JUVANI LAGO SATURNO

**Análise imuno-histoquímica da Bcl-2, Bcl-6, c-Myc e Ciclina D1 em Linfomas de
Células B da Região Oral**

São Paulo

2013

JUVANI LAGO SATURNO

Análise imuno-histoquímica da Bcl-2, Bcl-6, c-Myc e Ciclina D1 em Linfomas de Células B da Região Oral

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Área de Concentração: Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada

Orientadora: Profa. Dra. Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Saturno, Juvani Lago.

Análise imuno-histoquímica da Bcl-2, Bcl-6, c-Myc e Ciclina D1 em Linfomas de Células B da Região Oral / Juvani Lago Saturno ; orientador Suzana Cantanhede Orsini Machado de Souza. -- São Paulo, 2013.

55 p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada . -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Linfoma. 2. Ciclina D1. 3. Proteínas. I. Souza, Suzana Cantanhede Orsini Machado de. II. Título.

Saturno JL. Análise imuno-histoquímica da Bcl-6, Bcl-2, c-Myc e Ciclina D1 em linfomas de células B da região oral. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: ____/____/2014

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a).____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a).Dr(a).____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a).Dr(a).____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus pais Justino e Maria Aparecida e aos meus avós Francisco (in memorian) e Conceição, que sempre me incentivaram a conseguir o que há de melhor e que sempre fizeram de tudo para ensinar os melhores valores humanos aos filhos. Obrigado por terem dedicado suas vidas a educar os filhos da melhor maneira e a nos ensinarem a não desistirmos de nossos desejos. Vocês serão sempre os meus maiores exemplos. Dedico também a todos os professores que tive na vida, titulados ou não, pois sem eles chegar até aqui não seria possível. Minha gratidão especialmente à Eliza, pela companhia fortalecedora que me faz melhorar a cada dia. Obrigado pelo incentivo, pela paciência e pelo amor dedicado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora **Profa. Dra. Suzana C. O. Machado de Sousa**, por me ajudar a tornar esta dissertação possível. Agradeço por me auxiliar na continuidade dos estudos e pela dedicação e cuidado com que trata todos alunos. Exemplo de profissional da Educação e da Odontologia. Muito obrigado pela compreensão e pela oportunidade dada para que pudesse conciliar o trabalho com os estudos.

Ao **Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes**, pelo incentivo e auxílio na execução deste trabalho, pela compreensão nos momentos ausentes do laboratório, por ser um exemplo de pesquisador, pelas sugestões, ensinamentos, correções e pela oportunidade de trabalho conjunto. Muito Obrigado.

Aos Professores Décio dos Santos Pinto Junior, Andréa Mantesso, Marina Helena Cury Gallottini, Marília Trierveiler Martins e Karem López Ortega, por todo aprendizado, apoio e convivência agradável. Obrigado por conduzirem o programa com os maiores esforços, pela exemplar dedicação ao ensino e à pesquisa científica.

Muito obrigado às minhas companheiras de laboratório e de profissão **Elisa dos Santos e Adriana Fraga Costa Samos Paris**. Agradeço pela ajuda na execução das análises, pela compreensão nos momentos de ausência e pelos momentos divertidos. Obrigado pela amizade, pelo incentivo, pela ajuda nos momentos bons e nos mais complicados, não somente da vida profissional.

Zilda, Néia e Nair, muito obrigado pela ajuda nos assuntos burocráticos, pelo incentivo, pela companhia, pelo convívio agradável e pela amizade.

A todos os colegas do curso de pós-graduação, obrigado pela troca de experiências e pela companhia.

Ao **Serviço de Documentação Odontológica** pela ajuda na formatação do trabalho. Muito Obrigado!

“O mundo é um livro, e quem fica sentado em casa lê somente uma página”.
Santo Agostinho de Hipona

RESUMO

Saturno JL. Análise imuno-histoquímica da Bcl-2, Bcl-6, c-Myc e ciclina D1 em linfomas de células B da região oral [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Corrigida

Neste trabalho foram analisados 30 casos de linfomas de células B da região oral, fixados em solução de formaldeído e incluídos em parafina, através da técnica de imuno-histoquímica para as proteínas c-Myc, Bcl-2, Bcl-6 e ciclina D1. Dos casos analisados 40% foram positivos para a marcação para c-Myc, 33,3% para a marcação para ciclina D1, 83,3% para a marcação para Bcl-2 e 53,3% para a marcação para Bcl-6. Todos os casos foram diagnosticados como linfomas difusos de grandes células B, o subtipo de linfoma com a maior casuística. A análise destas proteínas é de fundamental importância para o diagnóstico e direcionamento do tratamento de doenças hematopoiéticas, pois estão envolvidas em vários processos de controle da transcrição gênica, do ciclo celular e dos processos apoptóticos e o aumento do conhecimento sobre sua ação em diferentes subtipos de linfomas pode corroborar outros estudos.

Palavras-chave: Linfomas. Bcl-2. Bcl-6. c-Myc. Ciclina D. Células B.

ABSTRACT

Saturno JL. Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bcl-6, c-Myc and Cyclin D in B cell lymphomas of the oral region [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Corrigida

In this study, 30 cases of formalin-fixed and paraffin-embedded B-cell lymphomas of the oral region were submitted to immunohistochemistry for the detection of proteins c-Myc, Bcl-2, Bcl-6 and cyclin D1. Forty percent (40%) of the studied cases were positive for c-Myc, 10% for cyclin D1, 83.3% for Bcl-2 and 53.3% for Bcl-6. The analysis of these proteins has fundamental importance for the diagnosis and treatment course of hematopoietic diseases, because they are involved in various processes controlling gene transcription and cell cycle. All cases were diffuse large B-cell lymphomas, the subtype with the highest incidence.

The analysis of these proteins is very important for the diagnosis and treatment course of hematopoietic diseases, because they are involved in various processes controlling gene transcription, cell cycle and apoptotic processes and an increase in the knowledge of their action in different subtypes of lymphomas can corroborate to other studies.

Keywords: Lymphoma. Bcl-6. Bcl-2. c-Myc. Cyclin D1. B cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 - Ilustração representando o modelo proposto por Hans para classificação dos LDGCB.....	17
Figura 2.2 - Ilustração representando as interações entre os membros da família Bcl-2, CD95 (FAS), p53 e c-Myc no processo apoptótico .	19
Figura 2.3 - Ilustração representando processos envolvidos no LDGCB-GCB	21
Figura 2.4 - Ilustração representando a participação da proteína c-Myc nos processos de transcrição fisiológicos normais e na oncogênese ...	22
Figura 5.1 - Resultados das reações imuno-histoquímicas para Bcl-2. Observa- se positividade difusa da proteína Bcl-2, onde se pode verificar o padrão nuclear da marcação em casos de LDGCB.	33
Figura 5.2 - Imagem do resultado da reação imuno-histoquímicas para Bcl-6	34
Figura 5.3 - Imagem do resultado da reação imuno-histoquímicas para Ciclina D1.	35
Figura 5.4 - Resultados das reações imuno-histoquímicas para c-Myc em diferentes casos de LDGCB, demonstrando marcação nuclear	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Anticorpos primários utilizados nas reações imuno-histoquímicas na análise dos LDGCB e respectivo protocolo de uso aplicado 27

Tabela 5.1 – Resultados das reações imuno-histoquímicas para Bcl-2, Bcl-6, c-Myc e Ciclina D1 30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>BCL2</i>	gene “B-cell lymphoma 2”
Bcl-2	proteína “B-cell lymphoma 2”
<i>BCL6</i>	gene “B-cell lymphoma 6”
Bcl-6	proteína “B-cell lymphoma 6”
<i>CCND1</i>	<i>gene</i> da Ciclina D1
CD	“cluster of differentiation”
CDK	“cyclin dependent kinase”
<i>MYC</i>	gene da c-Myc
DNA	“deoxyribonucleic acid”
RNA	“ribonucleic acid”
EBV	“Epstein-Barr virus”
FISH	“fluorescent in situ hybridization”
LCM	linfoma de células do manto
LDGCB	linfoma difuso de grandes células B
LF	linfoma folicular
LP	linfoma plasmoblástico
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
PCR	“polymerase chain reaction”
qPCR	“quantitative polymerase chain reaction”

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
3 PROPOSIÇÃO	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
5 RESULTADOS.....	31
5.1 Análise dos resultados das reações imuno-histoquímicas.....	32
5.1.1 Análise dos resultados para marcação da proteína Bcl-2	32
5.1.2 Análise dos resultados para a marcação da proteína Bcl-6	33
5.1.3 Análise dos resultados para a marcação da proteína c-Myc	33
5.1.4 Análise dos resultados para marcação da proteína Ciclina D1	33
6 DISCUSSÃO	38
7 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS.....	46
ANEXO.....	55

1 INTRODUÇÃO

Os linfomas são um conjunto de neoplasias malignas do sistema linfático, que se originam dos linfócitos nos linfonodos. Classificam-se, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) em linfomas de Hodgkin e linfomas não Hodgkin. Os linfomas de Hodgkin se caracterizam principalmente pela presença na análise histológica de linfócitos binucleados, conhecidos como células de Reed-Sternberg. Os linfomas não Hodgkin são divididos em mais de 20 subtipos com aspecto morfológico, clínico, imuno-histoquímico e genético diferenciado, podendo se apresentar tanto em linfócitos B, assim como em linfócitos T.

Estudos tem demonstrado que o linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) é o linfoma mais frequente na cavidade oral, ocorrendo principalmente nos tecidos moles. Também demonstram que na ampla gama de LDGCB há diferenças na expressão proteica de diversas moléculas, o que pode indicar diferentes respostas a determinados tratamentos ou diferenças no padrão de desenvolvimento da doença.

A proteína Bcl-2 (do inglês “B cell CLL/lymphoma-2”) pertence a uma família de proteínas que são conhecidas por controlar a integridade da membrana mitocondrial externa e a apoptose. O proto-oncogene *BCL2* está localizado no cromossomo 18q21 e se encontra frequentemente translocado em casos de linfoma folicular (LF) e no linfoma difuso de grandes células B (LDGCB), com sua expressão na análise por imuno-histoquímica alterada.

A proteína Bcl-6 é um fator de transcrição ligado ao zinco com um domínio N-terminal BTB/POZ e motivos ligantes ao DNA do tipo dedo de zinco na extremidade C-terminal. Age como um repressor da transcrição gênica e pode se encontrar com expressão alterada nos LDGCB, LF e no linfoma de Burkitt.

A proteína c-Myc age como um fator de transcrição, na forma de dímero com a proteína MAX e o gene *MYC* é encontrado alterado por ampliações,

translocações ou mecanismos dependentes de microRNAs. Estima-se que cerca de 10% dos genes humanos tenham a expressão controlada pela *MYC* que participa dos processos de divisão celular, crescimento, apoptose e diferenciação, muito importantes na oncogênese.

A proteína ciclina D1 é codificada pelo gene *CCND1* e é essencial no controle do ciclo celular, agindo na transição da fase G1/S. Tem um conhecido potencial oncogênico e é encontrada com sua expressão elevada em várias neoplasias.

Esse trabalho buscou analisar as possíveis diferenças entre os LDGCB, através de reações imuno-histoquímicas para essas quatro proteínas, em casos de linfomas de células B da região oral, do arquivo da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Os linfomas são um conjunto de doenças linfoproliferativas variadas, correspondem de 10 a 15% de todas as neoplasias que podem ocorrer na infância humana e possuem diferentes subtipos que se originam das células do sistema imune ou de seus precursores. São classificados em Linfomas de Hodgkin (LH) e Linfomas não-Hodgkin (LNH). O acometimento extra-nodal ocorre em qualquer estágio da doença, podendo acometer sistema nervoso central, cabeça e pescoço, tórax, abdome, gônadas e ossos, sendo raro no linfoma de Hodgkin (1).

A região do anel de Waldeyer está envolvida em 15-20% dos casos de linfoma e corresponde a 50% dos casos de LNH com acometimento extranodal na região da cabeça e pescoço (2).

Os LNH compreendem um grupo heterogêneo de neoplasias linfóides derivadas principalmente de células B e raramente de células T, sendo que sua incidência tem aumentado durante as últimas décadas. A verificação da ativação de proto-oncogenes por translocações cromossômicas (*MYC*, *BCL2*, *BCL6*, *BCL10*, *BCL1*, *NPM-ALK*) e da inativação de genes supressores tumorais (*TP53*, *CDKN2A*, *ATM*) são importantes para seu diagnóstico e tratamento. As translocações cromossômicas representam o mecanismo principal de ativação de proto-oncogenes nos LNH (3) (4) (5).

Estudos sobre o perfil de expressão genética classificam os LDGCB em dois principais subtipos: o tipo células B do centro germinativo (GCB) e o tipo células B ativadas (ABC), sendo que o GCB parece ter a maior taxa de pacientes sobreviventes. A forma mais prática de reconhecer estes subtipos é através da análise imuno-histoquímica, com aplicação do algoritmo proposto por Hans et al. (6). (Figura 2.1)

O LDGCB expressa vários marcadores específicos de linfócitos B como CD19, CD20, CD22 e CD79a, de acordo com o estágio de maturação das células B (6) (7).

Bcl-2 é a abreviação em inglês para “B cell CLL/lymphoma-2”, uma família de proteínas que são conhecidas por controlar a integridade da membrana mitocondrial externa e a apoptose. O proto-oncogene *BCL2* está localizado no cromossomo 18q21 e sua translocação com o cromossomo 14 induz a formação de uma proteína de 26kDa que pode alterar o processo transcricional (8) (9) (10).

Figura 2.1 – Ilustração representando o modelo proposto por Hans para classificação dos LDGCB

A proteína Bcl-2 foi a segunda identificada no linfoma folicular, com presença da translocação t(14;18)(q32;q21). Essa translocação induz a superexpressão desta proteína e está ligada à tumorigênese desta doença, pois conforme estudos iniciais em camundongos ela inibe a sinalização pró-apoptica na presença conjunta da expressão de MYC (11).

Nas células B, a maior parte se encontra na membrana mitocondrial, mas também foi encontrada na porção citoplasmática de outras membranas, como retículo endoplasmático e na membrana nuclear, sendo capaz de detectar danos nesses compartimentos e modificar seu comportamento frente ao fluxo de pequenas moléculas ou proteínas (11) (12).

A família de proteínas Bcl-2 controla uma etapa importante no processo de regulação da apoptose por permeabilização da membrana mitocondrial externa. A família é dividida em três classes: proteínas pró-

apoptóticas multiregionais que permeabilizam diretamente a membrana mitocondrial externa; proteínas BH3 (Bcl-2 homólogas) sensíveis ao estresse celular e que direta ou indiretamente ativam proteínas Bax e as proteínas anti-apoptóticas que inibem este processo em várias etapas (8).

Semelhante à proteína Bax, a Bcl-2 sofre uma alteração conformacional após as células serem expostas a estímulos apoptóticos (8). Mas, ao contrário da Bax, Bcl-2 é constitutivamente ligada à membrana com a hélice 9 inserida na bicamada lipídica e o resto do polipeptídeo, incluindo a região de formação de poros, localizada no lado citoplasmático da membrana. No entanto, durante a apoptose, o resíduo 158, uma cisteína localizada próxima da base do domínio formador de póros de Bcl-2, move-se do meio aquoso para um ambiente hidrofóbico (8).

Embora esta observação indique claramente que a Bcl-2 sofre uma alteração conformacional durante a apoptose, não revela onde a Bcl-2 está ativa no processo de indução da apoptose. Algumas das etapas candidatas sugeridas por estudos mais recentes incluem ligação e sequestro de proteínas BH3 ativadas ou prevenção da migração da Bax, integração, mudança conformacional ou oligomerização (13).

Foi demonstrado que a expressão imuno-histoquímica de Bcl-2 está correlacionada com uma sobrevida curta em pacientes com LDGCB. A proteína Bcl-2 está presente em níveis baixos em células B do centro germinativo normais, mas em maiores níveis em células de linfomas não-Hodgkin com translocação t (14;18) (14).

A proteína Bcl-6 é um fator de transcrição ligado ao zinco e contém um domínio N-terminal BTB/POZ e seis motivos ligantes ao DNA tipo dedo de zinco na extremidade C-terminal. Essa proteína age como um repressor da transcrição e foi demonstrado que ela é capaz de modular em células B a resposta dependente de IL-4. O gene *BCL-6* tem 23kb e está localizado no cromossomo 3q27, a proteína tem peso de 95kDa (15) (16).

A expressão gênica constitutiva de *BCL-6* está restrita aos linfócitos B dos centros germinativos. A ausência de transcrição de *BCL-6* impede a formação de centros germinativos (17) (18).

BCL-6 é superexpresso nos linfomas de Burkitt, Folicular e nos LDGCB. A translocação que mais ocorre é a t (3;14)(q27;q32), agindo de forma a inibir a diferenciação e a apoptose nos linfócitos B (19) (20) (Figura 2.2).

Figura 2.2 – Ilustração representando as interações entre os membros da família Bcl-2, CD95 (FAS), p53 e c-Myc no processo apoptótico. (Figura adaptada de Cotter, 2009 (21))

Um estudo com pacientes da região amazônica diagnosticados com linfoma de Burkitt demonstrou 100% de positividade nas marcações para Bcl-6 e EBV. (22)

Foi demonstrado que quando expresso, *BCL-6* previne a ativação prematura e a diferenciação de células B do centro germinativo e proporciona um ambiente tolerante às quebras de DNA associadas aos mecanismos de remodelação do gene de imunoglobulinas envolvidos na produção de anticorpos altamente específicos. As principais funções exercidas pela Bcl-6 no desenvolvimento normal das células B podem ser alteradas no processo de malignização. (16)

O domínio BTB é também essencial para atividade transcricional da *BCL6*, de fato, ele age como um repressor transcricional recrutando complexos histona-desacetilase classe I e II diretamente ou através de co-repressores (15).

Rearranjos do *BCL6* foram detectados em aproximadamente 40% dos LDGCB e 5-10% dos LF (23).

A Bcl-6 geralmente é considerada crucial na memória imunológica das células B, como plasmócitos de vida longa e células B de memória. Foi proposto que sua expressão é importante para impedir sua diferenciação em plasmócitos no centro germinativo (24).

Estudos demonstraram que é possível dividir em 2 subgrupos os LDGCB através do uso da imuno-histoquímica para Bcl-6, MUM-1 e CD-10: o subtipo originado do centro germinativo (GCB) e o não originado do centro germinativo (não-GCB). Também há estudos que adicionam ainda o BCL-2 como forma de definir prognóstico (6).

Mutações somáticas de *MEF2B*, um ativador de transcrição, podem contribuir para a linfomagenese por desregular a expressão de *BCL-6*, assim pode ser um alvo alternativo para bloquear a atividade de *BCL-6* nos LDGCB (25).

ETO e Bcl-6 são coexpressos nos tecidos linfóides normais e malignizados, onde interagem no núcleo celular, com ETO se ligando ao quarto dedo de zinco da Bcl-6, participando da repressão sobre esta. A proteína ETO da t(8; 21) na leucemia mieloide aguda (LMA) é normalmente expressa nas células hematopoiéticas humanas, interage com desacetilases de histona e com a proteína PLZF da t(11;17) na leucemia promielocítica aguda. ETO pode funcionar como uma co-repressora comum em leucemias agudas e linfomas de células B, sendo um alvo atraente no tratamento de doenças hematológicas (15). (Figura 2.3)

Figura 2.3 – Ilustração representando processos envolvidos no LDGCB-GCB. (Figura adaptada de Shaffer, 2002 (26))

Um estudo com pacientes idosos com LDGCB demonstrou que translocações do gene *MYC* aparecem conjuntamente com rearranjos cromossômicos de *BCL2* e ou *BCL6* em 60% dos casos (27).

O estudo de Bodoor et al. (28) demonstrou que Bcl-6 é importante como marcador de um diagnóstico favorável em pacientes com LDGCB. Em seu estudo 78% dos casos analisados foram positivos para Bcl-6 em pacientes que apresentaram maior sobrevida, assim como o estudo de Braaten *et alli*, que corrobora com a mesma ideia (29).

Outro estudo com 285 pacientes com LDGCB usando quimioterapia com rituximab, um anticorpo monoclonal quimérico contra CD20, demonstrou que pacientes com marcação negativa para Bcl-6 tiveram menor taxa de progressão livre da doença. A sobrevivência livre da doença foi comparada entre 4 grupos: Bcl-2 +/ Bcl-6-, Bcl-2-/ Bcl-6 +, Bcl-2-/ Bcl-6- e Bcl-

2+ / Bcl-6 +. O grupo Bcl-2- / Bcl-6+ demonstrou diferença significativa, com melhor sobrevida livre da doença que os outros grupos (30).

No LDGCB gástrico primário, foi demonstrado por Chung *et al* que as marcações para CD10 se apresentam em torno de 25% dos casos, para Bcl-2 em torno de 50%, para Bcl-6 em torno de 84% e para MUM-1 cerca de 64%. Com identificação de uma prognóstico favorável para a expressão de Bcl-6 e de um prognóstico desfavorável na presença de níveis altos de lactase desidrogenase (31). (Figura 2.4).

Nature Reviews | Cancer

Figura 2.4 – Ilustração representando a participação da proteína c-Myc nos processos de transcrição fisiológicos normais e na oncogênese. (adaptado de Dang et al., 2008(32))

A proteína c-Myc é um fator de transcrição com 143 aminoácidos da porção N-terminal, cuja porção C-terminal tem três importantes domínios: a região básica (BR), envolvida no reconhecimento específico da sequência do DNA, a “helix-loop-helix” (HLH) e a região do zíper de leucina (LZ). Os heterodímeros específicos são formados pela HLH e LZ e os ligantes de c-Myc. Pode-se dizer que toda c-Myc encontra-se complexada com a proteína MAX que é expressa constitutivamente. A proteína c-Myc pode ser ativada de forma incorreta devido a translocações cromossômicas, como

verificado no linfoma de Burkitt, por amplificação gênica, pelo aumento do número de cópias do *MYC*, por estímulo da transcrição gênica e por inserção de retrovírus adjacente ao gene *MYC*, com expressão ativada via regulação viral (33).

A coexpressão de c-Myc e Bcl-2 em pacientes com LDGCB tem um impacto negativo na sobrevida destes, estudos demonstraram que a sobrevida total nestes pacientes é menor se comparada com a expressão positiva somente para a proteína c-Myc. Pacientes com marcação positiva para c-Myc tiveram sobrevida em 5 anos de cerca de 54% dos casos e com coexpressão das duas proteínas, em 32% dos casos (9) (34)

No estudo de Gisselbrecht (35), de 161 pacientes com LDGCB analisados, 28 apresentaram expressão para c-Myc, sendo que destes, 75% apresentaram marcação conjunta com Bcl-2 e/ou Bcl-6. Os pacientes com marcação positiva para c-Myc tiveram pior prognóstico que os demais, com uma taxa de sobrevida total em 4 anos de 29% contra 62%, dos negativos para c-Myc.

Na revisão realizada por Slack e Gascoyne, 90% dos casos analisados de LB, 7-14% dos LDGCB, 35-50% dos casos de LCBNC e cerca de 50% dos casos de linfomas plasmoblásticos apresentam marcação imuno-histoquímica positiva para c-Myc (36). Também já foi demonstrado que a avaliação imuno-histoquímica da expressão de c-Myc no LCM pode ser realizada de forma confiável e é preditiva de resultados clínicos. O aumento de expressão de c-Myc foi reportado em 11 de 29 casos de LCM estudados por Hernandez *et alli*, com 50% a mais de frequência na variante blastóide (37).

A ciclina D1 é uma proteína codificada pelo gene *CCND1* e pertence à família das ciclinas, uma família de proteínas evolutivamente conservadas, cujos membros são caracterizados por sua presença durante a fase G1 do ciclo celular para posterior progressão do ciclo para fase S. Ciclinas funcionam como reguladores das quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e ciclinas diferentes apresentam expressões distintas e padrões de degradação que contribuem para a coordenação temporal de diferentes eventos mitóticos. Esta ciclina forma um complexo e funciona como uma subunidade reguladora

da CDK4 ou CDK6, cuja atividade é necessária para a transição do ciclo celular G1 / S. Foi demonstrado que essa proteína interage com a proteína supressora tumoral Rb (38) (39) (40).

Mutações, amplificações e superexpressão do *CCND1*, alteram a progressão do ciclo celular e são observadas com frequência em uma variedade de tumores, podendo contribuir para a tumorigênese (41).

A ciclina D1 não apresenta expressão em linfócitos *naïve* ou linfócitos B ativados, contrastando com as ciclinas D2 e D3. Estudos mostrando o aumento de ciclina D1 e a falta de translocação t(11; 14) sugerem que há mais de uma maneira de ocorrer o aumento da expressão de ciclina D1 em células B malignas (3).

Para detectar rearranjos cromossomais envolvendo a região do gene da ciclina D1 no cromossomo 11q13 pode-se utilizar a técnica de FISH. O linfoma de células do manto é um linfoma agressivo de células B comumente caracterizado pelo aumento da expressão de ciclina D1, resultado da translocação t(11;14)(q13;q32), detectada por esta técnica. O aumento da expressão de *CCND1* também tem sido reportado no mieloma múltiplo e estudos recentes tem indicado a participação da ciclina D1, com ou sem mutações do gene *CCND1*, no desenvolvimento do LDGCB, mesmo que somente em alguns casos (42) (43).

A marcação positiva na reação imuno-histoquímica é uma característica do LCM, enquanto as ciclinas D2 e ciclinas D3 tem sido reportadas como importantes moléculas em alguns tipos de linfomas, como no LDGCB, onde um estudo da ciclina D2 com 55 casos demonstrou que *de novo* LDGCB CD5+ apresentavam aumento de expressão em 98% dos casos e em 28% dos CD5- (44).

Enfim, os estudos citados apontam para a necessidade de se conhecer melhor a ampla gama de imunofenótipos envolvidos no LDGCB, a fim de buscar o melhor tratamento de acordo com resultados laboratoriais que podem ser obtidos através de técnicas imuno-histoquímicas e de biologia molecular.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo é verificar a expressão imuno-histoquímica para as proteínas c-Myc, Bcl-6, Bcl-2 e ciclina D1 em linfomas difusos de grandes células B e discutir os resultados obtidos frente à literatura sobre o assunto.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) aprovou a realização deste estudo em 25/04/2012 por meio do parecer de número CAAA 01136112.1.0000.0075 (Anexo).

Para este trabalho foram recuperados 30 casos diagnosticados como linfoma difuso de grandes células B (LDGCB), pertencentes ao arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da USP. Todos os casos haviam sido diagnosticados utilizando-se parâmetros histológicos e imuno-histoquímicos preconizados pela Organização Mundial de Saúde.

As lâminas referentes aos casos estudados foram revisadas, sendo que entre estas se encontravam lâminas com coloração por hematoxilina e eosina (HE) e respectivas lâminas com reações imuno-histoquímicas para diagnóstico dos casos de linfoma e confirmação do diagnóstico de LDGCB.

As reações de imunohistoquímica realizadas incluíam marcadores pan de células B geralmente CD20 e por vezes CD79a., além do marcador de células T CD45R0, afim de verificar a presença de células T, o que eliminaria a possibilidade do caso ser um LDGCB.

Nos casos confirmados por morfologia e marcador de células B (30 casos), foram então realizadas reações imuno-histoquímicas com os anticorpos anti-c-Myc, anti-Bcl-6, anti Bcl-2 e anti-ciclina D1, conforme proposto e ilustrado na tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Anticorpos primários utilizados nas reações imuno-histoquímicas na análise dos LDGCB e respectivo protocolo de uso aplicado.

Anticorpo	Marca/ Clone/ Lote	Aplicação
Anticorpo Monoclonal de Camundongo Anti CD45R0	Dako® Clone UCHL1 Lote 00071314	1:600 Tampão Citrato pH 6 30m/95°C
Anticorpo Monoclonal de Camundongo Anti Bcl-6	Cell Marque® Clone GI191E/ A8 Lote 1200501B	1:100 TRIS+EDTA pH 9 30m/95°C
Anticorpo Monoclonal de Camundongo Anti Bcl-2	Dako® Clone 124 Lote 00077687	1:50 Tampão Citrato pH 6 30m/95oC
Anticorpo Monoclonal de Camundongo Anti Ciclina D1	Dako® Clone DCS-6 Lote 00077687	1:50 Tampão Citrato pH 6 30m/95°C
Anticorpo Monoclonal de Coelho Anti c-Myc	Abcam® Clone Y69 Lote GR106703-1	1:50 Tampão Citrato pH 6 30m/95°C
Anticorpo Monoclonal de Camundongo Anti CD20	Dako® Clone L26 Lote 00048660	1:50 Tampão Citrato pH 6 30m/95°C

As lâminas para receber os cortes parafinados de 4µm para imuno-histoquímica foram silanizadas com uma solução alcoólica de silano a 10% (3-aminopropiltriethoxisilano, Sigma-Aldrich) antes de receberem os cortes.

Os cortes ficaram em estufa a 37°C durante 12 horas para aderência às lâminas.

Posteriormente foi realizada a desparafinização dos cortes em três banhos de xilol, com duração de dez minutos cada. Numa segunda etapa sequencial os cortes passaram por dois banhos em álcool etílico absoluto p.a. por cinco minutos para retirada do xilol e foram hidratados em banhos sequenciais de cinco minutos em soluções alcoólicas nas seguintes concentrações: 95°GL, 90°GL, 85°GL, 80°GL e 70°GL. Finalmente os cortes passaram em dois banhos de água destilada por cinco minutos para finalização da hidratação.

A seguir os cortes foram levados a dois banhos, no tempo de quinze minutos cada, em solução de peróxido de hidrogênio a 3%, afim de que se realizasse a inativação da enzima peroxidase endógena presente nos cortes histológicos.

Após a inativação da peroxidase endógena, os cortes foram levados ao tratamento térmico para recuperação antigênica, em banho-maria a 95°C, em soluções tampão de ácido cítrico 0,01M, pH 6.0 ou TRIS e EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 0,01M, pH 9.0, durante trinta minutos, de acordo com a tabela 4.1.

Após a recuperação antigênica as lâminas passaram por um banho em solução tampão TRIS pH 7.6 e foram incubadas por trinta minutos sob temperatura ambiente para bloqueio de cargas inespecíficas em solução de albumina de soro bovino a 1% diluída em tampão fosfato 0,1M pH 7,6.

A solução de albumina foi retirada das lâminas e imediatamente os anticorpos diluídos nesta mesma solução de albumina de soro bovino a 1% foram aplicados de acordo com as diluições indicadas na tabela 4.1.

Os cortes para análise de Bcl-2, Ciclina D1, CD45R0 e CD20 foram incubados com o anticorpo primário durante uma hora a temperatura ambiente, já os cortes para análise de Bcl-6 e c-Myc foram incubados a 4°C por 12 horas de acordo com a tabela 4.1.

Após a incubação nos anticorpos primários, as lâminas foram lavadas em três banhos de cinco minutos cada em solução-tampão TRIS 0,1M pH7.6 e incubadas com anticorpo secundário anti-coelho e anti-camundongo com sistema de amplificação da marcação por peroxidase, pronto para uso, durante trinta minutos (Envision®, código K4006, Dako, EUA).

Após a incubação no anticorpo secundário, as lâminas foram lavadas em três banhos de cinco minutos cada em solução-tampão TRIS 0,1M pH7.6 e foi aplicada uma solução de diaminobenzidina (DAB), para revelação da marcação. Os cortes ficaram sob a solução de DAB por dez minutos e posteriormente foram lavados em três banhos sequenciais de água destilada.

As lâminas passaram por coloração com hematoxilina de Harris, por cinco minutos e em um banho sequencial de água corrente para diferenciação

da coloração.

Sequencialmente foram desidratadas em banhos sequenciais de cinco minutos cada num gradiente crescente de concentração alcoólica (70°GL, 80°GL, 90°GL, 95°GL, 100°GL por três vezes) e diafanizados em dois banhos de de cinco minutos em xilol.

As lâminas foram montadas em equipamento automático e receberam adesivo para proteção dos cortes. (Tissue-Tek® Coverslipper, Sakura®, Japão).

A análise dos resultados foi efetuada de forma descritiva, sendo consideradas marcações definidas no núcleo ou citoplasma em áreas representativas de linfomas. Logo, os cortes foram examinados e capturados em microscópio de luz (Axio Imager.A1, Carl Zeiss GmBH, Alemanha).

5 RESULTADOS

Na análise imuno-histoquímica com os anticorpos anti-c-Myc, anti-ciclina D1, anti-Bcl-2 e anti-Bcl-6 foram considerados como resultados positivos os cortes que apresentaram ao menos uma célula marcada em área com morfologia devidamente preservada do corte analisado e com boa intensidade de marcação pela diaminobenzina (DAB).

A tabela 5.1 mostra os resultados obtidos:

Tabela 5.1 – Resultados das reações imuno-histoquímicas para c-Myc, Ciclina D1, Bcl-6 e Bcl-2; positividade e negatividade.

Casos	c-Myc	Ciclina D1	Bcl-6	Bcl-2
1	-	-	-	+
2	-	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+
5	-	-	+	+
6	+	-	-	+
7	-	-	-	+
8	-	-	+	+
9	-	-	-	+
10	+	+	+	+
11	+	+	+	+
12	-	-	-	+
13	-	-	+	+
14	-	-	+	+
15	+	+	+	+
16	-	-	+	+

Casos	c-Myc	Ciclina D1	Bcl-6	Bcl-2
17	+	-	-	+
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-
21	+	-	+	+
22	+	-	+	+
23	+	-	-	+
24	-	-	+	+
25	-	-	+	+
26	-	-	-	+
27	+	-	-	+
28	+	-	+	+
29	-	-	-	-
30	-	-	-	-
Total	12	3	16	25

5.1 Análise dos resultados das reações imuno-histoquímicas

5.1.1 Análise dos resultados para marcação da proteína Bcl-2

A análise das lâminas demonstrou que marcação estava presente em 83,3% (25/30) dos casos analisados. Pode-se verificar na Figura 5.1 o padrão nuclear da marcação, porém, há células com o citoplasma também marcado. Os casos que se apresentaram positivos tiveram marcação em toda área representativa da doença.

5.1.2 Análise dos resultados para a marcação da proteína Bcl-6

A análise dos casos demonstrou positividade em 53,3% (16/30) dos casos analisados. Essa marcação foi predominantemente nuclear, mas por vezes também citoplasmática. Todos os casos identificados como positivos tiveram muitas células marcadas, evidenciando a origem no centro germinativo.

A Figura 5.2 mostra a marcação em um dos casos analisados.

5.1.3 Análise dos resultados para a marcação da proteína Ciclina D1

A análise dos casos demonstrou positividade em apenas 3 dos 30 casos estudados (10%), estando presente em raras células. A Figura 5.3 mostra a marcação em núcleo e citoplasma de um dos casos analisados.

5.1.4 Análise dos resultados para marcação da proteína c-Myc

A análise dos casos demonstrou positividade em 40% (12/30) deles e a marcação se demonstrava em toda área representativa da neoplasia, com marcação nuclear predominante e algumas células com citoplasma também marcado (figura 5.4).

Figura 5.1 – Resultados das reações imuno-histoquímicas para Bcl-2. Observa-se positividade difusa da proteína Bcl-2, onde se pode verificar o padrão nuclear da marcação em casos de LDGCB.

Figura 5.2 – Imagem do resultado da reação imuno-histoquímicas para Bcl-6.

Figura 5.3 – Imagem do resultado da reação imuno-histoquímicas para Ciclina D1.

Figura 5.4 – Resultados das reações imuno-histoquímicas para c-Myc em diferentes casos de LDGCB, demonstrando marcação nuclear.

6 DISCUSSÃO

Na literatura existem vários artigos demonstrando a importância do uso da imuno-histoquímica no diagnóstico dos linfomas difusos de grandes células B, seu uso para a determinação dos subtipos moleculares e auxílio na definição de prognósticos. Vários estudos analisaram a importância das análises das proteínas c-Myc, Bcl-6, Bcl-2 e ciclina D1 para o diagnóstico dos linfomas de células B e uso na definição de terapias (27) (45) (46) (47)

No presente estudo realizamos uma análise imuno-histoquímica de 30 casos de linfoma orais diagnosticados previamente como LDGCB. O intuito do estudo era demonstrar a possibilidade de evidenciar subtipos dentre esses linfomas de acordo com o perfil imuno-histoquímico e apontar para os casos onde há necessidade de outras metodologias como FISH ou expressão gênica em qPCR.

Tem sido demonstrada a superexpressão de ciclina D1, em poucos subtipos de doenças linfoproliferativas, dentre elas em aproximadamente 90% dos linfomas de células do manto. Esta importante proteína é pouco expressa em células B normais, mas devido à translocação t(11;14)(q13;32) é então encontrada altamente expressa em linfomas de células do manto (LCM), o que leva ao crescimento das células tumorais, devido ao descontrole da fase G1 do ciclo celular (fase de alta síntese de proteínas) e faz com que a detecção desta mutação seja importante para definir o diagnóstico. Os LDGCB geralmente são ciclina D1 negativos, entretanto devido à grande heterogeneidade no grupo destes linfomas, raros casos podem apresentar positividade à ciclina D (39) (48).

No estudo da expressão proteica desta ciclina D1 em linfomas de células B realizado por Gladkikh et al. (49), foi demonstrado que o LDGCB também pode ter em seu curso de desenvolvimento a participação da Ciclina D1 como protagonista e não somente o LCM. Neste estudo, os autores definiram valores médios normalizados determinados por qPCR da seguinte forma: foram 1,32 para LCM, 0,02 para leucemia linfocítica crônica (LLC), 0,009

para LDGCB, 0,004 para linfoma da zona marginal, 0,002 para linfoma folicular (LF) comparados a 0,0003 para o tecido linfóide reativo e 0,00004 nos linfócitos B de doadores sadios. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o LDGCB também pode ter em seu curso de desenvolvimento a participação da Ciclina D1 como protagonista e não só o LCM. Já Rodriguez-Justo et al. (50), em 2008 reportaram um caso de LDGCB positivo para ciclina D1 na análise imuno-histoquímica, usando dois anticorpos diferentes (Anticorpo monoclonal de coelho anti-ciclina D1, SP4, Labvision Products, Runcorn, UK e anticorpo monoclonal de camundongo anti-ciclina D1 P2D11F11, Leica Biosystems, Newcastle, UK) afim de confirmar e comparar os resultados e demonstraram que ambos tiveram marcação nuclear positiva, indicando assim que a imuno-histoquímica para ciclina D1 é importante para distinção entre o LCM e o LDGCB, mas não pode ser o único recurso utilizado. A análise efetuada neste caso por FISH confirmou a ausência da t(11;14). Estes resultados positivos para ciclina D1 também foram evidenciados nas marcações obtidas nos casos analisados neste trabalho com linfomas orais. Nos casos por nós avaliados, a análise complementar por FISH para detecção da translocação t(11;14) e por qPCR para análise da expressão gênica. poderá confirmar a participação de alterações genéticas no gene da ciclina D1, corroborando os resultados imuno-histoquímicos.

Em um estudo elaborado com 231 casos de LDGCB, reunindo casos de 3 hospitais universitários suecos os autores verificaram a existência de marcação nuclear positiva para ciclina D1 em 10 destes casos, sendo 9 do subtipo centrolástico e 1 do anaplástico, sendo que destes casos 3 apresentavam marcação difusa e 7 marcação focal. Nove casos positivos para ciclina D1 tiveram marcação fraca e somente um apresentou marcação forte. Os autores concluíram que parece existir um grupo de LDGCB que são CD5 negativos e ciclina D1+ (51)

Em 2011, um estudo de Lucioni *et al.* (52) apresentou mais um caso de LDGCB negativo para CD5 e positivo para ciclina D1, com resultado da análise por FISH negativo para a translocação t(11;14)(q13;q32). Nesse estudo observou-se a deleção da região que contém o gene AKTIP e a monossomia

do cromossomo 3, que contém o gene GSK3 β ; a via AKT/GSK3 β tem um papel importante no controle dos níveis de ciclina D1 no núcleo. A GSK3 β fosforila a ciclina D1 no núcleo e a β -catenina no citoplasma, promovendo o transporte do núcleo para o citoplasma e a degradação proteossomal. Assim, argumentam que a perda de GSK3 β junto de alterações como a redução dos níveis de AKTIP podem resultar na acumulação nuclear de ciclina D1 e que a diminuição da degradação da β -catenina pode também iniciar esse efeito por levar à tradução de *CCND1*.

Todos esses estudos acima apresentam resultados condizentes com os resultados obtidos nas análises imuno-histoquímicas para ciclina D1 nos 30 casos analisados, demonstrando que embora a marcação positiva seja um fator importante no diagnóstico do LCM, esta não pode ser desconsiderada em casos de suspeita de LDGCB. Além da importância da análise imuno-histoquímica com anti-ciclina D1 em casos de linfoma para definição do tipo, subtipo e definição de terapias pode-se acrescentar devido à positividade apresentada a importância de analisar também a presença de translocações ligadas à doença, com a t(11;14)(q13;q32), obtendo-se assim um conjunto maior de informações importantes sobre as alterações linfocitárias, que podem auxiliar no tratamento da doença e no estudo do seu desenvolvimento.

De todos os 30 casos analisados 12 apresentaram resultado positivo na reação imuno-histoquímica para c-Myc. A marcação positiva em linfomas para c-Myc e a translocação do gene MYC são reconhecidas como características principais para diagnóstico do linfoma de Burkitt. Porém trabalhos recentes demonstram que MYC também é importante no LDGCB, com dados demonstrando que cerca de 10% dos casos de LDGCB apresentam a translocação do MYC e há trabalhos que indicam que cerca de 30% dos casos LDGCB apresentam expressão elevada da proteína (53). A co-expressão de Bcl-2 e c-Myc evidencia um pior prognóstico para os pacientes, principalmente aqueles que apresentam LDGCB do tipo ABC (9).

Em um trabalho com 167 pacientes, as reações imuno-histoquímicas para c-Myc e Bcl-2 foram positivas em 29% e 44% dos pacientes, respectivamente. A expressão conjunta (c-Myc+/BCL2+) ocorreu em 21% dos

pacientes. Porém somente 11% dos pacientes apresentaram resultado positivo para translocação do gene *MYC*. A marcação encontrada na imuno-histoquímica foi exclusivamente nuclear (53)

Outro trabalho verificou 77 casos de LDGCB e identificou 15 casos com marcação positiva para c-Myc, os dados dos pacientes demonstraram uma sobrevida inferior dos pacientes que apresentavam alta expressão de c-Myc após terapia com R-CHOP (Rituximabe, Ciclofosfamida, Hidroxidoxorubicina, Vincristina e Prednisona) (54).

Os dados obtidos em nosso estudo, que indicam 40% dos casos positivos para c-Myc são relevantes, pois indicam como no trabalho de Johnson (52), que cerca de 30-40% dos casos analisados apresentam marcação positiva para c-Myc e que esta marcação juntamente com os resultados positivos da expressão protéica de Bcl-2 são indicativos de um prognóstico reduzidos, como indicam vários estudos.

O fato do gene *MYC* regular cerca de 10% dos genes e de geralmente ser ligado ao diagnóstico do linfoma de Burkitt, de recentes trabalhos indicarem o aumento da expressão da proteína c-Myc em LDGCB, mesmo na ausência de translocação, o que indica outros meios de regulação da expressão; demonstra que é importante no diagnóstico de linfomas de células B a execução da imuno-histoquímica para c-Myc, pois esta não pode ser considerada apenas na definição do diagnóstico do linfoma de Burkitt, como citado em diversos trabalhos (20) (54) (55).

As marcações obtidas em nosso trabalho para a proteína c-Myc no estudo dos LDGCB orais e publicações recentes sobre este assunto demonstram a importância crescente desta análise nos casos suspeitos de LDGCB, principalmente para detecção dos casos identificados como “double-hit” ou “triple-hit”, que apresentam mutação no *MYC*, no *BCL2* ou no *BCL6*. Estes casos são de tratamento mais difícil e a detecção da alta expressão protéica através da imuno-histoquímica para estes 3 antígenos pode ser um meio mais rápido e menos caro para indicar um tratamento mais adequado e obter um diagnóstico mais específico.

Nosso trabalho também analisou a presença de marcação positiva para Bcl-2, proteína conhecidamente detectada por imuno-histoquímica em linfomas não-Hodgkin, marcação presente principalmente no linfoma folicular e que já em 1996 foi detectada em 45% dos casos (131/290) analisados no trabalho publicado por pesquisadores franceses do Grupo de Estudos dos Linfomas dos Adultos (56). Neste trabalho reportou-se que 23% (65/290) foram considerados negativos e 32% (94/290) exibiam marcação intermediária com células positivas e negativas marcadas na mesma área.

Cerca de 25,5% dos casos de LDGCB apresentam a translocação t(14;18)(q32;q21), comumente associada ao linfoma folicular; o LDGCB do subtipo GCB é o que mais se apresenta positivo na reação para BCL2 (5).

Em nosso trabalho 25 casos se apresentaram como positivos para Bcl-2, ou seja, 83,3%. Vale ressaltar que todos os 12 casos positivos para c-Myc também foram positivos para Bcl-2, podendo se tratar de casos “double-hit” ou até “triple-hit”, já que 8 casos foram positivos na imuno-histoquímica para Bcl-2, Bcl-6 e c-Myc. Estes resultados serão posteriormente analisados por FISH, com a finalidade de detectar as translocações, deleções ou amplificações dos referidos genes, buscando uma melhor compreensão dos casos.

A imuno-histoquímica para Bcl-2 é muito importante da definição do tratamento e prognóstico dos pacientes com LDGCB, já que muitos trabalhos demonstram que R-CHOP é mais eficaz que CHOP, nos casos positivos para Bcl-2. A participação do Bcl-2 no controle da apoptose pode explicar a resistência à quimioterapia nos pacientes tratados com CHOP, porém alguns trabalhos demonstram que esta positividade é importante somente em casos de LDGCB não-GCB (57) (58).

Também foi demonstrado que a alta expressão de BCL2 está associada a um prognóstico desfavorável somente na ausência de t(14:18), o que indica que o mecanismo de expressão e não a proteína em si pode ser mais relevante para o prognóstico (59).

Outro trabalho com 292 pacientes, onde foi realizada a imuno-histoquímica para Bcl-2 obteve 66% (193/292) de marcações positivas, com marcação em mais de 50% das células. Neste trabalho CHOP e CHOP-R

foram comparadas em pacientes com idade entre 60-80 anos e pacientes positivos para Bcl-2 tiveram maiores taxas de resposta e melhor sobrevida quando tratados com R-CHOP, ao invés de CHOP (60).

Quanto à análise realizada para marcação de Bcl-6, obtivemos em nosso estudo 53,3% de casos positivos. O uso deste anticorpo na definição de diagnóstico para LDGCB é importante, pois com ele funciona como um marcador de LDGCB-GCB e já MUM-1 como um marcador do LDGCB-ABC, conforme o algoritmo proposto por Hans. Tipicamente a marcação é restrita ao núcleo dos linfócitos, conforme também observamos em nosso trabalho. De acordo com vários estudos, este modelo de três marcadores, onde Bcl-6 e CD10 são os marcadores de centros germinativos e MUM1 define o fenótipo ABC parece ter um forte significado no prognóstico de pacientes com DLBCL.

No artigo publicado por Muris *et al.* “Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10, and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B-cell lymphoma” (61), é proposto o uso de Bcl-2 como importante definidor de prognóstico para os casos de LDGCB e este propõe um novo algoritmo.

Vários estudos indicam que marcação positiva para Bcl-6 define um bom prognóstico e uma maior sobrevida pós tratamento, principalmente na ausência de marcação positiva para Bcl-2 (62) (63).

Rearranjos de BCL6 foram detectados em aproximadamente 40% dos casos de LDGCB segundo revisão de Basso e Dalla-Favera (16).

Foi demonstrado que outros mecanismos além de rearranjos cromossômicos dos genes podem modificar a expressão de Bcl-2 e Bcl-6 em linfomas, conforme a análise de 55 casos de LDGCB, na qual 71% demonstraram reação imuno-histoquímica positiva para Bcl-6, 38% dos casos com anormalidades no cromossomo 3q27 foram negativos na imuno-histoquímica para Bcl-6, enquanto 85% dos casos sem alteração no 3q27 foram positivos na reação imuno-histoquímica (64).

Os resultados obtidos em nosso estudo com 30 casos de linfomas orais testados para Bcl-2, Bcl-6, c-Myc e ciclina D1 demonstram que afim de refinar o diagnóstico dos linfomas de células B, fornecer uma classificação que melhor

direcione o tratamento do paciente e obter um melhor prognóstico seria ideal a aplicação de um painel de anticorpos que adicionasse a estes MUM-1 e CD198.

Ademais, o conhecimento das mutações cromossômicas presentes nos casos, através de análises por FISH, pode fornecer a confirmação de casos com pior prognóstico, como os linfomas “doble-hit” e “triple-hit” e auxiliar no aumento do conhecimento sobre os linfomas que atingem a região oral.

7 CONCLUSÃO

Com o painel de anticorpos utilizado pode-se observar que os casos diagnosticados *a priori* como LDGCB poderiam ser sub-classificados visto que em 26,6% (8/30) dos casos observou-se marcação para Bcl-6, Bcl-2 e c-Myc; podendo se tratar de linfomas difusos de grandes células B “triple-hit”, 13,3% dos casos podem se tratar de linfomas difusos de grandes células B “double-hit”, pois observou-se marcação para c-Myc e Bcl-2. Pôde-se verificar ainda que todos os casos positivos para Bcl-6 também foram positivos para Bcl-2.

É importante o uso conjunto dos anticorpos anti-Bcl-6, anti-c-Myc, anti-Bcl-2 e anti-ciclina D1 e anti-MUM-1 numa rotina de diagnósticos de linfomas, já que são marcadores relevantes que devem ser utilizados e os quais a literatura científica tem constantemente reportado como bons auxiliares na definição de prognósticos.

REFERÊNCIAS¹

1. Guermazi A, Brice P, de Kerviler E E, Fermé C, Hennequin C, Meignin V FJ. Extranodal Hodgkin Disease: Spectrum of Disease. *Radiographics*. 2001;1:161–79.
 2. Vega F, Lin P, Medeiros LJ. Extranodal lymphomas of the head and neck. [Internet]. *Ann. Diagn. Pathol.* 2005. p. 340–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23688595>.
 3. Hunt KE, Reichard KK, Wilson CS. Mantle cell lymphoma lacking the t(11;14) translocation: a case report and brief review of the literature. *J. Clin. Pathol.* [Internet]. 2008 Jul [cited 2013 Dec 16];61(7):869–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18587018>.
 4. Schreuder MI, Hoefnagel JJ, Jansen PM, Van Krieken JHJM, Willemze R, Hebeda KM. FISH analysis of MALT lymphoma-specific translocations and aneuploidy in primary cutaneous marginal zone lymphoma. *J. Pathol.* 2005;205(3):302–10.
 5. Zhang F, Yan L-X, Lin S-X, Ye Z-Y, Zhuang H-G, Yun J-P, et al. Immunophenotypic features and t(14;18) (q32;q21) translocation of Chinese follicular lymphomas helps to distinguish subgroups. *Diagn. Pathol.* [Internet]. 2013 Sep 18 [cited 2013 Oct 12];8(1):154. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24047469>.
 6. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* [Internet]. 2004 Jan 1 [cited 2013 Dec 16];103(1):275–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14504078>.
 7. Hunt KE, Reichard KK. Diffuse large B-cell lymphoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* [Internet]. 2008 Jan;132(1):118–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18815567>.
-

8. Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* [Internet]. 2013 Apr [cited 2013 Dec 16];5(4):a008714. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23545417>.

9. Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Green T, Wu L, Balasubramanyam A, et al. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood* [Internet]. 2013 May 16 [cited 2013 Dec 16];121(20):4021–31; quiz 4250. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23449635>.

10. Pezzella F, Tse A, Cordell J. Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14; 18 chromosomal translocation. *Am. J. ...* [Internet]. 1990 [cited 2013 Dec 16];13(2):225–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1877598/>.

11. Marin M, Hsu B, Stephens L. The functional basis of c-myc and bcl-2 complementation during multistep lymphomagenesis in vivo. *Exp. cell ...* [Internet]. 1995 [cited 2013 Dec 17]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001448278571083X>.

12. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* [Internet]. 1993 Oct 22;75(2):241–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7503812>.

13. Dlugosz PJ, Billen LP, Annis MG, Zhu W, Zhang Z, Lin J, et al. Bcl-2 changes conformation to inhibit Bax oligomerization. *EMBO J.* [Internet]. 2006 Jun 7 [cited 2013 Dec 16];25(11):2287–96. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1478188&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

14. Lossos IS, Czerwinski DK, Alizadeh A a, Wechser M a, Tibshirani R, Botstein D, et al. Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N. Engl. J. Med.* [Internet]. 2004 Apr 29;350(18):1828–37. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3152499&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

15. Chevallier N, Corcoran CM, Lennon C, Hyjek E, Chadburn A, Bardwell VJ, et al. ETO protein of t(8;21) AML is a corepressor for Bcl-6 B-cell lymphoma oncoprotein. *Blood* [Internet]. 2004 Feb 15 [cited 2013 Oct 12];103(4):1454–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14551142>.
16. Basso K, Dalla-Favera R. Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells. *Immunol. Rev.* [Internet]. 2012 May;247(1):172–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22500840>.
17. Gaidano BG, Coco F Lo, Ye BH, Shibata D, Levine AM, Knowles DM, et al. Rearrangements of the BCL-6 gene in acquired immunodeficiency syndrome- associated non-Hodgkin's lymphoma: association with diffuse large-cell subtype. 2013;397–402.
18. Bihui H, Cattorettil G, Shenl Q. The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type. *Nat. ...* [Internet]. 1997 [cited 2013 Dec 17]; Available from: http://develop.onlinetoday.com/webs/bobm/bms/downloads/nouri_shirazi/2.pdf.
19. Aquino G, Marra L, Cantile M, De Chiara A, Liguori G, Curcio MP, et al. MYC chromosomal aberration in differential diagnosis between Burkitt and other aggressive lymphomas. *Infect. Agent. Cancer* [Internet]. *Infectious Agents and Cancer*; 2013 Sep 30 [cited 2013 Oct 7];8(1):37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24079473>.
20. Lin P, Medeiros LJ. The Impact of MYC Rearrangements and “Double Hit” Abnormalities in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* [Internet]. 2013 Sep [cited 2013 Oct 12];8(3):243–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23892979>.
21. Cotter TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat. Rev. Cancer* [Internet]. Nature Publishing Group; 2009 Jul;9(7):501–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19550425>.
22. Rebelo-Pontes H, de Abreu M, Guimaraes D, Fonseca F, de Andrade B, de Almeida O, et al. Burkitt lymphoma of the jaws in the Amazon region of Brazil. *Med. Oral Patol. Oral y Cir. Bucal* [Internet]. 2013 [cited 2013 Oct

- 12];6–11. Available from:
<http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/aop/18936.pdf>.
23. Baron BW, Nuciforat G, McCabe N, Ilt RE, Beaut MMLE, Mckeithan TW. Identification of the gene associated with the recurring. 1993;90(June):5262–6.
 24. Crotty S, Johnston RJ, Schoenberger SP. differentiation. 2010;11(2):114–20.
 25. Ying CY, Dominguez-Sola D, Fabi M, Lorenz IC, Hussein S, Bansal M, et al. MEF2B mutations lead to deregulated expression of the oncogene BCL6 in diffuse large B cell lymphoma. *Nat. Immunol.* [Internet]. 2013 Oct [cited 2013 Dec 16];14(10):1084–92. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23974956>.
 26. Shaffer a L, Rosenwald A, Staudt LM. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* [Internet]. 2002 Dec [cited 2013 Dec 11];2(12):920–32. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12461565>.
 27. Horn H, Ziepert M, Becher C, Barth TFE, Bernd H-W, Feller AC, et al. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* [Internet]. 2013 Mar 21 [cited 2013 Dec 16];121(12):2253–63. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23335369>.
 28. Bodoor K, Matalaka I, Hayajneh R, Haddad Y, Gharaibeh W. Evaluation of BCL-6, CD10, CD138 and MUM-1 expression in diffuse large B-cell lymphoma patients: CD138 is a marker of poor prognosis. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* [Internet]. 2012 Jan;13(7):3037–46. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22994707>.
 29. Braaten KM, Betensky R a, de Leval L, Okada Y, Hochberg FH, Louis DN, et al. BCL-6 expression predicts improved survival in patients with primary central nervous system lymphoma. *Clin. Cancer Res.* [Internet]. 2003 Mar;9(3):1063–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12631608>.

30. Maeshima AM, Taniguchi H, Fukuhara S, Morikawa N, Munakata W, Maruyama D, et al. Bcl-2, Bcl-6, and the International Prognostic Index are prognostic indicators in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab-containing chemotherapy. *Cancer Sci.* [Internet]. 2012 Oct [cited 2013 Oct 12];103(10):1898–904. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22783941>.
31. Chung K-M, Chang S-T, Huang W-T, Lu C-L, Wu H-C, Hwang W-S, et al. Bcl-6 expression and lactate dehydrogenase level predict prognosis of primary gastric diffuse large B-cell lymphoma. *J. Formos. Med. Assoc.* [Internet]. Elsevier; 2013 Jul [cited 2013 Oct 12];112(7):382–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23927977>.
32. Dang C V, Kim J, Gao P, Yustein J. The interplay between MYC and HIF in cancer. 2008;8(january):51–6.
33. Gir H, Helena S, Rabenhorst B. Impacto do oncogene C-MYC no câncer. 52(2):165–71.
34. Madhu P. Menon, MBBS PhD, Stefania Pittaluga, MD PhD, and Elaine S. Jaffe M. The Histological and Biological Spectrum of Diffuse Large B-cell Lymphoma in the WHO Classification. 2013;18(5):411–20.
35. Gisselbrecht C. Is there any role for transplantation in the rituximab era for diffuse large B-cell lymphoma? *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* [Internet]. 2012 Jan;2012:410–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23233612>.
36. Slack GW, Gascoyne RD. REVIEW ARTICLE MYC and Aggressive B-cell Lymphomas. 2011;18(3):219–28. .
37. Hernández L, Hernández S, Beà S, Pinyol M, Ferrer A, Bosch F, Nadal A, Fernández PL, Palacín A, Montserrat E CE. c-myc mRNA expression and genomic alterations in mantle cell lymphomas and other nodal non-Hodgkin ' s lymphomas. *Leukemia*. 1999;(May):2087–93.
38. Delas A, Sophie D, Brousset P, Laurent C. Unusual concomitant rearrangements of Cyclin D1 and MYC genes in blastoid variant of mantle cell lymphoma: Case report and review of literature. *Pathol. Res. Pract.*

- [Internet]. Elsevier GmbH.; 2013 Feb 15 [cited 2013 Oct 12];209(2):115–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23313364>.
39. Adam P, Kremer M, Bink K, Vela-cha T, Bacon CM, Menon G, et al. Cyclin D1 positive diffuse large B-cell lymphoma is a post-germinal center-type lymphoma without alterations in the CCND1 gene locus. 2011;52(March):458–66.
 40. Siegert JL, Rushton JJ, Sellers WR, Kaelin WG, Robbins PD. Cyclin D1 suppresses retinoblastoma protein-mediated inhibition of TAFII250 kinase activity. *Oncogene* [Internet]. 2000 Nov 23;19(50):5703–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11126356>.
 41. Musgrove E a, Caldon CE, Barraclough J, Stone A, Sutherland RL. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat. Rev. Cancer* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011 Aug [cited 2013 Dec 13];11(8):558–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21734724>.
 42. Athanasiou E, Kaloutsi V, Kotoula V, Hytioglou P, Kostopoulos I, Zervas C, et al. Cyclin D1 overexpression in multiple myeloma. A morphologic, immunohistochemical, and in situ hybridization study of 71 paraffin-embedded bone marrow biopsy specimens. *Am. J. Clin. Pathol.* [Internet]. 2001 Oct;116(4):535–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11601138>.
 43. Vela-Chávez T, Adam P, Kremer M, Bink K, Bacon CM, Menon G, et al. Cyclin D1 positive diffuse large B-cell lymphoma is a post-germinal center-type lymphoma without alterations in the CCND1 gene locus. *Leuk. Lymphoma* [Internet]. 2011 Mar [cited 2013 Dec 16];52(3):458–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21281227>.
 44. Igawa T, Sato Y, Takata K, Iwaki N, Tanaka T, Asano N, et al. De novo CD5-positive diffuse large B-cell lymphomas show high specificity for cyclin D2 expression. *Diagn. Pathol.* [Internet]. Diagnostic Pathology; 2013;8(1):1. Available from: Diagnostic Pathology.
 45. Guilherme S, Caputto LZ, Luiz A, Fonseca A, Pereira J, Luiz F. Exames laboratoriais complementares indicados no apoio ao diagnóstico do linfoma difuso de grandes células B (LDGCB). (11):185–94.

46. Lowry L, Smith P, Cunningham D, Linch DC. Factors affecting survival in patients aged 60 and over with diffuse large B cell lymphoma failing first-line therapy. *J. Geriatr. Oncol.* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013 Apr [cited 2013 Oct 12];4(2):134–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24071538>.
47. Friedrich RE, Abadi M. Distant metastases and malignant cellular neoplasms encountered in the oral and maxillofacial region: analysis of 92 patients treated at a single institution. *Anticancer Res.* 2010;30(5):1843–8.
48. Sánchez-Beato M, Camacho FI, Martínez-Montero JC, Sáez a I, Villuendas R, Sánchez-Verde L, et al. Anomalous high p27/KIP1 expression in a subset of aggressive B-cell lymphomas is associated with cyclin D3 overexpression. p27/KIP1-cyclin D3 colocalization in tumor cells. *Blood* [Internet]. 1999 Jul 15;94(2):765–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10397744>.
49. Gladkikh A, Potashnikova D, Korneva E, Khudoleeva O, Vorobjev I. Cyclin D1 expression in B-cell lymphomas. *Exp. Hematol.* [Internet]. ISEH - Society for Hematology and Stem Cells; 2010 Nov [cited 2013 Dec 16];38(11):1047–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20727381>.
50. Rodriguez-Justo M, Huang Y, Ye H, Liu H, Chuang S-S, Munson P, et al. Cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphoma. *Histopathology* [Internet]. 2008 Jun [cited 2013 Dec 16];52(7):900–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18494615>.
51. Ehinger M, Linderöth J, Christensson B, Sander B, Cavallin-Ståhl E. A subset of CD5- diffuse large B-cell lymphomas expresses nuclear cyclin D1 with aberrations at the CCND1 locus. *Am. J. Clin. Pathol.* [Internet]. 2008 Apr [cited 2013 Dec 16];129(4):630–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18343791>.
52. Lucioni M, Novara F, Riboni R, Fiandrino G, Nicola M, Kindl S, et al. CD5 – diffuse large B-cell lymphoma with peculiar cyclin D1 + phenotype . Pathologic and molecular characterization of a single case. *Hum. Pathol.* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;42(8):1204–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2010.11.015>

53. Johnson N a, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J. Clin. Oncol.* [Internet]. 2012 Oct 1 [cited 2013 Oct 12];30(28):3452–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3454768&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
54. Kluk MJ, Chapuy B, Sinha P, Roy A, Dal Cin P, Neuberg DS, et al. Immunohistochemical detection of MYC-driven diffuse large B-cell lymphomas. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jan [cited 2013 Dec 16];7(4):e33813. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3325231&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
55. Jaffe ES, Pittaluga S. Aggressive B-cell lymphomas: a review of new and old entities in the WHO classification. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* [Internet]. 2011 Jan;2011:506–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22160082>.
56. Diebold J, Reyas F, Gaulard P, Dc W, Hermine BO, Haioun C, et al. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA)*. 2013;265–72.
57. Fu K, Weisenburger DD, Choi WWL, Perry KD, Smith LM, Shi X, et al. Addition of rituximab to standard chemotherapy improves the survival of both the germinal center B-cell-like and non-germinal center B-cell-like subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* [Internet]. 2008 Oct 1 [cited 2013 Dec 16];26(28):4587–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18662967>.
58. Wilson KS, Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C a, Gill KK, et al. CHOP-R therapy overcomes the adverse prognostic influence of BCL-2 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma* [Internet]. 2007 Jun [cited 2013 Dec 16];48(6):1102–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17577773>.
59. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, Krajewska M, Horsman DE, Tolcher AW, et al. Prognostic Significance of Bcl-2 Protein Expression

and Bcl-2 Gene Rearrangement in Diffuse Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. 2013;244–51.

60. Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, Emile J-F, Lederlin P, Sebban C, et al. Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2--associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Blood* [Internet]. 2003 Jun 1 [cited 2013 Dec 16];101(11):4279–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12576316>.
61. Muris JJF, Meijer CJLM, Vos W, van Krieken JHJM, Jiwa NM, Ossenkoppele GJ, et al. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J. Pathol.* [Internet]. 2006 Apr [cited 2013 Dec 16];208(5):714–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16400625>.
62. Tzankov A, Zlobec I, Went P, Robl H, Hoeller S, Dirnhofer S. Prognostic immunophenotypic biomarker studies in diffuse large B cell lymphoma with special emphasis on rational determination of cut-off scores. *Leuk. Lymphoma* [Internet]. 2010 Feb [cited 2013 Oct 12];51(2):199–212. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19925052>.
63. Maeshima AM, Omatsu M, Nomoto J, Maruyama D, Kim S-W, Watanabe T, et al. Diffuse large B-cell lymphoma after transformation from low-grade follicular lymphoma: morphological, immunohistochemical, and FISH analyses. *Cancer Sci.* [Internet]. 2008 Sep [cited 2013 Dec 16];99(9):1760–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18549405>.
64. Skinnider BF, Horsman DE, Dupuis B, Gascoyne RD. Bcl-6 and Bcl-2 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma: correlation with 3q27 and 18q21 chromosomal abnormalities. *Hum. Pathol.* [Internet]. 1999 Jul;30(7):803–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10414499>.

ANEXO – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

PROJETO DE PESQUISA

Título: Avaliação imuno-histoquímica e molecular da expressão de ciclina D1, bcl-6 e c-myc em linfomas da região da cabeça e pescoço

Pesquisador: Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa

Versão: 1

Instituição:

Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

CAAE: 01136112.1.0000.0075

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 15604

Data da Relatoria: 25/04/2012

Apresentação do Projeto:

O presente trabalho pretende através de biópsias processadas em parafina, diagnosticadas como linfomas da região da cabeça e pescoço, obter dados citogenéticos por hibridização *in situ* fluorescente (FISH) dos genes da ciclina D1, bcl-6 e c-myc, analisar a expressão desses genes no mesmo material por qPCR, além de verificar a presença do vírus Epstein-Barr (EBV) também por hibridização *in situ* e por PCR. Também será realizada a classificação dos linfomas analisados segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), para isso serão também utilizadas técnicas histoquímicas e imunohistoquímicas. Através da classificação e comparação dos dados obtidos com as análises com a literatura existente, será possível a visualização do perfil dos casos presentes no acervo da Faculdade de Odontologia da USP e possivelmente se estabelecer protocolos para utilização das técnicas de hibridização *in situ* e qPCR no serviço de diagnóstico da mesma instituição, não só com estes genes e com linfomas, mas também em outras neoplasias e na pesquisa com outros genes, melhorando o direcionamento do tratamento de futuros pacientes e obtendo dados para uma melhor caracterização da enfermidade.

Objetivo da Pesquisa:

Separar os casos de acordo com o tipo histológico, seguindo a classificação da OMS para tumores de tecidos hematopoieticos e linfoides e compará-los quanto às diferenças na expressão gênica para c-myc, bcl-6 e cond-1. Avaliar a expressão dos genes c-myc, bcl-6 e cond-1 em cinquenta casos de linfomas da região da cabeça e pescoço através de CISH e qPCR. Verificar a presença do EBV nos casos analisados, por FISH e PCR.

Objetivo Secundário:

Comparar os dados de expressão gênica, análise citogenética e amplificação do EBV com os resultados da imunohistoquímica para os genes estudados. Estabelecer protocolos de utilização das técnicas de FISH e qPCR, para uma futura utilização destes no serviço de diagnóstico, contribuindo para uma melhor caracterização das enfermidades ocorrentes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Trata de análise imuno-histoquímica e hibridização *in situ* em cortes histológicos. Não há riscos inerentes ao estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata de pesquisa que objetiva a classificação dos referidos linfomas de acordo com a classificação da OMS, bem como comparar os dados de expressão gênica, análise citogenética e amplificação do EBV com os resultados da imunohistoquímica para os genes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador encaminhou os documentos necessários para o exame pelo CEP, dentre os quais o projeto de pesquisa, folha de rosto e autorização para uso do material em parafina.

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto atende a legislação vigente e está de acordo com os critérios éticos.

Projeto de pesquisa adequado para aprovação do CEP.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP-FOUSP considera o projeto aprovado e mediante o protocolo de pesquisa encaminhado não entende a necessidade de envio do projeto para apreciação da CONEP.