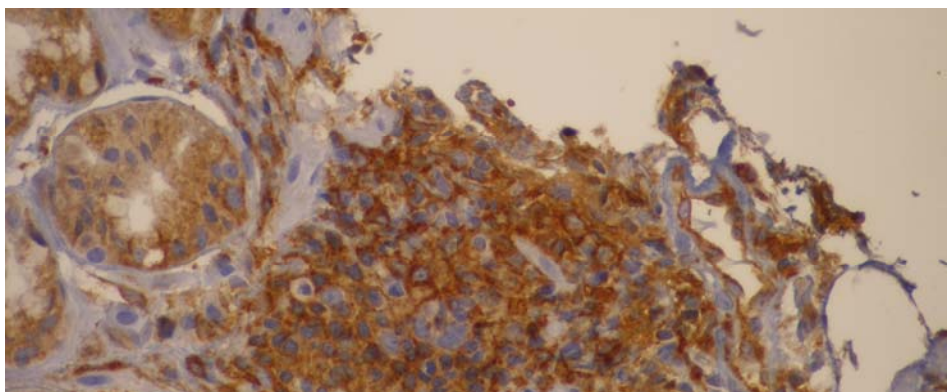


10 C – No tumor há positividade intensa na superfície epitelial, 400x.

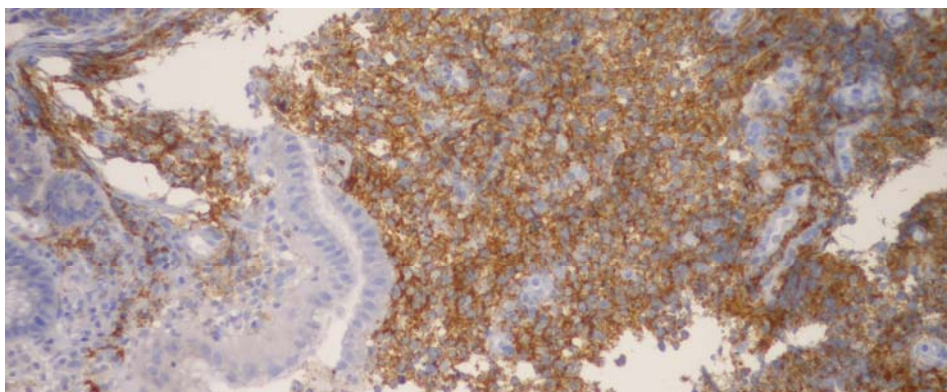
Figura 10 - Fotomicrografias da reação imunoistoquímica para HLA-DR na mucosa gástrica.



11 A – Gastrite com agregado linfóide fortemente corado, 40x.



11 B – Agregado linfóide com reatividade intensa, 400x.



11 C – Tumor fortemente corado, 40x.

Figura 11 - Fotomicrografias da reação imunoistoquímica para HLA-DR no tumor.

4.3.3 NOS-2

Os resultados em relação à coloração imunoistoquímica para a NOS 2 encontram-se na Tabela 9. Os dados da análise estatística nas Tabelas 13 e 14.

A coloração positiva para NOS-2 era de padrão citoplasmático granular. O tecido utilizado como controle foi a amígdala, sendo identificada a positividade na coloração dos macrófagos.

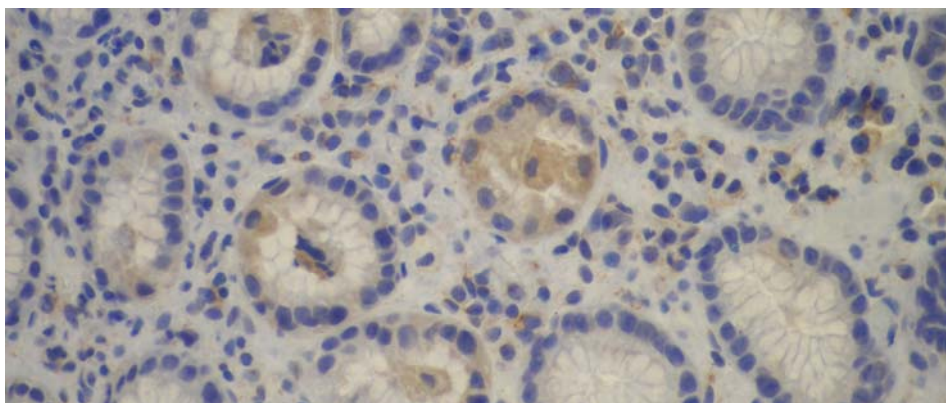
O estômago normal apresentava poucas células linfóides coradas (Figura 12A). No processo inflamatório, gastrite, as células linfóides tinham maior positividade para anti-NOS 2 (Figura 12 B); no entanto, os agregados linfóides não coraram. No centro germinativo do folículo a coloração foi pouco intensa e na zona do manto negativa. No linfoma MALT, havia positividade para anti-NOS 2, porém com intensidade menor que a do processo inflamatório (Tabela 9, Figura 12C).

Tabela 9 Número e percentual das amostras segundo a expressão protéica do NOS 2.

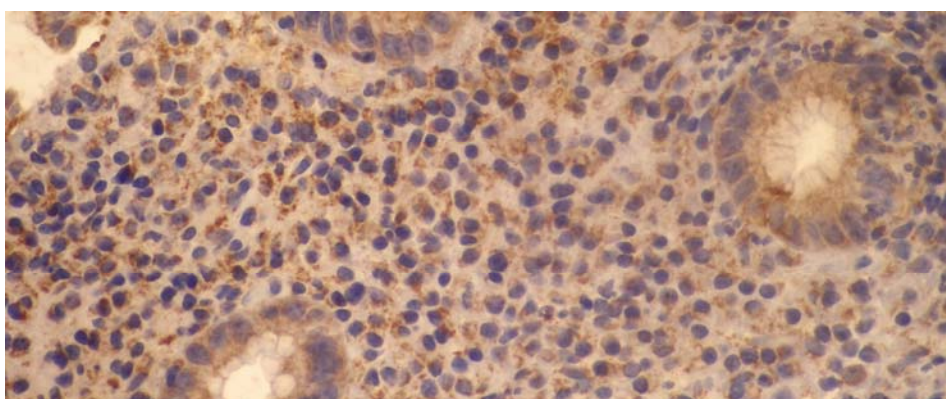
	NORMAL (n)	% GASTRITE (n)	% MALT (n)	%
NOS-2 +1	17	48,57%	0	78,57%
NOS-2 +2	9	25,71%	18	17,86%
NOS-2 +3	6	17,15%	8	0%
NOS-2 +4	2	5,71%	0	0%
NA*	1	2,86%	2	3,57%
Total	35	100%	28	100%

* NA= Não avaliável

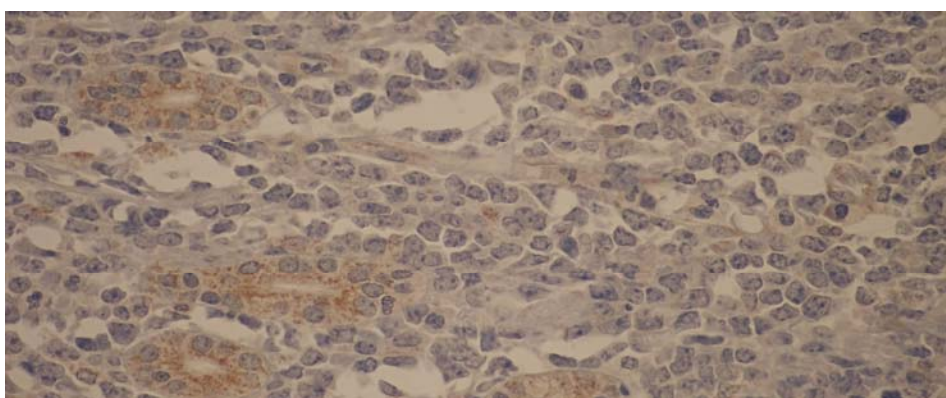
Para a análise estatística, excluimos os casos não avaliáveis. Houve diferença estatisticamente significativa da marcação para NOS-2 entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis $p < 0,001$). Na análise de múltiplas variáveis observamos diferença significativa entre o MALT e a gastrite ($p < 0,001$), entre o MALT e o normal ($p = 0,001$) e entre o normal e a gastrite ($p = 0,005$).



12 A – Estômago normal, com poucas células coradas, 400x.



12 B – Gastrite com células linfóides, com maior reatividade para NOS-2, 400x



12 C – Tumor com a reatividade moderada para NOS-2, 400x.

Figura 12 – Fotomicrografias da reação imunoistoquímica para NOS-2 na mucosa gástrica.

4.3.4 S-100

Os resultados em relação à coloração imunoistoquímica para S-100 podem ser observados na Tabela 10. Os dados da análise estatística nas Tabelas 13 e 14.

No estômago normal a reação para S-100 marcou a membrana dos nervos e das raras células dendríticas que permeavam a mucosa (Figura 13A). O padrão de coloração foi membranoso e intenso, possibilitando a visualização dos prolongamentos citoplasmáticos das células que infiltravam a mucosa (Figura 13B).

Nas gastrites inflamatórias agudas o padrão de marcação era semelhante ao do tecido normal. Nas gastrites em que ocorria a formação de tecido linfóide, o agregado linfóide marcou para o S-100 as células dendríticas e o centro germinativo. Este, quando organizado, apresentou marcação para células foliculares dendríticas ao seu redor e, na medida em que aumentava a intensidade da gastrite, as células dendríticas infiltravam o centro germinativo (Tabela 10).

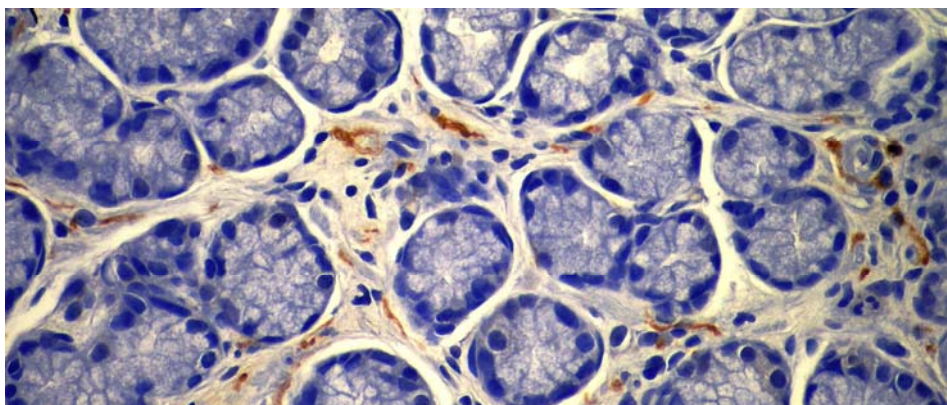
No linfoma MALT a reação para S-100 marcou células dendríticas que estavam presentes em grande número nas mucosas gástricas (Figura 13C) e pouco presentes no tumor. No folículo, as células foliculares dendríticas do centro germinativo estavam coradas.

Tabela 10 - Número e percentual das amostras segundo a expressão protéica do S-100.

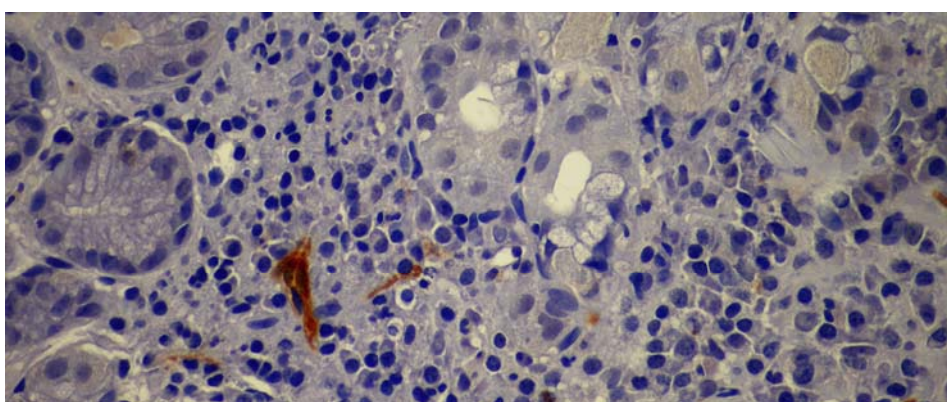
	NORMAL	%	GASTRITE	%	MALT	%
S-100 +1	33	94,28%	17	60,71%	12	21,43%
S-100 +2	0	0%	10	35,71%	39	69,64%
S-100 +3	0	0%	0	0%	4	7,14%
NA*	2	5,70%	1	3,57%	1	1,78%
Total	35	100%	28	100%	56	100%

NA= Não avaliável

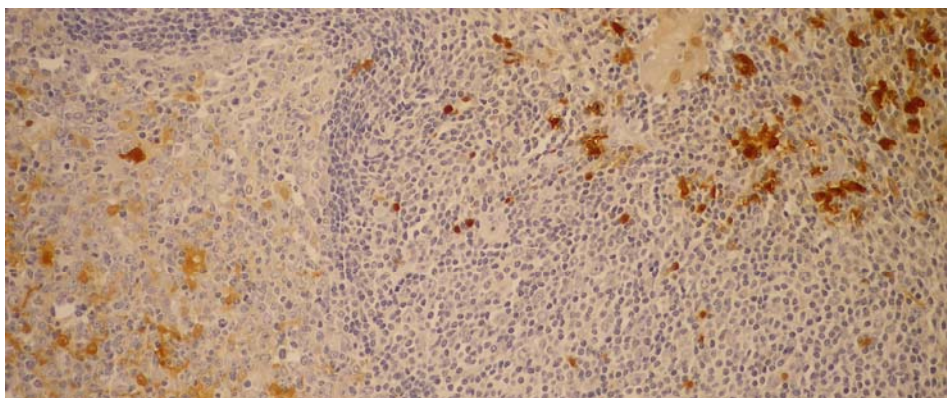
Os casos não avaliados foram excluídos para a análise estatística. Houve diferença significativa da marcação para o anticorpo S-100 entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis $p < 0,001$). A análise de múltiplas comparações mostrou diferença entre o MALT e a gastrite ($p < 0,001$), entre o MALT e o normal ($p < 0,001$) e entre o normal e a gastrite ($p < 0,001$).



13 A – Estômago normal, com marcação de membranas dos nervos e das raras células dendríticas, 400x.



13 B – Visualização dos prolongamentos citoplasmáticos das células que infiltram a mucosa gástrica, 400x.



13 C – Tumor mostrando marcação intensa nas células dendríticas, 40x.

Figura 13 – Fotomicrografias da reação imunoistoquímica para S-100 na mucosa gástrica.

4.4 FATORES MOLECULARES DA VIA DE ATIVAÇÃO NF- κ B

4.4.1 c-Rel

Os resultados em relação à coloração imunoistoquímica para o c-Rel encontram-se na Tabela 11. Os dados da análise estatística nas Tabelas 13 e 14.

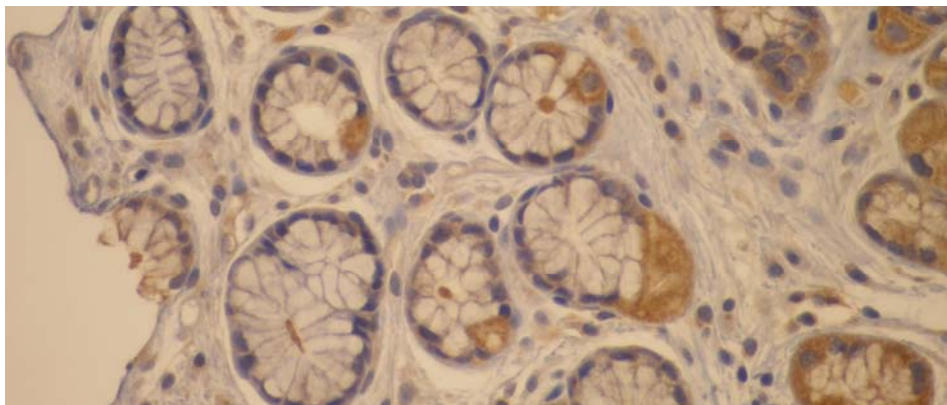
No tecido utilizado como controle, amígdala, o c-Rel apresentou reatividade intensa nas células do centro germinativo e não corou as células da zona do manto. No estômago normal houve fraca reatividade para c-Rel (Figura 14A). Nas gastrites, as células do processo inflamatório apresentaram fraca positividade para anti-c-Rel. Não foi observada marcação nuclear para c-Rel em pacientes e nos controles (Figura 14B). Nas amostras tumorais do linfoma MALT, as células do centro germinativo, assim como as células tumorais apresentaram intensa positividade para o c-Rel, com padrão citoplasmático (Figura 14C). Os linfócitos com morfologia de grandes células estavam fortemente corados (Tabela 11).

Tabela 11 - Número e percentual das amostras segundo a expressão protéica do c-Rel.

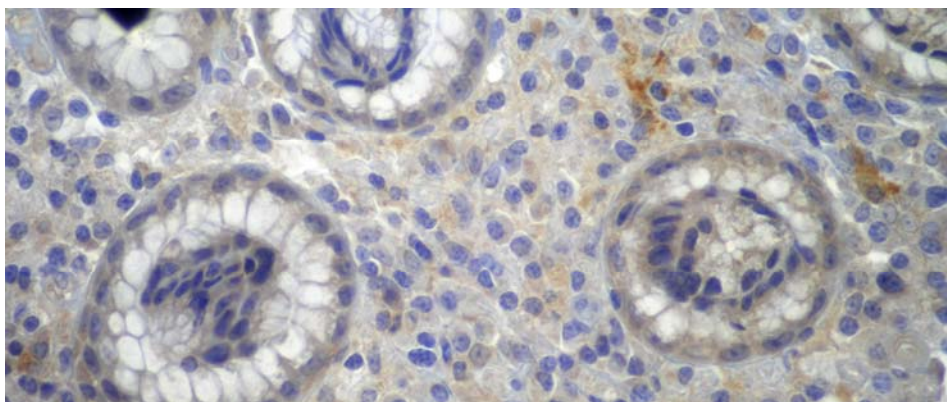
	NORMAL	%	GASTRITE	%	MALT	%
c-Rel 0	9	25,72%	0	0%	0	0%
c-Rel +1	16	45,71%	2	7,14%	0	0%
c-Rel +2	3	8,57%	13	46,43%	2	3,57%
c-Rel +3	6	17,14%	11	39,29%	13	23,22%
c-Rel +4	0	0%	0	0%	39	69,64%
NA*	1	2,86%	2	7,14%	2	3,57%
Total	35	100%	28	100%	56	100%

NA= Não avaliável

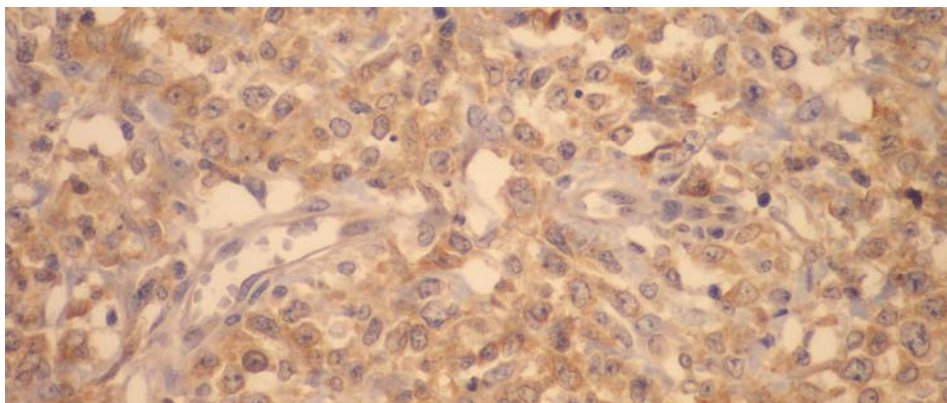
Os casos não avaliados foram excluídos para a análise estatística. Houve diferença estatisticamente significativa na marcação para o c-Rel entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis $p < 0,001$). A análise de múltiplas comparações mostrou diferença significativa entre o MALT e a gastrite ($p < 0,001$), entre o MALT e o normal ($p < 0,001$) e entre o normal e a gastrite ($p < 0,001$).



14 A – Estômago normal, com fraca reatividade, 400x.



14 B – Reatividade com padrão citoplasmático de expressão, 400x.



14 C – No tumor há intensa reatividade para o c-Rel. 400x

Figura 14 - Fotomicrografias da reação imunoistoquímica para c-Rel na mucosa gástrica.

4.4.2 Bcl-10

Os resultados em relação à coloração imunoistoquímica para o Bcl-10 encontram-se na Tabela 12. Os dados da análise estatística nas Tabelas 13 e 14.

No tecido linfóide normal (amígdala) o Bcl-10 foi encontrado no citoplasma das células do folículo linfóide, sendo abundante no centro germinativo, moderado na zona marginal e pouco intenso na zona do manto (Figura 15 A). Independentemente da maturação do linfócito, o Bcl-10 foi visualizado no citoplasma, o que dificultou a interpretação das lâminas pois o citoplasma estava corado em todo o material (Figura 15 B).

No grupo normal, o Bcl-10 marcou as células epiteliais no núcleo e citoplasma. Na maioria dos linfócitos presentes no tecido normal e nas gastrites a marcação do Bcl-10 foi positiva no citoplasma e existiam eventuais núcleos marcados fracamente. O núcleo, quando corado estava borrado, o que tornou a interpretação difícil.

No MALT além da marcação citoplasmática havia ocorrência de marcação nuclear, que em alguns casos foi intensa (Figura 15 C).

Tabela 12 - Número e percentual das amostras segundo o padrão de expressão protéica do Bcl-10.

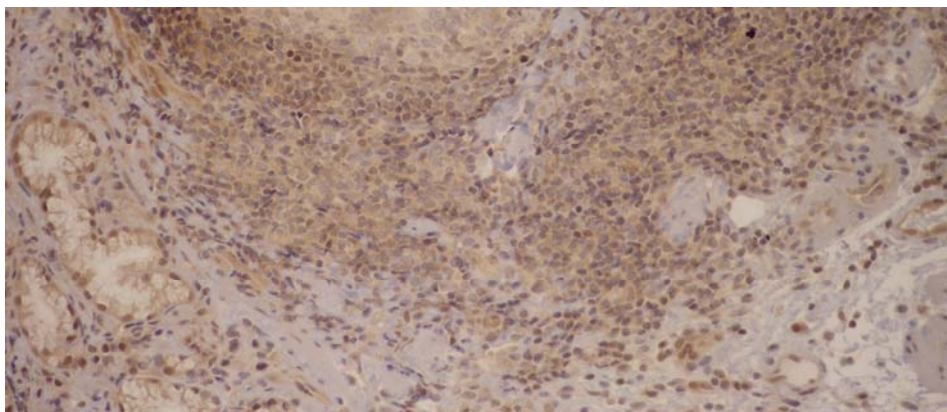
	NORMAL	%	GASTRITE	%	MALT	%
Bcl-10 1	17	48,57%	9	32,14%	27	48,21%
Bcl-10 2	17	48,57%	16	57,14%	16	28,57%
Bcl-10 3	0	0	0	0%	11	19,64%
NA*	1	2,86%	3	10,71%	2	3,57%
Total	35	100%	28	100%	56	100%

* NA= Não avaliável

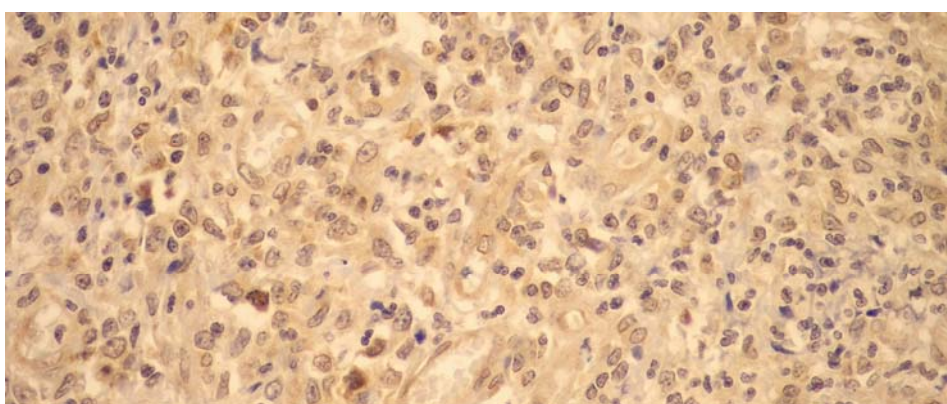
Os casos não avaliáveis foram excluídos para a análise estatística.

No MALT, só pacientes *Helicobacter pylori* positivos apresentaram o padrão nuclear forte (n=11), nenhum MALT com *Helicobacter pylori* negativo apresentou este padrão. Esta diferença mostrou-se estatisticamente significativa (p=0,047).

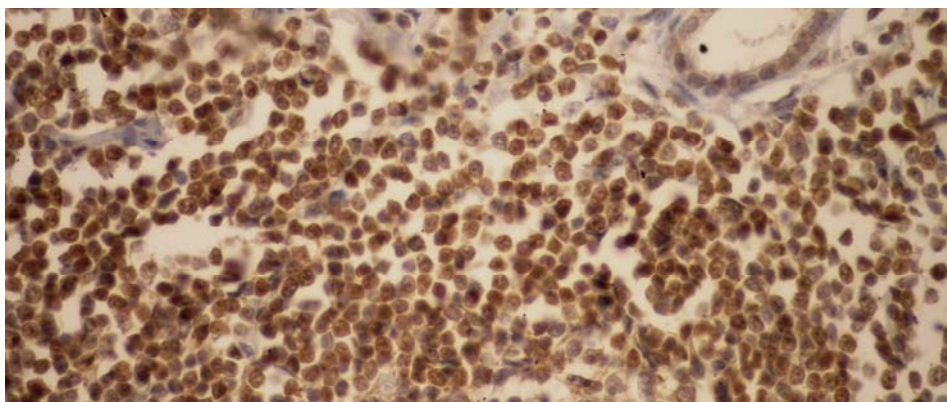
Não houve diferença significativa entre os grupos aplicávamos o teste de Kruskal-Wallis.



15 A – No tecido linfóide normal a marcação é forte no centro germinativo, moderada na zona marginal e fraca na zona do manto, 40x.



15 B – Marcação moderada no núcleo e no citoplasma, 400x.



15 C – Tumor mostrando intensa reatividade para o Bcl-10, 400x.

Figura 15 – Fotomicrografias da reação imunoistoquímica para Bcl-10 na mucosa gástrica.

Tabela 13 - Intensidade de expressão imunohistoquímica dos marcadores biomoleculares segundo os três grupos de estudo. Análise considerando todos os pacientes.

VARIÁVEL		NORMAL	GASTRITE	MALT	P *
C-REL	Mediana	1	2	4	< 0,001
	Média de postos	23,9	45,3	84,5	
	Nº de casos (n)	(34)	(26)	(54)	
FAS	Mediana	4	4	3	< 0,001
	Média de postos	70,9	74,0	43,2	
	Nº de casos (n)	(34)	(27)	(55)	
FAS-L	Mediana	3	4	1	< 0,001
	Média de postos	72,5	94,4	32,2	
	Nº de casos (n)	(33)	(25)	(56)	
Caspase-8	Mediana	2	3	2	0,017
	Média de postos	57,6	72,7	51,3	
	Nº de casos (n)	(34)	(26)	(55)	
NOS-2	Mediana	1,5	2	1	< 0,001
	Média de postos	62,0	87,8	40,1	
	Nº de casos (n)	(34)	(26)	(54)	
STAT-1	Mediana	3	3	4	< 0,001
	Média de postos	27,2	51,6	80,6	
	Nº de casos (n)	(34)	(27)	(54)	
HLA-DR	Mediana	1	3	4	< 0,001
	Média de postos	20,6	46,4	86,6	
	Nº de casos (n)	(34)	(26)	(55)	
Epitélio HLA-DR	Mediana	1	1	1	0,132
	Média de postos	49,0	64,4	55,4	
	Nº de casos (n)	(33)	(25)	(52)	
Grazima B	Mediana	1	1	1	< 0,001
	Média de postos	41,1	52,9	68,7	
	Nº de casos (n)	(34)	(27)	(51)	
BCL-10	Mediana	0,5	1	0,5	0,635
	Média de postos	53,0	58,1	59,0	
	Nº de casos (n)	(34)	(25)	(54)	
S-100	Mediana	1	1	2	< 0,001
	Média de postos	31,5	52,1	76,8	
	Nº de casos (n)	(33)	(27)	(55)	

* Teste de Kruskal-Wallis.

Em vermelho estão destacadas as diferenças que são estatisticamente significativas (alfa = 5%).

Há um paciente no grupo MALT sem informação sobre a o status do *Helicobacter pylori*. Este paciente foi incluído na análise.

Tabela 14 - Valores dos níveis descritivos do teste de Mann-Whitney para múltiplas comparações dois a dois (com correção de Bonferroni). Análise considerando todos os pacientes.

VARIÁVEL		NORMAL	GASTRITE	MALT
		P *	P *	P *
C-REL	Normal	-	< 0,001	< 0,001
	Gastrite	< 0,001	-	< 0,001
	MALT	< 0,001	< 0,001	-
FAS	Normal	-	0,629	< 0,001
	Gastrite	0,629	-	< 0,001
	MALT	< 0,001	< 0,001	-
FAS-L	Normal	-	< 0,001	< 0,001
	Gastrite	< 0,001	-	< 0,001
	MALT	< 0,001	< 0,001	-
Caspase-8	Normal	-	0,040	0,302
	Gastrite	0,040	-	0,006
	MALT	0,302	0,006	-
NOS-2	Normal	-	0,005	0,001
	Gastrite	0,005	-	< 0,001
	MALT	0,001	< 0,001	-
STAT-1	Normal	-	0,001	< 0,001
	Gastrite	0,001	-	< 0,001
	MALT	< 0,001	< 0,001	-
HLA-DR	Normal	-	< 0,001	< 0,001
	Gastrite	< 0,001	-	< 0,001
	MALT	< 0,001	< 0,001	-
Grazima	Normal	-	0,051	< 0,001
	Gastrite	0,051	-	0,014
	MALT	< 0,001	0,014	-
S100	Normal	-	< 0,001	< 0,001
	Gastrite	< 0,001	-	< 0,001
	MALT	< 0,001	< 0,001	-

* Teste de Mann-Whitney.

Em vermelho estão destacadas as diferenças que são estatisticamente significativas (considerando alfa de Bonferroni = 1,67%).

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 *HELICOBACTER PYLORI* E O CÂNCER

A associação entre a infecção pelo *Helicobacter pylori* e o linfoma gástrico MALT é referida em mais de 90% dos relatos na literatura, nos quais a replicação do *Helicobacter.pylori* é praticamente referência universal. A associação causal é bem estabelecida pois além da presença do *Helicobacter pylori* na maioria dos pacientes, o tratamento da bactéria determina a mudança da história natural do tumor, havendo regressão do processo proliferativo.

Identificamos o *Helicobacter pylori* pela imunistoquímica em 73% dos pacientes de linfoma MALT por nós avaliados. Por tratar-se de estudo retrospectivo, o método utilizado no diagnóstico da infecção não seguiu padronização. Para a investigação da bactéria recomenda-se realizar de 8 a 10 fragmentos de biópsias endoscópicas, proceder o teste rápido da urease, a cultura, a istoquímica, sorologia e reação em cadeia da polimerase (PCR). Com o emprego destes testes, além da análise morfológica criteriosa realizada por oito patologistas, LEHOURS et al. (2003) identificaram a presença de *Helicobacter pylori* em 97,5% dos pacientes por sorologia, 95% por histologia, 52,5% com a cultura e 50% por PCR. O reduzido material disponível para estudo, na maioria dos casos um fragmento de biópsia por paciente, provavelmente influenciou na acurácia dos resultados. A

positividade que encontramos para o *Helicobacter pylori* é menor do que a referida na literatura, provavelmente porque o desenho do estudo não permite seguir os critérios preconizados para o diagnóstico do. *Helicobacter pylori*. Mesmo assim a positividade presente no grupo MALT foi significativamente maior quando comparada às gastrites e ao grupo normal (73%,43% e 9% respectivamente).

5.2 A RESPOSTA IMUNOLÓGICA E INFLAMATÓRIA

A resposta imunológica ao *Helicobacter pylori* foi avaliada através da marcação das proteínas S-100 (que identifica células dendríticas), da Granzima B. (presente em linfócitos T citotóxicos e células NK), da expressão de moléculas de HLA DR e da STAT-1.

A interação do *Helicobacter pylori* com as células epiteliais da mucosa gástrica, desencadeia a primeira linha de defesa da resposta imunológica inata. Como resultado da interação, uma série de citocinas inflamatórias e quimiocinas são liberadas, atraindo monócitos, neutrófilos e linfócitos para o local da inflamação. As células dendríticas, ainda não condicionadas, originadas dos monócitos, assim como as células residentes, são sensíveis a dois sinais: aos padrões moleculares específicos associados aos micróbios (MAMPs do inglês “microbe-associated molecular pattern”) e ao sinal das citocinas produzidas pela célula epitelial. Conseqüentemente, em resposta aos padrões moleculares, à interação com receptores, ao efeito dos

mediadores derivados do estroma e das células apresentadoras de antígeno será estabelecido o padrão da resposta imunológica (FRITZ et al. 2007).

A célula dendrítica é de fundamental importância na determinação do padrão de resposta imunológica desencadeado pelo patógeno. O *Helicobacter pylori* induz preferencialmente a produção de IL-12 pelas células dendríticas, favorecendo o padrão de resposta Th1. A ligação da bactéria ao receptor específico de células dendríticas, SIGN (do inglês, "ICAM-3-grabbing nonintegrin") via o antígeno do grupo Lewis, presente no LPS da bactéria pode, no decorrer da inflamação promover um balanço Th1/Th2 favorecendo a persistência do patógeno (FERRERO 2005). Recentemente vários estudos sugerem que o *Helicobacter pylori* possa estimular a resposta Th17 nas células dendríticas, proposta reforçada pelo achado de IL-17 e pela produção de IL-8 pelas células epiteliais. Este padrão inflamatório de resposta ainda não foi completamente estudado na infecção pelo *Helicobacter pylori* e no linfoma MALT (FERRERO 2005; ALGOOD et al. 2007; AUJLA et al. 2007; CARUSO et al. 2007; HUNTER 2005).

Em nosso estudo observamos a presença de grande número de células dendríticas na mucosa gástrica nas amostras do tumor, havendo diferença significativa em relação ao padrão presente no estômago normal e na gastrite.

MUELLER et al. (2005), estudaram o papel das células acessórias na patogênese do linfoma MALT usando como modelo o *Helicobacter felis* infectando camundongos. O terceiro componente celular do tumor em ordem de frequência, depois das células linfóides B e dos linfócitos T CD4+ são as

células dendríticas CD11c+, que representam 1/5 a 1/3 da massa tumoral. Essas não expressam marcadores mielóides ou linfóides, mas expressam S-100. Os autores observaram que as células dendríticas desaparecem no camundongo tratado que evoluiu para remissão e reaparecem em grande número quando há recidiva. As células T e os macrófagos, não demonstraram correlação com a evolução clínica.

Embora nosso estudo não avalie a função celular, o grande número de células dendríticas encontradas no grupo MALT, assim como a evidência de que elas desaparecem após a regressão do tumor nos camundongos, sugere haver participação importante na indução da proliferação celular. Estes achados apontam para a necessidade de outros estudos investigando o papel das células dendríticas na fisiopatologia do linfoma MALT.

O aumento da expressão de moléculas HLA nos pacientes infectados por *Helicobacter pylori* é descrito por vários autores. Observa-se com frequência a presença de moléculas HLA Classe II no epitélio da mucosa gástrica. A apresentação de moléculas HLA pelas células epiteliais provavelmente é induzida pelas citocinas IFN- γ e TNF- α produzidas pelas células T ativadas presentes na lâmina própria (ARCHIMANDRITIS et al. 2000; SUERBAUM e MICHETTI 2002; MUELLER et al. 2005).

Observamos presença de marcação para o HLA-DR na superfície de células epiteliais das bases das criptas da mucosa gástrica, entretanto não houve diferença entre os grupos. Especula-se qual seria o papel da apresentação de antígenos pelas células epiteliais, pois uma vez que elas não são células apresentadoras de antígenos profissionais, não teriam a

capacidade de sinalizar e induzir a ativação de linfócitos T por não possuir moléculas co-estimulatórias adequadas. A sinalização fraca, sem sinais co-estimulatórios, poderia induzir à tolerância. ARCHIMANDRITIS et al. (2000) encontraram evidências de expressão de moléculas HLA-DR, moléculas coestimulatórias B7-1, B7-2 em células gástricas epiteliais dos pacientes com gastrite e infecção por *Helicobacter pylori*, o que sugere que as células epiteliais possam adquirir propriedades de células apresentadoras de antígenos por estimulação de citocinas produzidas no processo inflamatório induzido pelo *Helicobacter pylori*.

Tipicamente observada na superfície do endotélio e do parênquima de vários órgãos durante a rejeição de aloenxertos, assim como em doenças auto-imune e inflamatórias, a indução de expressão de moléculas de HLA de Classe II por células não hematopoiéticas é relacionada com respostas imunológicas patológicas. A expressão de moléculas HLA de Classe II no epitélio da mucosa gástrica de indivíduos infectados por *Helicobacter pylori* pode estar relacionada com a fisiopatologia da gastrite auto-imune e não à resposta imunológica protetora (REITH et al. 2005). Patógenos que produzem infecção crônica tem inúmeros mecanismos que permitem a colonização e a persistência no hospedeiro. O mimetismo molecular é uma situação na qual os patógenos expressam padrões moleculares antigênicos compartilhados pelo hospedeiro. Este mecanismo favorece a persistência do patógeno, dada à tolerância do sistema imunológico a auto-antígenos. Vários antígenos do *Helicobacter pylori* tem semelhança aos antígenos humanos, dentre eles os epítomos das células parietais gástricas H(+)/K(+)-

ATPase e antígenos Lewis expressos na superfície da mucosa gástrica (SUAREZ et al. 2006). Acredita-se que células B auto-reativas passem a produzir anticorpos contra antígenos do *Helicobacter pylori*, agredindo simultaneamente a mucosa gástrica.

A coloração imunoistoquímica para moléculas HLA DR no MALT é pouco estudada (DAROM et al. 2004, 2006). As células do MALT no nosso estudo mostraram marcação intensa para o HLA-DR, com maior expressão no tumor quando comparado aos linfócitos do grupo das gastrites e do estômago normal.

Em alguns tumores a expressão de moléculas HLA está diminuída. Acredita-se que este seja um mecanismo de evasão tumoral e que as células tumorais possam desta forma escapar do reconhecimento pelo sistema imunológico. A idéia de que a maior expressão de moléculas de HLA de Classe II possa aumentar a imunogenicidade tumoral, levou alguns pesquisadores à estimular células tumorais a aumentar a expressão de moléculas HLA Classe II com uso de vetores CIITA (do inglês, "Classe II transactivator"). Embora esta estratégia não tenha dado bons resultados num modelo de câncer de pulmão, ela resultou em aumento de imunogenicidade e da rejeição. Promoveu ainda células de memória com especificidade para antígenos tumorais em camundongos com adenocarcinoma mamário (REITH et al. 2005).

No linfoma MALT evidenciamos aumento de expressão de moléculas HLA de Classe II. Sendo esta observação confirmada, uma estratégia

promissora seria o desenvolvimento de anticorpos monoclonais específicos para os alelos HLA envolvidos.

Nossa opinião é de que a apresentação dos antígenos pelas moléculas HLA de Classe II pode estar envolvida na fisiopatologia deste processo. Devido ao grande polimorfismo e diversidade deste sistema seria compreensível que apenas uma pequena parcela de indivíduos infectados desenvolvessem quadros clínicos tão distintos da gastrite, como o adenocarcinoma e o linfoma gástrico. Embora existam poucos estudos, alguns autores encontraram associação entre adenocarcinoma gástrico e alelos de HLA de Classe II (HLA-DR e HLA-DQ) (MAGNUSSON et al. 2001; PERRI et al. 2002; LI et al. 2005; QUINTERO et al. 2005). Há um relato sobre associação do haplótipo HLA DQA*0103 – HLADQB*0601 no MALT, no entanto a casuística é pequena e os dados do estudo precisam ser confirmados (KAWAHARA et al. 2005).

A STAT-1 fosforilada (84-91KDa) está intensamente expressa no grupo MALT. A ativação de STAT-1 é induzida pelo IFN- γ . Quando a STAT-1 é ativada ela é transportada para o núcleo onde promove a expressão de uma série de genes, dentre eles o CIITA, responsável pela expressão de moléculas HLA de Classe II. Portanto, o aumento de expressão de STAT-1 é compatível com a expressão de moléculas HLA de Classe II e indica a presença de IFN- γ (REITH et al. 2005). Observação interessante é a relação da ativação do c-Rel com a expressão de STAT-1. Uma série de genes têm expressão alterada nas células transformadas pelo v-Rel (dímero homólogo ao c-Rel existente em células linfóides transformadas de aves), dentre eles o

fator de transcrição para citocinas STAT-1 (GILMORE et al. 2004). Se esta correlação existe no linfoma MALT ainda não está relatada.

As hipóteses para o estabelecimento do linfoma MALT propõem que nas fases iniciais a proliferação de células B ocorra dependente da presença do antígeno e que durante o processo ocorram danos ao DNA, determinando alterações genéticas com conseqüente proliferação independente da presença do estímulo antigênico. O potencial oncogênico das espécies reativas de oxigênio liberadas pelas células envolvidas na resposta inflamatória têm sido estudado em várias neoplasias e no linfoma MALT (LI et al. 2004).

A NOS-2 (iNOS) é uma molécula produzida por macrófagos, células dendríticas e células NK ativados por citocinas que induz síntese de óxido nítrico. A expressão da NOS-2 nos processos infecciosos e inflamatórios é bem caracterizada e aceita como um componente vital da resposta adaptativa do hospedeiro ao estímulo nocivo e virulento dos patógenos. O óxido nítrico pode contribuir para a lesão tecidual por ser citotóxico e citostático, não só para os organismos invasores como também para as células produtoras de NOS e células circunvizinhas (TRIPATHI e TRIPATHI 2007).

LI et al. (2004), estudaram a expressão imunistoquímica de NOS-2 (iNOS) e COX em 32 biópsias gástricas de pacientes com diagnóstico de MALT e compararam com fragmentos de tecidos dos mesmos pacientes retirados de regiões de tecido gástrico não comprometido pelo tumor. Os autores encontraram aumento de expressão de NOS-2 e COX nos tecidos

neoplásicos, concluindo que a sucessão daqueles eventos poderiam contribuir para a transformação neoplásica. Estudamos a expressão de NOS-2 nos linfomas MALT objetivando avaliar sua participação na fisiopatologia do MALT. Observamos expressão intensa de NOS-2 nas gastrites, com diferença significativa em relação aos grupos MALT e normal. A expressão de NOS-2 no MALT foi menor do que a observada nas gastrites e também menor do que observamos no grupo normal. Os nossos achados indicam que a participação de NOS-2 não é evidente nos linfomas, ao menos na fase avançada do processo.

5.3 A VIA EXTRÍNSECA DA APOPTOSE

As proteínas FAS/CD95, FAS-L/CD95L e a protease Caspase 8 participam da via extrínseca de apoptose. O FAS-L/CD95L é um ligante presente em linfócitos T periféricos. O receptor do FAS-L/CD95L é o FAS/CD95, receptor de morte celular que está presente em tecidos linfóides T, B e células dendríticas. Ao ligar-se, o FAS/CD95 recruta caspases determinando a clivagem da Caspase 8. Esta ao clivar-se leva à formação da subunidade p18. A presença da subunidade p18 advém da ativação da via extrínseca de apoptose, resultando em morte celular.

O estudo imunoistoquímico de FAS/CD95 mostrou expressão menor no tecido tumoral do que a observada nas células da gastrite e no estômago normal. A gastrite é o grupo que expressa mais intensamente o FAS/CD95.

O anticorpo utilizado para Caspase 8 marca a subunidade da Caspase (p18). A marcação para p18 foi mais intensa na gastrite, o MALT apresentou expressão semelhante ao tecido normal. A ativação da Caspase 8 no MALT, que indica a morte por apoptose, não é diferente da observada no estômago normal, mas é diferente da gastrite.

Em relação aos marcadores moleculares da via extrínseca de apoptose, os grupos se comportam diferentemente e o MALT mostrou claramente padrão diferenciado de expressão. A evidência de baixa expressão do FAS/CD95 e do ligante FAS-L/CD95L, somada à marcação da subunidade p18 da Caspase 8, sugere que a apoptose via FAS-FAS-L está inibida ou modulada negativamente no grupo MALT.

As formas de inibição da via de apoptose FAS-FAS-L descritas na literatura incluem a presença de inibidores solúveis, FAS-L solúvel, c-flip-inibidor da Caspase e as mutações do gene *Fas*. Em 20% dos linfomas são descritas mutações somáticas que são especialmente freqüentes no gene *Fas*, gerando proteínas que podem se comportar como formas dominantes negativas. As mutações do gene *Fas* são associadas à doença linfoproliferativa auto-imune, sendo raramente descritas no linfoma gástrico MALT. A expressão reduzida de FAS-L foi descrita nos linfomas de grandes células caracterizando um grupo de pior prognóstico (KOJIMA et al. 2006). Nos linfomas MALT gástricos VASSALLO et al. (2004) observaram menor expressão de FAS comparando-os com um grupo de gastrites crônicas.

A modulação da expressão do gene *Fas* pode estar envolvida na inibição desta via. Neste aspecto, um estudo interessante de SEEBERGER

et al. (2001) demonstra que comparando as células B de memória às células tumorais do linfoma MALT, existe baixa expressão de CD95 (FAS) no MALT. Quando colocadas em cultura de células e estimuladas com linfócitos T ativados, há aumento da expressão de FAS nos dois tipos celulares, mas o linfoma persiste com baixa expressão de FAS. Outros experimentos empregando anticorpo anti-FAS demonstram que as células do linfoma são resistentes à morte estimulada pela via FAS (GREINER et al. 1999; GODAL et al. 2006).

As translocações relacionadas ao linfoma MALT envolvendo MALT1 e BCL10 atuam via de sinalização do CD40, induzindo atividade aumentada do NF- κ B e bloqueiam a apoptose induzida por FAS. HO et al. (2005) demonstraram a importância funcional da superexpressão dos transcritos API-MALT e BCL10 nas células de linfomas B. Os resultados deste estudo sustentam a hipótese de que os transcritos conferem às células tumorais uma vantagem proliferativa ao estimular a proliferação via NF- κ B e que por outro lado, há resistência das células tumorais à morte induzida por FAS. Esta resistência é supostamente determinada pelo estímulo da ativação da via NF- κ B (HO et al. 2005). Em linha com estes achados, FERCH et al. (2007) demonstraram a participação de MALT1 e Bcl-10 na indução de expressão de fatores anti-apoptóticos membros da família Bcl-2, o API-1 e o Bcl-x_L, além do c-Flip em células B após sua ativação. A indução de fatores anti-apoptóticos pode explicar a resistência à morte por apoptose encontrada nos linfomas MALT. O comprometimento da expressão de FAS/FAS-L permanece por ser esclarecido.

Assim sendo, embora a imunoistoquímica não seja um método funcional, nossas observações favorecem a hipótese de que a via de apoptose FAS-FASL esteja inibida nos linfomas MALT. Dentre os mecanismos já descritos, nossos dados apontam para a baixa expressão do FAS e FAS-L, que podem ou não estar relacionados à presença de inibidores solúveis, mutações somáticas e outros mecanismos moduladores da expressão gênica e protéica. A análise quantitativa do FAS e do FAS-L poderia ser verificada em estudo prospectivo fazendo uso de Western Blot ou quantificando a expressão protéica por PCR em tempo real.

A Granzima B esteve expressa em maior percentagem nos indivíduos com linfoma MALT. A morte celular via Granzima B é induzida pelas células T e células NK. Este mecanismo é um alvo potencial para desenvolvimento de terapêuticas anti-tumorais, através de vacinas com células T citolíticas. Na nossa casuística, embora o grupo MALT tenha apresentado maior expressão de Granzima B, a apoptose, representada pela expressão de Caspase-8 (p18) não esteve aumentada em relação ao grupo normal. Existem estudos que demonstram a ineficácia deste mecanismo de morte nos linfomas, indicam que as células tumorais não induzem a degranulação e liberação das granzimas das células NK, talvez por falta de ligantes capazes de ativar as células. Portanto, apesar da presença das células capazes de induzir a apoptose via granzima B, não há o aumento esperado da indução de morte celular (GODAL et al. 2006).

5.4 ATIVAÇÃO DO NF- κ B

5.4.1 c-Rel

Das subunidades do NF- κ B, o c-Rel é a única que é correlacionada com o desenvolvimento de processos linfoproliferativos. O c-Rel é expresso em todos estágios de maturação das células B, e tem maior expressão nas células B maduras.

Observamos intensa marcação para o c-Rel no citoplasma dos linfócitos B do tumor. Curiosamente, nossa observação mostrou expressão de c-Rel no citoplasma das células linfóides B e o padrão nuclear não foi identificado no grupo MALT nem nos controles. O anticorpo que utilizamos para esta análise, c-Rel (N-466): SC-272, mostra em suas referências o mesmo padrão de expressão que observamos: quando positivo têm padrão citoplasmático. Provavelmente o anticorpo não é capaz de reagir e identificar a forma ativa nuclear do c-Rel. Esta observação foi descrita por outros autores, que ao estudar v-Rel ou Rel, observaram por imunofluorescência o padrão citoplasmático (GILMORE 1999; STARCZYNOWSKI et al. 2003). A hipótese dos autores para justificar os achados foi de que o método empregado não tivesse sensibilidade suficiente para identificar o c-Rel no núcleo e que estas proteínas estejam constantemente entrando e saindo do núcleo, tendo maior concentração nuclear apenas nas primeiras etapas da transformação neoplásica (GILMORE et al. 2004). Desta forma acreditamos que a forte expressão do c-Rel identificada no citoplasma dos linfomas MALT possa indicar a ativação da via do NF- κ B, descrita e correlacionada

por vários autores ao MALT. Nosso método no entanto, não permite avaliar a função ou a atividade da proteína.

As proteínas Bcl-10 e MALT-1, que estão expressas diferenciadamente nos linfomas MALT, têm funções comuns e distintas na sinalização de células B. Em vários contextos, foi demonstrada a cooperação destas duas moléculas: na diferenciação das células B da zona marginal e na ativação do NF- κ B. Na ausência das moléculas Bcl-10 e MALT1, as células B em repouso morrem mais rapidamente do que as células B selvagens. O mesmo é observado nas células B deficientes de p50 ou Rel-A e c-Rel, mostrando que a atividade NF- κ B é importante para a manutenção da sobrevivência das células B (FERCH et al. 2007).

Recentemente foi descrita uma bifurcação da via NF- κ B, mostrando que existem ao nível do Bcl-10 e MALT-1, mecanismos distintos para o controle de Rel A e c-Rel. O Bcl-10 é essencial para a ativação de Rel A e c-Rel. Não está envolvido só com a proliferação, como também com a inibição da apoptose pela via extrínica, participando da indução do c-flip e de membros da família Bcl-xl e com a indução da divisão celular depois da estimulação do BCR, induzindo a expressão de reguladores do ciclo celular. Em contraste o MALT-1 induz apenas um subprograma levando à expressão seletiva da subunidade c-Rel. O c-Rel participa da formação de membros da família Bcl, inibindo a apoptose e promovendo a manutenção da sobrevivência de células B. Os autores propõem uma via específica ligada ao BCR, Bcl-10-MALT-1-c-rel, que mantenha a sobrevivência de células B maduras. A ativação específica desta cascata promoveria uma função dominante na gênese do

linfoma (FERCH et al. 2007). A hipótese da existência da via específica para a ativação do c-Rel é interessante por vir de encontro com os nossos achados e de outros autores que encontram o c-Rel e não encontram o Rel-A hiperexpresso nos linfomas.

5.4.2 Bcl-10

O Bcl-10 é expresso normalmente em grande quantidade nas células B do centro germinativo, de forma moderada na zona marginal e fracamente na zona do manto. Independentemente do estágio de maturação da célula B, a expressão predominante do Bcl-10 é no citoplasma. Nos linfomas gástricos MALT, YE et al. (2000) descreveram a distribuição diferencial do Bcl-10: uma pequena parcela dos casos apresenta o núcleo intensamente marcado, um segundo grupo tem o núcleo e o citoplasma moderadamente marcados e o terceiro grupo marca o citoplasma. Descreveram expressão forte e nuclear do Bcl10 em 6 dos 123 linfomas gástricos (4,9%). De acordo com os autores, a localização subcelular do Bcl-10 está freqüentemente alterada no linfoma MALT em comparação com os tecidos linfóides normais e a expressão nuclear forte do Bcl-10 é muito indicativa da existência da $t(1;14)(p22;q32)$.

Nos 54 casos de MALT que avaliamos, encontramos pequena parcela com o padrão de expressão nuclear forte do Bcl-10, correspondente à 11 pacientes (19,64% dos casos), o que não foi observado nos tecidos normais e nas gastrites. Este grupo pode corresponder a aqueles com a translocação $t(1;14)(p22;q 32)$ descritos por YE et al. (2003). A confirmação desta hipótese será feita por técnica de FISH em trabalho posterior.

Os fatores moleculares estudados, não apenas confirmam achados de outros autores, como ampliam o conhecimento da expressão imunistoquímica das proteínas estudadas no linfoma gástrico MALT. A via extrínseca de apoptose apresenta-se diferencialmente expressa, não sómente pela fraca expressão de FAS, como também pela expressão de FAS-L e caspase-8.

As proteínas envolvidas na resposta imunológica estão fortemente expressas no MALT (HLA-DR, STAT-1, S-100). Destaca-se em particular, o grande número de células dendríticas marcadas por S-100 na mucosa dos pacientes com linfoma MALT e especula-se se as células dendríticas não seriam importantes na fisiopatologia do linfoma. Sugere-se a possibilidade de estudar mais profundamente as proteínas envolvidas na resposta imunológica como alvo terapêutico.

Finalmente há hiperexpressão e expressão diferenciada de fatores envolvidos na via de sinalização NF- κ B avaliada pela expressão de c-rel e Bcl-10. Confirmando os dados de literatura e indicando a necessidade de novos estudos neste campo.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Concluimos o estudo demonstrando que a expressão protéica por imunohistoquímica de fatores associados à via extrínseca de apoptose, à resposta imunológica e inflamatória e à via de sinalização NF- κ B, têm no linfoma MALT padrões diferentes dos padrões observados nas gastrites e nos tecidos normais:

- 1 Na via extrínseca de apoptose observamos menor expressão de FAS e FAS-L no linfoma MALT. A Caspase-8 apresenta maior expressão nas gastrites, quando comparada ao linfoma MALT e ao normal;
- 2 Na resposta imunológica e inflamatória observamos maior expressão de HLA-DR, STAT-1 e S-100 no linfoma MALT. A expressão da NOS-2, relacionada com a resposta inflamatória é maior nas gastrites, seguida em intensidade por aquela do tecido normal e tem menor expressão no linfoma MALT;
- 3 Na via de sinalização NF- κ B observamos maior expressão do c-Rel no linfoma MALT quando comparado ao tecido normal e à gastrite. O Bcl-10 apresenta padrão nuclear de expressão em 11 pacientes (19,64%), padrão específico do linfoma MALT, que não foi observado na gastrite e no estômago normal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Algood HM, Gallo-Romero J, Wilson KT, Peek RM Jr, Cover TL. Host response to *Helicobacter pylori* infection before initiation of the adaptive immune response. **FEMS Immunol Med Microbiol** 2007; 51:577-86.

Andrade VP, Soares FA. FAS expression in DLBCL [Letter]. **Am J Hematol** 2007 82:331.

Archimandritis A, Sougioultzis S, Foukas PG, Tzivras M, Davaris P, Moutsopoulos HM. Expression of HLA-DR, costimulatory molecules B7-1, B7-2, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and Fas ligand (FasL) on gastric epithelial cells in *Helicobacter pylori* gastritis; influence of *H. pylori* eradication. **Clin Exp Immunol** 2000; 119:464-71.

Aujla SJ, Dubin PJ, Kolls JK. Th17 cells and mucosal host defense. **Semin Immunol** 2007 Nov 26; [Epub ahead of print]

Barth TF, Martin-Subero JI, Joos S, et al. Gains of 2p involving the REL locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma. **Blood** 2003; 101:3681-6.

Bergman M, Del Prete G, van Kooyk Y, Appelmelk B. *Helicobacter pylori* phase variation, immune modulation and gastric autoimmunity. **Nat Rev Microbiol** 2006; 4:151-9.

Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. **J Clin Invest** 2004; 113:321-33.

Bots M, Offringa R, Medema JP. Does the serpin PI-9 protect tumor cells? **Blood** 2006; 107:4974-5.

Carbone A, Manconi R, Poletti A, Volpe R. Significance of S-100 protein immunostaining in the immunohistological analysis of normal and neoplastic lymphoid tissues--an appraisal. **Int J Biol Markers** 1986; 1:57-66.

Caruso R, Pallone F, Monteleone G. Emerging role of IL-23/IL-17 axis in H pylori-associated pathology. **World J Gastroenterol** 2007;13:5547-51.

Darom A, Gomatos IP, Leandros E, Xatziyiannis E, Fotiadis C, Konstadoulakis MM. HLA-DR antigen and bax protein expression in patients with primary non-Hodgkin's gastric lymphoma. **Hybrid Hybridomics** 2004; 23:87-92.

Darom A, Gomatos IP, Leandros E, et al. Molecular markers (PECAM-1, ICAM-3, HLA-DR) determine prognosis in primary non-Hodgkin's gastric lymphoma patients. **World J Gastroenterol** 2006; 12:1924-32.

D'Elios MM, Amedei A, Manghetti M, et al. Impaired T-cell regulation of B-cell growth in Helicobacter pylori — related gastric low-grade MALT lymphoma. **Gastroenterology** 1999; 117:1105-12.

D'Elios MM, Amedei A, Del Prete G. Helicobacter pylori antigen-specific T-cell responses at gastric level in chronic gastritis, peptic ulcer, gastric cancer and low-grade mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. **Microbes Infect** 2003; 5:723-30.

D'Elios MM, Appelmelk BJ, Amedei A, Bergman MP, Del Prete G. Gastric autoimmunity: the role of Helicobacter pylori and molecular mimicry. **Trends Mol Med** 2004; 10:316-23.

D'Elios MM, Amedei A, Benagiano M, Azzurri A, Del Prete G. Helicobacter pylori, T cells and cytokines: the "dangerous liaisons". **FEMS Immunol Med Microbiol** 2005; 44:113-9.

D'Elios MM, Montecucco C, de Bernard M. VacA and HP-NAP, Ying and Yang of Helicobacter pylori-associated gastric inflammation. **Clin Chim Acta** 2007; 381:32-8.

Dogliani C, Wotherspoon AC, Moschini A, de Boni M, Isaacson PG. High incidence of primary gastric lymphoma in Northeastern Italy. **Lancet** 1992; 339:834-5.

Eser B, Sari I, Canoz O, et al. Prognostic significance of Fas (CD95/APO-1) positivity in patients with primary nodal diffuse large B-cell lymphoma. **Am J Hematol** 2006; 81:307-14.

Farinha P, Gascoyne RD. Molecular pathogenesis of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. **J Clin Oncol** 2005; 23:6370-8.

Ferch U, zum Büschenfelde CM, Gewies A, et al. MALT1 directs B cell receptor-induced canonical nuclear factor-kappaB signaling selectively to the c-Rel subunit. **Nat Immunol** 2007; 8:984-91.

Ferrero RL. Innate immune recognition of the extracellular mucosal pathogen, Helicobacter pylori. **Mol Immunol** 2005; 42:879-85.

Fracchiolla NS, Lombardi L, Salina M, et al. Structural alterations of the NF-kappa B transcription factor I κ B in lymphoid malignancies. **Oncogene** 1993; 8:2839-45.

Fritz JH, Le Bourhis L, Magalhaes JG, Philpott DJ. Innate immune recognition at the epithelial barrier drives adaptive immunity: APCs take the back seat. **Trends Immunol** 2008; 29:41-9.

Fulop T, Larbi A, Douziech N, Levesque I, Varin A, Herbein G. Cytokine receptor signalling and aging. **Mech Ageing Dev** 2006; 127:526-37.

Georgopoulos SD, Triantafyllou K, Fameli M, et al. Molecular analysis of B-cell clonality in Helicobacter pylori gastritis. **Dig Dis Sci** 2005; 50:1616-20.

Gilmore TD. Multiple mutations contribute to the oncogenicity of the retroviral oncoprotein v-Rel. **Oncogene** 1999; 18:6925-37.

Gilmore TD, Kalaitzidis D, Liang MC, Starczynowski DT. The c-Rel transcription factor and B-cell proliferation: a deal with the devil. **Oncogene** 2004; 23:2275-86.

Godal R, Keilholz U, Uharek L, et al. Lymphomas are sensitive to perforin-dependent cytotoxic pathways despite expression of PI-9 and overexpression of bcl-2. **Blood** 2006; 107:3205-11.

Gongora R, Stephan RP, Schreiber RD, Cooper MD. Stat-1 is not essential for inhibition of B lymphopoiesis by type I IFNs. **J Immunol** 2000; 165:2362-6.

Greiner A, Seeberger H, Knörr C, Müller-Hermelink HK. MALT-type B-cell lymphomas escape fas-mediated apoptosis. **Verh Dtsch Ges Pathol** 1999; 83:247-53.

Guicciardi ME, Gores GJ. The death receptor family and the extrinsic pathway. In: Yin XM, Dong Z, et al. editors. **Essentials of apoptosis**. Totowa-New Jersey: Humana; 2003. p.67-84.

Hafsi N, Voland P, Schwendy S, et al. Human dendritic cells respond to Helicobacter pylori, promoting NK cell and Th1-effector responses in vitro. **J Immunol** 2004; 173:1249-57.

Hansson M, Lundgren A, Elgbratt K, Quiding-Järbrink M, Svennerholm AM, Johansson EL. Dendritic cells express CCR7 and migrate in response to CCL19 (MIP-3beta) after exposure to *Helicobacter pylori*. **Microbes Infect** 2006; 8:841-50.

Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappa B. **Genes Dev** 2004; 18:2195-224.

Ho L, Davis RE, Conne B, et al. MALT1 and the API2-MALT1 fusion act between CD40 and IKK and confer NF-kappa B-dependent proliferative advantage and resistance against FAS-induced cell death in B cells. **Blood** 2005; 105:2891-9.

Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. **Nat Rev Immunol** 2005; 5:521-31.

Hussell T, Isaacson PG, Crabtree JE, Spencer J. The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to *Helicobacter pylori*. **Lancet** 1993; 342:571-4.

Inagaki H, Nakamura T, Li C, Sugiyama T, et al. Gastric MALT lymphomas are divided into three groups based on responsiveness to *Helicobacter Pylori* eradication and detection of API2-MALT1 fusion. **Am J Surg Pathol** 2004; 28:1560-7.

Isaacson PG, Write DH. Malignant lymphoma of mucosa – associated lymphoid tissue: a distinctive type of B cell lymphoma. **Cancer** 1983; 52:1410-6.

Isaacson PG, Write DH. Extranodal malignant lymphoma arising from mucosa – associated lymphoid tissue. **Cancer** 1984; 53:2515-24.

Isaacson PG, Muller-Hermelink HK, Piris MA, et al. Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma). In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editors, **Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. Lyon: IARC; 2001. p.157-61. (World Health Organization Classification of Tumours).

Isaacson PG, Du MQ. MALT lymphoma: from morphology to molecules. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:644-53.

Isaacson PG, Du MQ. Gastrointestinal lymphoma: where morphology meets molecular biology. **J Pathol** 2005; 205:255-74.

Israel DA, Peek RM Jr. The role of persistence in *Helicobacter pylori* pathogenesis. **Curr Opin Gastroenterol** 2006; 22:3-7.

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editors, **Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. Lyon: IARC; 2001. WHO histological classification of mature B-cell neoplasms; p.120. (World Health Organization Classification of Tumours).

Kao JY, Rathinavelu S, Eaton KA, et al. *Helicobacter pylori*-secreted factors inhibit dendritic cell IL-12 secretion: a mechanism of ineffective host defense. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 2006; 291:73-81.

Kawahara Y, Mizuno M, Yoshino T, et al. HLA-DQA1*0103-DQB1*0601 haplotype and *Helicobacter pylori*-positive gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. **Clin Gastroenterol Hepatol** 2005; 3:865-8.

Kojima Y, Tsurumi H, Goto N, et al. Fas and Fas ligand expression on germinal center type-diffuse large B-cell lymphoma is associated with the clinical outcome. **Eur J Haematol** 2006; 76:465-72.

Krauss-Etschmann S, Gruber R, Plikat K, et al. Increase of antigen-presenting cells in the gastric mucosa of *Helicobacter pylori*-infected children. **Helicobacter** 2005; 10:214-22.

Kunkel EJ, Butcher EC. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. **Immunity** 2002; 16:1-4.

Lehours P, Ruskone-Fourmestreaux A, Lavergne A, Cantet F, Mégraud F; Groupe d'Etude des Lymphomes Digestifs (GELD) for the Fédération Française de Cancérologie Digestive (FFCD). Which test to use to detect *Helicobacter pylori* infection in patients with low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma? **Am J Gastroenterol** 2003; 98:291-5.

Li HL, Sun BZ, Ma FC. Expression of COX-2, iNOS, p53 and Ki-67 in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. **World J Gastroenterol** 2004; 10:1862-6.

Lin X, Wang D. The roles of CARMA1, Bcl10, and MALT1 in antigen receptor signaling. **Semin Immunol** 2004; 16:429-35.

Liou HC, Hsia CY. Distinctions between c-Rel and other NF-kappaB proteins in immunity and disease. **Bioessays** 2003; 25:767-80.

Magnusson PKE, Enroth H, Eriksson I, et al. Gastric cancer and human leukocyte antigen: distinct DQ and DR alleles are associated with development of gastric cancer and infection by *Helicobacter pylori*. **Cancer Res** 2001; 61:2684-9.

Marshall BJ, Windsor HM. The relation of *Helicobacter pylori* to gastric adenocarcinoma and lymphoma: pathophysiology, epidemiology, screening, clinical presentation, treatment, and prevention. **Med Clin North Am** 2005; 89:313-44.

Mueller A, O'rourke J, Chu P, et al. The role of antigenic drive and tumor-infiltrating accessory cells in the pathogenesis of helicobacter-induced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. **Am J Pathol** 2005; 167:797-812.

Murphy BM, Martin SJ. Caspases. In: Yin XM, Dong Z, et al. editors. **Essentials of apoptosis**. Totowa-New Jersey: Humana; 2003. p.3-12.

Musatti CC, Lima MG, Campos EF. Sistema immune. In: Garcia VD, Abbud Filho M, Neumann J, Pestana JOM, editores. **Transplante de órgãos e tecidos**. 2 ed. São Paulo: Segmento Farma; 2006. p.197-215.

Neri A, Chang CC, Lombardi L, et al. B cell lymphoma-associated chromosomal translocation involves candidate oncogene *lyt-10*, homologous to NF-kappa B p50. **Cell** 1991; 67:1075-87.

Peek RM Jr, Blaser MJ. Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:28-37.

Perri F, Piepoli A, Quitadamo M, Quarticelli M, Merla A, Bisceglia M. HLA-DQA1 and -DQB1 genes and Helicobacter pylori infection in Italian patients with gastric adenocarcinoma. **Tissue Antigens** 2002; 59:55-7.

Pileri SA, Grogan TM, Harris NL, et al. Tumours of histiocytes and accessory dendritic cells: an immunohistochemical approach to classification from the International Lymphoma Study Group based on 61 cases. **Histopathology** 2002; 41:1-29.

Poppema S, Maggio E, van den Berg A. Development of lymphoma in Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS) and its relationship to Fas gene mutations. **Leuk Lymphoma** 2004; 45:423-31.

Quintero E, Pizarro MA, Rodrigo L, et al. Association of Helicobacter pylori-related distal gastric cancer with the HLA class II gene DQB10602 and cagA strains in a southern European population. **Helicobacter** 2005; 10:12-21.

Reith W, LeibundGut-Landmann S, Waldburger JM. Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. **Nat Rev Immunol** 2005; 5:793-806.

Roggero E, Zucca E, Pinotti G, et al. Eradication of Helicobacter pylori infection in primary low-grade gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. **Ann Intern Med** 1995; 122:767-9.

Sackstein R. The lymphocyte homing receptors: gatekeepers of the multistep paradigm. **Curr Opin Hematol** 2005; 12:444-50.

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

Schantz N, Bourgeade MF, Mouhamad S, Leca G, Sharma S, Vazquez A. p38-mediated regulation of an Fas-associated death domain protein-independent pathway leading to caspase-8 activation during TGFbeta-induced apoptosis in human Burkitt lymphoma B cells BL41. **Mol Biol Cell** 2001; 12:3139-51.

Seeberger H, Starostik P, Schwarz S, et al. Loss of Fas (CD95/APO-1) regulatory function is an important step in early MALT-type lymphoma development. **Lab Invest** 2001; 81:977-86.

Stephanou A, Latchman DS. STAT-1: a novel regulator of apoptosis. **Int J Exp Pathol** 2003; 84:239-44.

Streubel B, Vinatzer U, Lamprecht A, Raderer M, Chott A. T(3;14)(p14.1;q32) involving IGH and FOXP1 is a novel recurrent chromosomal aberration in MALT lymphoma. **Leukemia** 2005; 19:652-8.

Suarez F, Lortholary O, Hermine O, Lecomte M. Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven lymphoproliferation. **Blood** 2006;107:3034-44.

Suerbaum S, Michetti P. Helicobacter pylori infection. **N Engl J Med** 2002; 347:1175-86

Starczynowski DT, Reynolds JG, Gilmore TD. Deletion of either C-terminal transactivation subdomain enhances the in vitro transforming activity of human transcription factor REL in chicken spleen cells. **Oncogene** 2003; 22:6928-36.

Takemoto S, Mulloy JC, Cereseto A, et al. Proliferation of adult T cell leukemia/lymphoma cells is associated with the constitutive activation of JAK/STAT proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1997; 94:13897-902.

Thieblemont C, Coiffier B. MALT lymphomas: sites of presentations, clinical features and staging procedures. In: Bertoni F, Zucca E, et al, editors. **MALT lymphomas**. Georgetown-New York: Landes - Kluwer; 2004. p.60-80.

Tripathi P, Tripathi P, Kashyap L, Singh V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. **FEMS Immunol Med Microbiol** 2007; 51:443-52.

Turco MC, Romano MF, Petrella A, Bisogni R, Tassone P, Venuta S. NF-kappaB/Rel-mediated regulation of apoptosis in hematologic malignancies and normal hematopoietic progenitors. **Leukemia** 2004; 18:11-7.

Van den Berg A, Maggio E, Diepstra A, de Jong D, van Krieken J, Poppema S. Germline. FAS gene mutation in a case of ALPS and NLP Hodgkin lymphoma. **Blood** 2002; 99:1492-4.

Vassallo J, Godoy CE Jr, Godoy CE, Chagas CA, Metze K, Trevisan MA. Immunoexpression of CD95 in chronic gastritis and gastric mucosa-associated lymphomas. **Braz J Med Biol Res**. 2004; 37:1397-401.

Viatour P, Merville MP, Bours V, Chariot A. Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. **Trends Biochem Sci** 2005; 30:43-52.

Wilson KT, Crabtree JE. Immunology of Helicobacter pylori: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. **Gastroenterology** 2007; 133:288-308.

Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG. Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. **Lancet** 1991; 338:1175-6.

Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, et al. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of Helicobacter pylori. **Lancet** 1993; 342:575-7.

Wündisch T, Neubauer A, Stolte M, Ritter M, Thiede C. B-cell monoclonality is associated with lymphoid follicles in gastritis. **Am J Surg Pathol** 2003; 27:882-7.

Yamasaki R, Yokota K, Okada H, Hayashi S, Mizuno M, Yoshino T, Hirai Y, Saitou D, Akagi T, Oguma K. Immune response in Helicobacter pylori-induced low-grade gastric-mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. **J Med Microbiol** 2004; 53:21-9.

Ye H, Dogan A, Karran L, et al. BCL10 expression in normal and neoplastic lymphoid tissue. Nuclear localization in MALT lymphoma. **Am J Pathol** 2000; 157:1147-54.

Ye H, Liu H, Attygalle A, et al. Variable frequencies of t(11;18)(q21;q21) in MALT lymphomas of different sites: significant association with CagA strains of H pylori in gastric MALT lymphoma. **Blood** 2003; 102:1012-8.

Yeh KH, Kuo SH, Chen LT, et al. Nuclear expression of BCL10 or nuclear factor kappa B helps predict Helicobacter pylori-independent status of low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas with or without t(11;18)(q21;q21). **Blood** 2005; 106:1037-41.

Zhang G, Fu Y. Antiproliferative effect of indomethacin on CML cells is related to the suppression of STATs/Bcl-XL signal pathway. **Ann Hematol** 2006; 85:443-9.

Zhang Q, Siebert R, Yan M, et al. Inactivating mutations and overexpression of BCL10, a caspase recruitment domain-containing gene, in MALT lymphoma with t(1;14)(p22;q32). **Nat Genet** 1999; 22:63-8.

ANEXOS

Anexo 1 - Distribuição dos pacientes portadores de linfoma gástrico MALT por idade, gênero, cor e estágio ao diagnóstico,

Casos	Idade	Cor	Gênero	Estadio
1	48	Br	Fem	I
2	49	Am	Masc	II
3	54	Br	Masc	NI*
4	65	Br	Fem	I
5	58	Br	Masc	NI*
6	46	Br	Fem	III
7	54	Br	Masc	NI*
8	66	Br	Masc	IV
9	47	Br	Masc	NI*
10	52	Neg	Fem	NI*
11	60	Br	Masc	NI*
12	50	Br	Fem	IV
13	46	Br	Masc	NI*
14	33	Br	Fem	II
15	80	Br	Masc	NI*
16	84	Br	Masc	NI*
17	30	Br	Fem	NI*
18	75	Br	Masc	I
19	43	Br	Masc	I
20	46	Br	Masc	I
21	41	Br	Masc	I
22	40	Br	Masc	I
23	71	Br	Masc	NI*
24	52	Br	Fem	I
25	50	Br	Masc	NI*
26	59	Br	Fem	III
27	54	Am	Masc	I
28	52	Br	Fem	IV
29	82	Br	Masc	IV
30	55	Br	Fem	IV
31	37	Br	Masc	I
32	43	Br	Fem	III
33	27	Br	Masc	II
34	64	Br	Fem	IV

35	80	Br	Fem	I
36	54	Br	Fem	II
37	56	Br	Masc	I
38	50	Br	Masc	NI*
39	72	Br	Fem	II
40	67	Br	Fem	NI*
41	36	Br	Fem	NI*
42	85	Br	Fem	IV
43	57	Br	Masc	NI*
44	44	Br	Masc	I
45	68	Br	Fem	NI*
46	49	Br	Fem	NI*
47	52	Br	Fem	I
48	57	Br	Fem	I
49	56	Br	Fem	NI*
50	59	Br	Fem	NI*
51	48	Br	Masc	IV
52	70	Am	Fem	NI*
53	50	Neg	Fem	IV
54	65	Br	Fem	III
55	70	Br	Fem	I
56	69	Am	Masc	NI*

Legenda: Am=amarela, Br=branca, Neg=negra, Masc=masculino, Fem=feminino, NI*=não informado.

Anexo 2 - Comparação dos sistemas de estadiamento propostos para o linfoma gástrico MALT.

Extensão do Tumor	Ann Arbor	Musshoff	Sistema de Lugano	TNM adaptado para Carcinoma gástrico
Confinado ao Trato Gastrointestinal				
Mucosa e submucosa	IE	IE	I	T1N0M0
Muscular	IE	IE	I	T2N0M0
Serosa	IE	IE	I	T3N0M0
Extensão para o abdome				
Linfonodos perigástricos	IIE	IIE1	II1	T4N0M0
Linfonodos regionais mais distantes	IIE	IIE2	II2	T1-3N2M0
Invasão de estruturas adjacentes	IE	IE	IIE	T4N0M0
Disseminação em linfonodos supradiaphragmáticos ou envolvimento intranodal				
Linfonodos dos dois lados do diafragma	IIIE	IIIE	IIIE	T1-4N1M0
Disseminação em outros sítios nodais ou extranodais	IVE	IVE	IVE	T1-4N03M1

Fonte: BERTONI e ZUCCA (2004)

Anexo 3 - Protocolo de Reações Imunoistoquímicas.

Anticorpos utilizados para as reações imunoistoquímicas, seus protocolos de recuperação antigênica e sistemas de amplificação.

Quadro 1 - Protocolo de recuperação de antígenos e sistema de amplificação.

Anticorpos	Recuperação de antígenos	Sistema de Amplificação
H. pylori	Protocolo II	Protocolo C
FAS (C20)	Protocolo II	Protocolo B
FAS-L (N20)	Protocolo II	Protocolo B
Caspase 8	Protocolo II	Protocolo B
STAT-1 p84-p91	Protocolo II	Protocolo B
HLA-Class II (DR)	Protocolo II	Protocolo B
Proteína S-100	Protocolo I	Protocolo C
c-Rel (N466)	Protocolo II	Protocolo B
NOS type II (i-NOS)	Protocolo II	Protocolo B
Granzima B	Protocolo III	Protocolo B
Bcl10	Protocolo III	Protocolo A

Descrição da técnica de Imunoistoquímica:

- 1 Desparafinização dos cortes de 3 μm de espessura, do material incluído em parafina, em lâminas previamente tratadas com 3-aminopropyltriethoxy - silano (Sigma, A-3648, EUA), e deixadas por 24 horas em estufa 60°C;
- 2 Xilol a 60°C por 20 minuto;
- 3 Xilol à temperatura ambiente por 20 minutos;
- 4 Etanol 100% 30segundos;
- 5 Etanol 95% 30 segundo;
- 6 Etanol 70% 30 segundo;

- 7 Lavar as lâminas em água corrente e destilada;
- 8 Recuperação de antígenos.

A recuperação de antígenos é feita seguindo o protocolo indicado no Quadro 1.

- a. **Protocolo I** – sem recuperação de antígenos - (Vai para o bloqueio da peroxidase endógena);
 - b. **Protocolo II** - Ferver a solução tampão citrato 10 mM pH 6.0 em panela de pressão (Eterna[®], Nigro) destampada, mergulhar as lâminas e lacrar a panela com a válvula de segurança aberta;
 - c. **Protocolo III** – Ferver a solução Tampão de Tris – EDTA 1mM pH 9.0 em panela de pressão (Eterna[®], Nigro) destampada, mergulhar as lâminas e lacrar a panela com a válvula de segurança aberta.
- 9 Após a saída do vapor saturado, abaixar a válvula de segurança e aguardar a pressurização total. Contar 4 minutos após esse sinal;
 - 10 Deixar a panela fechada sob água corrente por 10 minutos. Destampar a panela com as lâminas e deixar por mais 10 minutos à temperatura ambiente;
 - 11 Lavar as lâminas em água corrente e destilada;
 - 12 Proceder ao bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 3%, (água oxigenada 10 vol.) com 4 trocas de 5 minutos cada;
 - 13 Lavar em água corrente e destilada;
 - 14 Lavar com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10mM pH 7.4 por 5 minutos;
 - 15 Incubar as lâminas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido conforme tabela abaixo em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN₃) 0,1%, por 18 horas a 4°C em câmara úmida;

- 16 Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada;
- 17 Sistemas de Amplificação.

O sistema de amplificação segue o protocolo indicado no Quadro 1.

- a. **Protocolo A** – Incubar por 30 min a 37° C com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer cod # RE7260-k, Reino Unido);
Lavar com tampão PBS com 3 trocas de 3 min cada.
Incubar com o NovoLink Polymer por 30 min a 37° C

 - b. **Protocolo B** - Incubar com o anticorpo secundário biotilado-reagente C (Biotinylated goat anti-mouse/rabbit Ig) do kit StreptABComplex/HRP Duet (mouse/rabbit) (Dako A/S, cod# K492, Dinamarca) no título pré-estabelecido de 1:200, diluído em PBS, por 30 minutos a 37°C.)
Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.
Incubar com o complexo - reagente A (Streptavidin) e reagente B (Biotinylated peroxydase) nos títulos pré-estabelecidos de 1:200, diluído em PBS, por 30 minutos a 37°C.

 - c. **Protocolo C** – Incubar com EnVision Plus System Labelled Polymer – HRP anti-Rabbit (DakoCytomation, cod # K4003, Carpinteria, EUA), por 30 min a 37° C.
- 18 Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada;
 - 19 Incubar as lâminas em solução substrato: 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) 60 mg% (Sigma, D-5637, EUA); 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1 mL de H₂O₂ 6% (água oxigenada 20 vol); 100 mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz;
 - 20 Observar ao microscópio, nas lâminas controles, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação;
 - 21 Lavar em água corrente e água destilada por 3 minutos;

- 22 Contracorar com Hematoxilina de Harris por 1 minuto;
- 23 Lavar bem em água corrente e destilada;
- 24 Imergir 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%), lavando em seguida em água corrente e destilada;
- 25 Desidratar as lâminas em: Etanol 80%, 30 segundos; Etanol 95%, 30 segundos; Etanol 100% 2 vezes, 30 segundos cada; Xilol 4 vezes, 30 segundos cada;
- 26 Montagem das lâminas em Entellan neu (Merck, 1.07961, Alemanha)