UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**LINFOMAS DE BOCA: RECLASSIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS**

RICARDO ALVES DE MESQUITA

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o Título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de concentração: Patologia Bucal

São Paulo

2002

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**LINFOMAS DE BOCA: RECLASSIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS**

RICARDO ALVES DE MESQUITA

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da
Universidade de São Paulo, para obter o Título de
Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em
Odontologia.

Área de concentração: Patologia Bucal

Orientadora: Prof.^a Dra. Suzana Cantanhende
Orsini Machado de Sousa

São Paulo

2002

Meus pais, **JOÃO** e **FANNY**,

que me permitiram a vida e me
querem bem;

Aos meus irmãos **ZÉ**, **GUSTE** e

SANDRA, pelo sempre carinho;

DEDICO mais esta...

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Suzana C.O.M. Sousa**, pela disponibilidade, espírito científico, competência e amizade, indispensáveis à realização deste estudo.

À **Profa. Dra. Vera Cavalcanti de Araújo**, por todos os ensinamentos transmitidos, amizade, oportunidades que a mim proporcionou durante a realização do meu curso, sem dúvida fundamentais para o meu aprendizado. Pessoa de espírito científico brilhante e mentora não só deste, mas de grande parte de estudos realizados na disciplina de Patologia Bucal.

Ao **Prof. Dr. Ney Soares de Araújo**, por mais esta oportunidade de integrar tão conceituado curso, pela confiança depositada e pelos ensinamentos valiosos concedidos.

Ao **Prof. Dr. Roberto Antônio Pinto Paes**, pessoa de convívio recente, mas sempre com disponibilidade para orientações durante os nossos encontros, orientações estas fundamentais para o meu aprendizado e desenvolvimento deste estudo.

Ao **Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes**, pela amizade e disponibilidade, fundamentais para o meu aprendizado e desenvolvimento deste e de outros estudos.

Ao **Prof. Dr. Thales de Britto**, pelos seus ensinamentos e juntamente com a sua companheira de trabalho, **Ana**, pela disponibilidade de seu laboratório para a realização de experimentos deste estudo.

Aos **Prof.(s) Dr. Décio Santos Pinto Júnior e Dra. Marina Helena Cury Gallottini de Magalhães**, pela amizade e ensinamentos a mim concedidos.

Ao **Prof. Dr. Luiz Antonio Guimarães Cabral** e à sua esposa **Dra. Vera Cabral**, pela valiosa amizade e constantes ensinamentos recebidos desde o início da minha carreira.

À **todos os Professores da Disciplina de Patologia e Semiologia Bucal da FO-UFMG**, não só pela colaboração com material para este estudo, mas também pela amizade, excelente convívio e suporte no período de meu afastamento.

Aos **colegas Prof. (s) dos Serviços de Patologia Cirúrgica das Disciplinas de Patologia Bucal das Faculdades de Odontologia da UNESP (São José dos Campos-SP) e da UFPel (Pelotas-RS)** pela colaboração com material para este estudo.

Ao **Prof. Dr. Moacyr Novelli**, pela amizade e ajuda concedida no desenvolvimento de nossa metodologia.

À **Prof.a. Dra. Miriam Lacalle Turbino**, pela ajuda concedida na estatística deste estudo.

À **Zilda, Néia, Nair, Ana, Bia, Verinha, Luizete, Gleice, Patrícia e Graça** pela amizade, colaboração e ajuda, nunca negados.

À **Edna** e **Elisa**, não só pela valiosa contribuição para a realização de experimentos deste estudo, mas principalmente pela amizade e constantes ensinamentos.

À técnica **Telma**, do Laboratório de Imuno-histoquímica do Instituto Adolfo Lutz-USP, pela colaboração em experimentos deste estudo.

À **todos os colegas de pós-graduação**, pela convivência e compreensão, fundamentais para tornarem os dias melhores.

À secretária **Simone**, da FO-UFMG, pela amizade e colaboração nos trânsitos burocráticos necessários para a realização deste curso.

O que dizer a vocês e a outros
que colaboraram de forma direta ou
indiretamente?

OBRI GADO!

SUMÁRIO

p.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

RESUMO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
3 PROPOSIÇÃO	69
4 MATERIAL E MÉTODOS	70
5 RESULTADOS	92
6 DISCUSSÃO.....	123
7 CONCLUSÕES	153
REFERÊNCIAS	154
<i>SUMMARY</i>	

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Diagrama do rearranjo do gene da imunoglobulina de cadeia pesada. V_H : segmento variável; D_H : segmento de diversidade; J_H : segmento de junção; C_H : segmento constante; N₁ : segmento N ₁ ; N₂ : segmento N ₂ (McCarthy <i>et al.</i> , 1990).....	64
Figura 4.1 - Esquema da reação em cadeia da polimerase demonstrando as três principais etapas da reação.....	84
Figura 4.2 - Diagrama do gene da imunoglobulina de cadeia pesada com os seus segmentos e a localização dos iniciadores FR3A e LJH utilizados na primeira PCR; e FR3A e VLJH utilizados na segunda PCR. IgH: gene da imunoglobulina de cadeia pesada; 1 ^a : primeira; 2 ^a : segunda; V_H : segmento variável; D_H : segmento de diversidade; J_H : segmento de junção; C_H : segmento constante; snPCR: “semi-nested” PCR; pb: pares de base.....	90

Figura 5.1 - **Linfoma Difuso de Grandes Células B.** **A)** Padrão difuso de crescimento (HE, 100x); **B)** células linfóides neoplásicas grandes: centroblasto (**destaque em amarelo**) e imunoblasto (**destaque em azul**), e figuras de mitose (**setas verde**) (HE, 640x); **C)** pseudofolículo linfóide neoplásico (HE, 320x); **D)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD45 (SABC, 640x); **E)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD20 (SABC, 640x); **F)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD79a (SABC, 640x); e **G)** identificação, com o anticorpo CD21, das células dendríticas foliculares, formando uma rede de permeio às células linfóides neoplásicas do pseudofolículo (SABC, 640x).....96

Figura 5.2 - **Linfoma Difuso de Grandes Células B, subtipo Plasmoblástico.** **A)** Padrão difuso de crescimento (HE, 100x); **B)** células linfóides neoplásicas grandes: centroblasto (**seta amarela**), imunoblasto (**seta azul**) e figura de mitose (**seta verde**) (HE, 640x); **C)** células linfóides neoplásicas com diferenciação plasmocitóide (**destaque em amarelo**) (HE, 640x); **D)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD45 (SABC, 640x); **E)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para VS38c (SABC, 640x); **F)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para cadeia leve κ (SABC, 640x); **G)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para cadeia leve λ (SABC, 640x) e **H)** identificação da presença do EBV na forma de “pinpoints”, de coloração acastanhada e localizados no núcleo das células linfóides neoplásicas (**destaque em verde**) (ISH, 640x).....99

Figura 5.3 - **Linfoma de Burkitt**. **A)** Padrão difuso de crescimento com a presença de macrófagos não-neoplásicos (**setas marrom**) resultando no “padrão de céu estrelado” (HE, 100x); **B)** células linfóides neoplásicas homogêneas de tamanho médio (**destaque em amarelo**), figura de mitose (**seta verde**) e “karyorrhexis” (**seta azul**) (HE, 640x); **C)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD45 (SABC, 640x); **D)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD10 (SABC, 640x); **E)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD20 (SABC, 640x); **F)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD79a (SABC, 640x) e **G)** identificação da presença do EBV na forma de “pinpoints”, de coloração acastanhada e localizados no núcleo das células linfóides neoplásicas (**destaque em verde**) (ISH, 640x).....103

Figura 5.4 - **Linfoma de Células B da Zona Marginal Extranodal do Tecido Linfóide associado à Mucosa (Linfoma MALT)**. **A)** Padrão difuso de crescimento com a presença de folículos linfóides (**setas marrom**) (HE, 100x); **B)** ductos de glândulas salivares (**setas amarelas**) invadidos pelas células linfóides neoplásicas formando a lesão linfo-epitelial (HE, 640x); **C)** células linfóides neoplásicas da zona marginal, símele centrócitos (**destaque em amarelo**) (HE, 640x); **D)** células linfóides neoplásicas monocitóides, linfócitos pequenos e com diferenciação plasmocitóide, respectivamente no **destaque em azul** de cima para baixo (HE, 640x); **E)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD45 (SABC, 640x); **F)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD20 (SABC, 640x); **G)** células linfóides

neoplásicas imunopositivas para CD79a (SABC, 640x); **H)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para cadeia leve λ e **I)** identificação, com o anticorpo CD21, das células dendríticas foliculares, formando uma rede de permeio às células linfóides do folículo linfóide (SABC, 320x).....107

Figura 5.5 - **Linfoma de Células do Manto.** **A)** Padrão de crescimento vagamente nodular (**setas marrom**) (HE, 100x); **B)** células linfóides neoplásicas da zona marginal, símele centrócitos (**destaque em amarelo**) (HE, 640x); **C)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD45 (SABC, 640x); **D)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD5 (SABC, 640x); **E)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD20 (SABC, 640x); **F)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD79a; **G)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para ciclina D1 (**setas vermelhas**) e **H)** identificação, com o anticorpo CD35, das células dendríticas foliculares, formando uma rede de permeio às células linfóides neoplásicas (SABC, 640x).....109

Figura 5.6 - **Linfoma de Células NK/T Extranodal, tipo Nasal.** **A)** Padrão de crescimento difuso e angiocêntrico (**seta marrom**) (HE, 200x); **B)** padrão angio-invasivo (**seta azul**) (HE, 640x); **C)** padrão angiodestrutivo (**seta vermelha da esquerda**) e área de necrose (**seta vermelha da direita**) (HE, 200x); **D)** células linfóides neoplásicas grandes, pequenas e anaplásicas, respectivamente, no **destaque amarelo** de cima para baixo (HE, 640x); **E)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD45 (SABC, 640x); **F)**

células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD45RO (SABC, 640x); **G)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD3ε (SABC, 640x); **H)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD2 (SABC, 640x); **I)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD16 (SABC, 640x); **J)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD56 (SABC, 640x) e **K)** identificação da presença do EBV na forma de “pinpoints”, de coloração acastanhada e localizados no núcleo das células linfóides neoplásicas (**destaque em verde**) (ISH, 640x).....112

Figura 5.7 - **Linfoma de Células T Periféricas, não-Especificado.** **A)** Padrão difuso de crescimento (HE, 100x); **B)** figura de mitose (**seta verde**) e células linfóides neoplásicas grandes e pequenas pleomórficas, respectivamente, no **destaque amarelo** superior e inferior (HE, 640x); **C)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD45 (SABC, 640x); **D)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD45RO (SABC, 640x) e **E)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD3 (SABC, 640x).....114

Figura 5.8. **A) Células Dendríticas Foliculares** identificadas pelo anticorpo caldesmona e formando uma rede de permeio às células linfóides neoplásicas de um caso de linfoma difuso de grandes células B (SABC, 200x); **B) Células Dendríticas Foliculares** identificadas pelo anticorpo caldesmona com descontinuidade da rede, de permeio às células linfóides neoplásicas de um caso de linfoma difuso de grandes células B (SABC,

200x); **C) Vasos Sangüíneos e Células Endoteliais** imunodetectados pelo anticorpo CD34 em um caso de linfoma difuso de grandes células B (SABC, 200x) e **D) Células Dendríticas Interdigitantes** identificadas pelo anticorpo proteína S100 e apresentado citoplasma irregular e dendrítico de permeio às células linfóides neoplásicas de um caso de linfoma difuso de grandes células B (SABC, 320x).....119

Figura 5.9. **Gel de Integridade**. Verifica-se melhores resultados de DNA genômico de baixo peso molecular nas 25 amostras (eletroforese em gel agarose 0,7% com brometo de etídeo 0,5 g/ml).

Gel CK-14. Verifica-se amplificação do exon 7 da CK-14 (190pb) do DNA genômico em 23 amostras do experimento e ausência de amplificação em um caso de LDGC-B (seta marrom) e em um caso de LB (seta azul escuro) (eletroforese em gel agarose 2% com brometo de etídeo 0,5 g/ml).

Gel IgH. Verifica-se amplificação do IgH (80 a 120pb) com padrão de banda monoclonal nos dois casos de Mp, em três casos de LDGC-B, nos três casos de LDGC-Bp, no caso de LBh, no caso de MALT, no caso de LCM, e em três casos de LB; amplificação com padrão de banda policlonal nos dois casos de tonsilas; e não-amplificação nos dois casos de carcinoma epidermóide de boca, em um caso de LDGC-B, nos três casos de LNK/Tn e em um caso de LB (eletroforese em gel agarose 2% com brometo de etídeo 0,5 g/ml).

M: Marcador de Peso Molecular em pares de base (pb); **C-**: Controle Negativo; **T**: Tonsilas; **Mp**: Mielomas Plasmocíticos; **Ca**: Carcinomas Epidermóides; **LDGC-B**: Linfomas Difusos de Grandes Células B; **LDGC-Bp**: Linfomas Difusos de Grandes

Células B, subtipo Plasmoblástico; **LBh**: linfoma de Burkitt associado à infecção HIV; **LNK/Tn**: Linfomas de Células NK/T Extranodal, tipo Nasal; **MALT**: Linfoma de Células B da Zona Marginal Extranodal do Tecido Linfóide associado à Mucosa (Linfoma MALT); **LCM**: Linfoma de Células do Manto e LB: Linfomas de Burkitt.....122

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Classificação dos linfomas não-Hodgkin de Rappaport-1966 (Rappaport, 1966).....	12
Tabela 2.2 - Classificação da Doença de Hodgkin de Lukes & Butler-1966 (Lukes & Butler, 1966) e modificação Rye (Lukes <i>et al.</i> , 1966).....	13
Tabela 2.3 - Classificação dos linfomas não-Hodgkin de Rappaport modificada (Berard & Dorfman, 1974; Berard, 1975; Nathwani <i>et al.</i> , 1976).....	14
Tabela 2.4 - Classificação dos linfomas não-Hodgkin de Lukes & Collins-1974 (Lukes & Collis, 1974).....	15
Tabela 2.5 – Classificação Britânica dos linfomas não-Hodgkin (Bennet <i>et al.</i> , 1974).....	16

Tabela 2.6 - Classificação dos linfomas não-Hodgkin de Dorfman-1974 (Dorfman, 1974).....	17
Tabela 2.7 - Classificação dos linfomas não-Hodgkin de Kiel (Lennert <i>et al.</i> , 1975).....	18
Tabela 2.8 - Classificação dos linfomas não-Hodgkin da OMS-1976 (Mathe <i>et al.</i> , 1976).....	19
Tabela 2.9 - Classificação dos linfomas não-Hodgkin da “Working Formulation”-1982 (Rosemberg <i>et al.</i> , 1982).....	20
Tabela 2. 10 - Classificação das neoplasias do tecido linfóide da R.E.A.L.-1994 (Harris <i>et al.</i> , 1994).....	22
Tabela 2.11 - Classificação das neoplasias do tecido linfóide da Organização Mundial da Saúde-2001 (Jaffe <i>et al.</i> , 2001).....	25
Tabela 2.12 - Neoplasias do tecido linfóide associadas à infecção HIV reconhecidas pela Organização Mundial da Saúde-2001 (Jaffe <i>et al.</i> , 2001).....	35
Tabela 2.13 - Classificação das células dendríticas (Tew, 1993).....	44

Tabela 4.1 - Origens e protocolo de trabalho (recuperação antigênica, concentrações e tempos de incubação) dos anticorpos utilizados no presente estudo.....	76
Tabela 5.1 – Reclassificação dos casos de linfomas de boca de acordo com a OMS- 2001 (Jaffe <i>et al.</i> , 2001) (N=46).....	93
Tabela 5.2 - Dados clínicos referentes aos casos de linfoma difuso de grandes células B.....	94
Tabela 5.3 - Dados clínicos referentes aos casos de linfoma difuso de grandes células B, subtipo plasmoblástico.....	97
Tabela 5.4 - Dados clínicos referentes aos casos de linfoma de Burkitt.....	100
Tabela 5.5 - Dados clínicos dos casos de linfoma de células B da zona marginal extranodal do tecido linfóide associado à mucosa (Linfoma MALT).....	104
Tabela 5.6 - Dados clínicos referentes aos casos de linfoma células NK/T extranodal, tipo nasal.....	110
Tabela 5.7 - Imunofenotipagem e hibridização “in situ” (ISH) do DNA do EBV dos linfomas de boca (N=46).....	115

Tabela 5.8 - Valores das médias aritméticas da quantificação das células dendríticas foliculares/caldesmona+ e das células dendríticas interdigitantes/ S100+ nos linfomas de boca (N=46).....	118
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

010: clone de anticorpo contra o CD1a

1B6: clone de anticorpo contra o CD56

1F8: clone de anticorpo contra o CD21

2H7: clone de anticorpo contra o CD16

54/F6: clone de anticorpo contra o CD5

56C6: clone de anticorpo contra o CD10

AB75: clone de anticorpo contra o CD2

AIDS: “acquired immunodeficiency syndrome”

ALK: “anaplastic large cell lymphoma kinase protein”

AO452: clone de anticorpo contra o CD3

ATPS: “3-aminopropyltriethoxysilene”

BCL-1: oncogene sinônimo do gene CICLINA D1

BCL-6: oncogene

BCR: “B cell receptor”

BLC-2: oncogene

C-: controle negativo

C3b: receptor de complemento

C3b: receptor de complemento

CA: "California"

Ca: carcinoma epidermóide

CALLA: "common acute lymphoblastic leukemia antigen"

CCND1: sinônimo do gene da CICLINA D1

CD: "cluster of differentiation"

CD10: "cluster of differentiation 10"

CD138: "cluster of differentiation 138"

CD16: "cluster of differentiation 16"

CD19: "cluster of differentiation 19"

CD1a: "cluster of differentiation 1a"

CD2: "cluster of differentiation 2"

CD20: "cluster of differentiation 20"

CD21: "cluster of differentiation 21"

CD22: "cluster of differentiation 22"

CD23: "cluster of differentiation 23"

CD3: "cluster of differentiation 3"

CD30: "cluster of differentiation 30"

CD34: "cluster of differentiation 34"

CD35: "cluster of differentiation 35"

CD4: "cluster of differentiation 4"

CD43: "cluster of differentiation 43"

CD45: "cluster of differentiation 45"

CD45RA: "cluster of differentiation 45RA", epítipo restrito do CD45

CD45RB: “cluster of differentiation 45RB”, epítipo restrito do CD45

CD45RO: “cluster of differentiation 45RO”, epítipo restrito do CD45

CD5: “cluster of differentiation 5”

CD56: “cluster of differentiation 56”

CD57: “cluster of differentiation 57”

CD79: “cluster of differentiation 79”

CD79a/mb1: “cluster of differentiation 79a”, dímero do CD79

CD79a: “cluster of differentiation 79a”

CD79b/B29: “cluster of differentiation 79b”, dímero do CD79

CD79b: “cluster of differentiation 79b”

CD8: “cluster of differentiation 8”

cDNA: “complementary deoxyribonucleic acid”

CDR: “complementarity-determining regions”

C_H: região constante do gene IgH

CICLINA D1: gene que codifica a proteína ciclina D1

ciclina D1: produto do oncogene BCL-1

ciclina D1: proteína do ciclo celular

CK-14: citoqueratina 14

CO: “Company”

DCS-6: clone de anticorpo contra a ciclina D1

DH: Doença de Hodgkin

D_H: região de diversidade do gene IgH

D_H-N₁-J_H: locus gênico criado durante o rearranjo do gene IgH

DNA: “deoxyribonucleic acid”

DNF: dado não-fornecido

dNTP: solução de 2'-deoxinucleotídeos 5'-trifosfato: dATP, dTTP, dCTP e dGTP

DRC-1: “dendritic reticulum cell-1”

EBV: “Epstein-Barr virus”

EBV-EBNA-1: “EBV nuclear antigen 1”

EDTA: “Ethylenediamine-Tetraacetic Acid”

ELJH/*Bam*: iniciador para a região J_H do gene IgH com sítio para enzima de restrição

ERBE-1: “EBV encoded small RNA”

FcγRIII: receptor com alta afinidade para IgG1 e IgG3

Fc: fragmento cristalizável da molécula de imunoglobulina (anticorpo)

FOUSP: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

FR: “framework”

Fr2A: iniciador para a região V_H do gene IgH

Fr2B: iniciador para a região V_H do gene IgH

FR3A: iniciador para a região V_H do gene IgH

g/ml: grama por mililitro

g: grama

HCL: ácido clorídrico

HE: hematoxilina-eosina

HIV: “human immunodeficiency virus”

HLD-DR: “Histocompatibility Leukocyte Antigen, DR”

HP6054: clone de anticorpo contra a imunoglobulina de cadeia leve λ

hs: horas

I: número romano

IDL: “intermediately differentiated lymphocytic lymphoma”

Ig α : imunoglobulina α

Ig β : imunoglobulina β

Ig: imunoglobulina

IgA: imunoglobulina A

IgD: imunoglobulina D

IgE: imunoglobulina E

IgE: imunoglobulina E

IgG: imunoglobulina G

IgH: gene da imunoglobulina de cadeia pesada

IgM: imunoglobulina M

Igs: imunoglobulinas

II: número romano

III: número romano

IL10: interleucina 10

IL-2: interleucina 2

IL6: interleucina 6

IPSID: “immunoproliferative small intestinal disease”

ISH: “in situ hybridization”

JCB117/MoAb: clone de anticorpo contra o CD79

J_H: região de junção do gene IgH

K7F3: iniciador para o gene da CK-14

K7F3N: iniciador para o gene da CK-14

kD: “kilo Dalton”

Ki-67: marcador de proliferação celular

Ki-M4: anticorpo associado às células dendríticas foliculares

KSHV: “Kaposi sarcoma human virus”

L1C1: clone de anticorpo contra a imunoglobulina de cadeia leve κ

L-26: clone de anticorpo contra o CD20

LB: linfoma de Burkitt

LBes: linfoma de Burkitt esporádico

LBh: linfoma de Burkitt associado à infecção HIV

LCA: “Leukocyte Common Antigen”

LCM: linfoma de células do manto

LDGC-B: linfoma difuso de grandes células B

LDGC-Bp: linfoma difuso de grandes células B, subtipo plasmoblástico

LH: linfoma de Hodgkin

LIDO: Laboratório de Informática Dedicado a Odontologia

linfoma MALT: linfoma de células B da zona marginal extranodal do tecido

linfóide associado à mucosa

LMP-1: “latent membrane protein-1”

LNH: linfoma não-Hodgkin

LNK/Tn: linfoma de células NK/T extranodal, tipo nasal

LTn: linfoma de células T periféricas, não-especificado

LVHJ: iniciador para a região J_H do gene IgH

M: marcador de peso molecular em pares de base

M: molar

M0701: clone de anticorpo contra o CD45

MAC-CDR: clone de anticorpo contra o CD35

MALT: “mucosa associated lymphoid tissue”

mg: miligrama

MgCl₂: cloreto de magnésio

MHC: “Major Histocompatibility Complex”

ml: mililitro

mM: milimolar

MO: “Missouri”

Mp: mieloma plasmocítico

MYC: oncogene

N: número

N₁: segmento gênico criado durante o rearranjo do gene IgH

N₂: segmento gênico criado durante o rearranjo do gene IgH

NaCl: Cloreto de Sódio

N-CAM: “neural cellular adhesion molecule”

NJ: “New Jersey”

NK: “natural killer”

NY: “New York”

OMS: Organização Mundial da Saúde

P: nível de significância (confiança)

pan B: anticorpo policlonal para células B

pan T: anticorpo policlonal para células T

pb: pares de base

PBS: “phosphate buffered saline”

PCR: “polymerase chain reaction”

pH: potencial hidrogeniônico

pM: picomolar

PRAD1: sinônimo do gene da CICLINA D1

QBE/10: clone de anticorpo contra o CD34

R.E.A.L.: “Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasm”

R4/23: anticorpo associado à células dendríticas foliculares, sinônimo de DCR-1

RES: “reticulum endothelial system”

RGB: “Reed/Green/Blue”

RNA: “ribonucleic acid”

RNA_m: “messenger ribonucleic acid”

rpm: rotações por minuto

RS: “Reed-Sternberg”

S100: designação da proteína S100 em função de sua solubilidade (100%) em sulfato de amônia, pH neutro

SABC: streptavidina-biotina

SDS: “Sodium dodecyl sulfate”

snPCR: “semi-nested” PCR

SSC: solução de cloreto e citrato de sódio

t: significado de translocação gênica

T: tonsila

Ta1: linfócitos T auxiliares 1

Ta2: linfócitos T auxiliares 2

TAE: solução de Tris, ácido acético glacial e EDTA

Taq: *Thermus aquaticus*

TBST: solução de Tris-HCL e Tween 20

Tc: linfócitos T citotóxicos

TCR: "T cell receptor"

TCR-1: "T cell receptor-1"

TCR-2: "T cell receptor-2"

TD107: clone de anticorpo contra a caldesmona

TdT: "terminal deoxyribonucleotide transferase"

TIA-1: "T cell-restricted intracellular antigen"

Tris: TRIS-Hydroximetil-Aminometano

Tris-HCl: TRIS-Hydroximetil-Aminometano/Ácido clorídrico

tRNA: "transport RNA"

U: unidade

UCHL-1: clone do anticorpo que reconhece o CD45RO

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UFPel: Universidade Federal de Pelotas

UNESP: Universidade do Estado de São Paulo

USA: "United State American"

USP: Universidade de São Paulo

UV: ultravioleta

V: volume

V_H : região variável do gene IgH

$V_HN_2-D_HN_1-J_H$: lócus gênico criado durante o rearranjo do gene IgH

VJH: iniciador para a região J_H do gene IgH

VS38c: clone do anticorpo contra uma proteína de 64kD presente em células plasmocitárias neoplásicas ou não-neoplásicas

$\bar{X}$: valor da média aritmética

x: vez

Z0311: clone de anticorpo contra a proteína S100

LISTA DE SÍMBOLOS

%: por cento

α : letra do alfabeto grego “alfa”

β : letra do alfabeto grego “beta”

δ : letra do alfabeto grego “delta”

γ : letra do alfabeto grego “gama”

κ : letra do alfabeto grego “kappa”

λ : letra do alfabeto grego “lambda”

$^{\circ}\text{C}$: graus Celsius

μm : micrômetro

$>$: maior que

$\mu\text{g/ml}$: micrograma por mililitro

ϵ : letra do alfabeto grego “epsilon”

μg : micrograma

μl : microlitro

RESUMO

LINFOMAS DE BOCA: RECLASSIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Este estudo teve como objetivo, a partir de um levantamento de casos de linfomas de boca, sua reclassificação de acordo com a classificação da Organização Mundial Saúde-2001 (OMS-2001), com imunofenotipagem, relação com o vírus Epstein-Barr (EBV-“Epstein-Barr virus“), com confirmação da monoclonalidade das neoplasias de células linfóides B, e a caracterização das células dendríticas e sua relação com os diferentes tipos histológicos. Para tanto se utilizou informações obtidas nas fichas de requisição para exame anatomo-patológico, da técnica de hematoxilina-eosina, da técnica de imuno-histoquímica, da técnica de hibridização “in situ”, e da reação em cadeia da polimerase. Este estudo constou de 46 casos de linfomas de boca e as neoplasias de células linfóides B maduras foram 42 (91,3%) casos. Os linfomas de boca estiveram presentes preferencialmente em pacientes do sexo masculino e leucodermas. Os tipos histológicos foram diferentes de acordo com a idade. As lesões localizaram-se preferencialmente em tecido mole da maxila, a exceção do linfoma de Burkitt que teve como localização preferencial a mandíbula. Os anticorpos

CD20 e CD79a foram imunodetectados em todos os tipos histológicos de neoplasias de células linfóides B maduras, e os anticorpos CD45RO e CD3 em todas as neoplasias de células linfóides T e NK maduras. Frequências variáveis da detecção do EBV foram verificadas em casos de linfoma difuso de grandes células B, subtipo plasmoblástico, de linfoma de Burkitt e de linfoma de células NK/T extranodal, tipo nasal. Quatorze casos (87,5%) dos casos de neoplasias de células B maduras de boca apresentaram, na análise do gene da imunoglobulina de cadeia pesada (IgH), um padrão de banda monoclonal. As células dendríticas foliculares visualizadas pelos anticorpos CD21 e CD35 estiveram presentes em áreas de pseudofolículos e folículos linfóides de dois casos de linfoma difuso de grandes células B e em um caso de linfoma MALT, respectivamente; e no caso de linfoma de células do manto. As células dendríticas foliculares visualizadas pelo anticorpo caldesmona e as células dendríticas interdigitantes pela proteína S100, estavam presentes em todos os 46 casos de linfomas de boca. O linfoma de Burkitt apresentou índices de células dendríticas foliculares/caldesmona+ e células dendríticas interdigitantes/S100+ menores que o linfoma difuso de grandes células B e linfoma difuso de grandes células B, subtipo plasmoblástico. A associação do padrão morfológico com dados clínicos, perfil imuno-histoquímico, presença EBV e comprovação da monoclonalidade por análise molecular representam chaves para o diagnóstico dos linfomas de boca. O micro-ambiente dos linfomas é importante para o desenvolvimento das células dendríticas.

1 INTRODUÇÃO

Os linfomas representam grupo importante, complexo e heterogêneo de distúrbios proliferativos malignos originados a partir das células do tecido linfóide. Desde a observação por Thomas Hodgkin (Hodgkin, 1832), estas doenças têm sido largamente estudados e vários sistemas de classificação foram propostos. A complexidade e heterogeneidade dos linfomas estão relacionadas à diversidade das células do tecido linfóide. Assim, na última classificação dos tumores dos tecidos linfóide e hematopoético, OMS-2001 (Jaffe *et al.*, 2001), é preconizada a utilização de aspectos clínicos, morfológicos, imunofenotipagem e análise molecular sempre que possível para o diagnóstico destas neoplasias.

A boca representa um sítio extranodal pouco comum para neoplasias do tecido linfóide. Os linfomas de boca, enquanto neoplasias primárias, são exclusivamente linfomas não-Hodgkin. Os tipos histológicos dos linfomas de boca têm freqüência e nomenclatura variáveis, em função dos vários sistemas classificatórios.

O EBV é freqüentemente detectado em alguns tipos histológicos de linfomas, sendo relacionado à patogênese destas entidades e por vezes esta associação é utilizada no diagnóstico de muitas delas.

Os linfomas, como representam proliferações monoclonais de células linfóides B ou T e NK, apresentam rearranjo dos genes IgH ou do receptor de antígenos de células T, respectivamente. A análise molecular destes genes tem sido importante para o conhecimento destas doenças e para o auxílio no diagnóstico.

As células dendríticas representam um grupo heterogêneo de células do tecido linfóide, com função básica de apresentação de antígenos. O estudo das células dendríticas nas neoplasias do tecido linfóide tem colaborado para o conhecimento das funções destas células dentro do tecido linfóide e para o diagnóstico de determinados tipos histológicos de linfomas.

A busca de melhor compreensão dos linfomas de boca levou à realização de um levantamento de casos destas neoplasias localizadas na boca, com reclassificação de acordo com a OMS-2001 (Jaffe *et al.*, 2001), a detecção da presença do EBV em determinados tipos histológicos, a confirmação da monoclonalidade das neoplasias de células linfóides B, e a caracterização das células dendríticas e sua relação com os tipos histológicos destes linfomas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Devido à profundidade sobre o assunto **Imunologia**, os dois primeiros tópicos: **2.1 Células do Sistema Imune** e **2.2 Tecido Linfóide** da revisão da literatura, representam um resumo dos compêndios de Abbas *et al.*, 1997; Roitt *et al.*, 1999.

2.1 Células do Sistema Imune

O sistema imune tem como finalidade básica a proteção do hospedeiro contra agentes patogênicos como vírus, bactérias, fungos, protozoários e parasitas multicelulares. A resposta imune relaciona-se, primeiramente, ao reconhecimento do patógeno ou de outro corpo estranho e posteriormente à elaboração de uma resposta dirigida a este elemento com o objetivo de eliminá-lo. De uma forma geral existem dois tipos diferentes de resposta imune: a resposta imune inata (não-adaptativa) e a resposta imune adaptativa, sendo que a diferença entre estes dois tipos de resposta é que a resposta imune adaptativa é altamente específica para um determinado patógeno.

As repostas imunes são realizadas e elaboradas por uma variedade de células e por moléculas solúveis produzidas e secretadas por estas células. As células centrais do sistema imune são os leucócitos e estes são representados pelos linfócitos, fagócitos e células acessórias. Além destas, células teciduais também participam das respostas imunes através de sinais enviados aos linfócitos e das respostas às citocinas liberadas pelos linfócitos T e macrófagos.

As células do sistema imune são originadas de células tronco pluripotentes, através de duas linhas principais de diferenciação celular: a linhagem linfóide e a linhagem mielóide. Os linfócitos são representados por células T, células B ou linfócitos exterminadores naturais/linfócitos “natural killer” (NK). As células T desenvolvem-se a partir de seus precursores no timo, ao passo que as células B de mamíferos desenvolvem-se no fígado fetal e na medula óssea, nos adultos. As células NK desenvolvem-se na medula óssea e são funcionalmente distintas das células T ou B pela sua capacidade de lisar certas linhagens de células tumorais “*in vitro*”, sem sensibilização prévia. Os fagócitos, de origem mielóide, compreendem os monócitos/macrófagos e os granulócitos polimorfonucleares. Os granulócitos polimorfonucleares recebem esta denominação por apresentarem núcleo irregular e multilobulado (polimórfico), e conforme o comportamento de seus grânulos citoplasmáticos frente aos corantes ácidos e básicos eles são identificados como neutrófilos, basófilos e eosinófilos. As células acessórias compreendem as células apresentadoras de antígeno, plaquetas, mastócitos e células endoteliais.

Os linfócitos e outros leucócitos expressam moléculas ou “marcadores” de superfície diferentes, em suas membranas citoplasmáticas. Estas moléculas são utilizadas para distinguir vários tipos celulares e podem atualmente ser identificados com o uso de anticorpos monoclonais específicos e através de uma nomenclatura sistemática - o sistema CD (“cluster of differentiation”). O termo CD significa grupo de diferenciação e se refere a grupos ou grupamentos de respectivos anticorpos monoclonais que se ligam especificamente a uma determinada molécula. O sistema CD surgiu com a análise de anticorpos monoclonais produzidos principalmente em camundongos contra os antígenos leucocitários humanos.

O marcador definitivo da linhagem das células T é o receptor de antígenos das células T - TCR (“T cell receptor”). Existem dois tipos de TCR: o TCR2, um heterodímero com dois peptídeos ligados por pontes dissulfeto (α e β); e o TCR1 que consiste de polipeptídeos γ e δ . Estes receptores são associados ao um conjunto de cinco polipeptídeos, o complexo CD3, que formam o complexo receptor das células T (TCR-CD3). Cerca de 90-95% dos linfócitos T sangüíneos são $\alpha\beta$ e o restante 5-10% são $\gamma\delta$. Os linfócitos T $\alpha\beta$ são subdivididos em duas subpopulação não-sobrepostas: uma subpopulação que possui o marcador CD4 (Ta) e função de “auxiliar” ou “induzir” as respostas imunes e uma subpopulação com o marcador CD8 (Tc) e função de citotoxicidade. Além destes marcadores existem outros que são encontrados nas células T ou compartilhados com outras células, como o CD5 também presente em algumas células B.

Os linfócitos B são classicamente definidos pela presença de imunoglobulinas (Igs) de membrana. A grande maioria dos linfócitos B do sangue periférico expressa dois isótipos de imunoglobulina de superfície, IgM e IgD. Poucos linfócitos B da circulação expressam IgG, IgA e IgE. A imunoglobulina (Ig) associada à outras moléculas acessórias de membrana, forma o complexo receptor de antígeno em células B-BCR, ("B cell receptor"). Estas moléculas acessórias compreendem os heterodímeros de $Ig\alpha$ (CD79a) ligados por pontes dissulfeto e $Ig\beta$ (CD79b). Inúmeros outros marcadores são expressos pelas células B humanas, sendo que atualmente os CD19, CD20 e CD22 são os principais marcadores utilizados na identificação dos linfócitos B.

As células T ou B, após ativação por antígenos ou mitógenos, sofrem sinais distintos de diferenciação que podem ser observados ao nível ultra-estrutural. Os blastos de células B diferenciam-se em células formadoras de anticorpos que terminam por se diferenciar em plasmócitos. Os plasmócitos, ao nível de microscopia de luz, apresentam citoplasma basofílico em virtude da grande quantidade de ácido ribonucléico-RNA ("ribonucleic acid") utilizado na síntese de anticorpos. Os anticorpos produzidos por um único plasmócito possuem uma única especificidade e pertencem a uma única classe de Ig. As Igs podem ser visualizadas no citoplasma do plasmócito através de marcadores específicos.

As células NK não expressam receptores de antígenos TCR ou BCR, sendo que a maioria dos antígenos de superfície detectados nestes linfócitos não é linhagem-específico e são compartilhados com outras células do

sistema imune. Um anticorpo freqüentemente utilizado para identificar células NK é o anticorpo monoclonal CD16 (Fc γ RIII), representando um marcador relacionado às vias de ativação das células NK e também presente nos neutrófilos, macrófagos e, provavelmente, nos linfócitos T $\gamma\delta$. Outro marcador importante das células NK é o CD56.

O sistema fagocitário mononuclear possui duas funções principais, realizadas por dois tipos celulares distintos, derivados da medula óssea: 1) os monócitos/macrófagos fagocíticos, cuja função é remover antígenos particulados e 2) as células apresentadoras de antígeno, cuja função é internalizar o antígeno, processá-lo e apresentá-lo aos linfócitos. Os macrófagos teciduais, as células endoteliais e os granulócitos polimorfonucleares originalmente recebiam a designação de sistema retículo endotelial - RES ("reticulum endothelial system").

Os granulócitos polimorfonucleares não apresentam nenhuma especificidade inerente para antígenos, mas desempenham um papel importante na inflamação aguda, geralmente em sinergia com anticorpos e complemento, como forma de proteção contra microrganismos invasores. A principal função destas células é a fagocitose. Os polimorfonucleares neutrófilos possuem um arsenal de proteínas antimicrobianas que são armazenadas em grânulos. Os eosinófilos possuem grânulos citoplasmáticos que se coram com corantes ácidos, como a eosina e, embora não seja sua função primária, estes leucócitos são capazes de fagocitar e destruir microrganismos ingeridos. Os basófilos e mastócitos possuem grânulos citoplasmáticos, que após a degranulação, liberam mediadores químicos

como a histamina, que causa sintomas adversos no processo alérgico ou pode exercer um papel importante na imunidade contra parasitas. As plaquetas, além de seu papel fundamental na coagulação sangüínea, são relacionadas às respostas imunes, especialmente na inflamação, através da liberação de mediadores químicos.

2.2 Tecido Linfóide

As células que participam das repostas imunes encontram-se organizadas em tecidos e órgãos a fim de executar as suas funções de forma mais eficiente. Estes tecidos e órgãos distribuem-se pelo organismo como estruturas encapsuladas ou como acúmulos de tecido linfóide difuso, e são classificados em órgãos linfóides primários ou centrais e secundários ou periféricos. Coletivamente estas estruturas são denominadas de tecido linfóide.

Os órgãos linfóides primários representam o local de desenvolvimento das células linfóides. Nestes órgãos, os linfócitos se diferenciam a partir de células-tronco linfóides, proliferam-se, amadurecem e tornam-se células funcionais. Nos mamíferos, os órgãos linfóides primários são o timo, onde as células T diferenciam-se, e o fígado fetal e medula óssea, onde as células B diferenciam-se. Nestes locais os linfócitos adquirem o seu arsenal de receptores e são preparados para a tolerância aos auto-antígenos.

Os órgãos linfóides secundários fornecem o ambiente no qual os linfócitos interagem entre si, com as células acessórias e com os antígenos. Nos mamíferos estes órgãos são representados por órgãos encapsulados,

bem organizados -o baço e os linfonodos; e por acúmulos de tecidos linfóides não-encapsulados que são distribuídos por todo o organismo. A maior parte do tecido linfóide não-encapsulado é encontrada em associação com as superfícies mucosas e recebe a denominação de tecido linfóide associado à mucosa - MALT (“mucosa associated lymphoid tissue”).

O baço localiza-se no quadrante superior esquerdo do abdômen, atrás do estômago, próximo ao diafragma. Existem dois tipos de tecido no baço: a polpa vermelha e a polpa branca. A polpa branca é representada por tecido linfóide distribuído ao redor de uma arteríola central, a bainha linfóide periarteriolar. A bainha linfóide periarteriolar contém áreas de linfócitos T e áreas de linfócitos B, que podem estar organizados em folículos primários (não-estimulados) ou em folículos secundários (estimulados). A polpa vermelha é representada por sinusóides e cordões celulares contendo macrófagos residentes, eritrócitos, plaquetas, granulócitos, linfócitos e inúmeros plasmócitos. Assim o baço, além de função imunológica, serve também como reservatório de plaquetas, eritrócitos e granulócitos.

Os linfonodos representam uma rede que filtra antígenos do fluído dos tecidos intersticiais e da linfa durante sua passagem da periferia para o ducto torácico. Os linfonodos estão distribuídos estrategicamente em áreas do corpo como o pescoço, axilas, virilha, mediastino e cavidade abdominal, onde drenam as diferentes regiões superficiais e profundas do organismo. Os linfonodos que protegem a pele são superficiais e denominados de nódulos subcutâneos, e aqueles que protegem as superfícies mucosas do trato respiratório, digestivo e genito-urinário são chamados de nódulos

viscerais ou profundos. Os linfonodos são encapsulados e consistem de uma área de linfócitos B (córtex), uma área de linfócitos T (paracórtex) e de uma área central que possui cordões celulares contendo linfócitos B, T, plasmócitos e macrófagos.

O MALT é representado particularmente por agregados de tecido linfóide não-encapsulado localizado na lâmina própria e submucosa do anel de Waldeyer, tratos gastrintestinais, genito-urinário e respiratório e as células linfóides se distribuem como agregados difusos, ou em nódulos solitários ou ainda em agregados contendo centros germinativos.

2.3 Linfomas

Os linfomas representam grupo importante, complexo e heterogêneo de distúrbios proliferativos malignos originados a partir das células do tecido linfóide. Uma das primeiras observações de linfomas foi feita por Thomas Hodgkin em 1832 (Hodgkin, 1832) que verificou aumento de volume em linfonodos e alterações no baço. Foi em 1858 que Virchow (Virchow, 1858) usou pela primeira vez o termo linfoma para designar as neoplasias do tecido linfóide. A terminologia Doença de Hodgkin (DH) foi proposta em 1865 por Wilks (Wilks, 1865) baseado nas observações iniciais de Thomas Hodgkin. Billroth, em 1871, propôs o termo linfoma maligno para esta categoria de lesões uma vez que, tradicionalmente, o sufixo “oma” é utilizado para designar processos proliferativos benignos.

Com o surgimento da terminologia DH utilizado para designar um grupo de neoplasias do tecido linfóide com características microscópicas

específicas, as outras neoplasias que não apresentavam estas características passaram a ser denominadas linfomas não-Hodgkin (LNH). A primeira tentativa de delinear subcategorias de linfomas foi feita por Dreschfeld (1893) e Kundrat (1893) que reconheceram a DH e o linfossarcoma (linfoma não-Hodgkin) como entidades únicas e distintas. A partir desta data e até os dias atuais, os LNH passaram a ser considerados como um grupo separado de lesões, distintas da DH em termos de comportamento biológico, patologia e tratamento.

Clinicamente a DH apresenta crescimento ordenado e por contigüidade, freqüente localização no grupo de linfonodos central e axial, rara localização nos linfonodos mesentéricos e anel de Waldeyer, e raramente tem apresentação extranodal. Os LNH têm crescimento não-contíguo dentro do tecido linfóide e em sítios extranodais, refletindo o padrão de circulação dos linfócitos não-neoplásicos. A apresentação extranodal é comum para os LNH, sendo que quando apresentam localização nodal os linfonodos periféricos, mesentéricos, e anel de Waldeyer são os locais mais freqüentes. Na histopatologia, a característica principal da DH é a presença das células RS (“Reed-Sternberg”), que são caracterizadas pelo seu tamanho grande, núcleos multilobulados e nucléolo grande e arredondado (Mann, *et al.*, 1979).

Apesar desta descrição inicial de duas categorias de neoplasias do tecido linfóide, houve muitas dúvidas e dificuldades de reconhecer certos linfomas, uma vez que estas neoplasias apresentam uma diversidade celular

muito grande. Foi em 1955 que Gall sugeriu que subclassificações citológicas mais específicas para os linfomas eram necessárias.

O primeiro sistema de classificação para LNH foi proposto por Rappaport em 1966 (Tabela 2.1). Esta classificação baseou-se no padrão morfológico de crescimento da neoplasia e nas características citológicas específicas dos elementos neoplásicos. Os LNH foram divididos primeiramente em relação ao padrão de crescimento em difuso ou nodular e posteriormente subdivididos em relação ao tipo citológico.

Tabela 2.1 - Classificação dos linfomas não-Hodgkin de Rappaport-1966 (Rappaport *et al.*, 1966)

Linfoma Nodular

1. Linfoma linfocítico, bem diferenciado
2. Linfoma linfocítico, pouco diferenciado
3. Linfoma histiocítico e linfocítico
4. Linfoma histiocítico
5. Linfoma indiferenciado

Linfoma Difuso

1. Linfoma linfocítico, bem diferenciado
 2. Linfoma linfocítico, pouco diferenciado
 3. Linfoma histiocítico e linfocítico
 4. Linfoma histiocítico
 5. Linfoma indiferenciado
-

A classificação de Lukes & Butler (1966) é o mais importante sistema para a DH. A classificação de Lukes & Butler-1966 sofreu modificação na conferência realizada na cidade de Rye (New York, USA) (Lukes *et al.*, 1966) (Tabela 2.2), mas continua sendo o sistema utilizado classificar a DH, uma vez que este apresenta simplicidade, reprodutibilidade, aplicação clínica e é largamente aceito por patologistas e clínicos. Este sistema baseou-se no padrão de crescimento da neoplasia e nas características citológicas específicas dos elementos neoplásicos.

Tabela 2.2 - Classificação da Doença de Hodgkin de Lukes & Butler-1966 (Lukes & Butler, 1966) e modificação Rye (Lukes *et al.*, 1966)

Lukes & Butler	Modificação Rye
1. Linfoma de Hodgkin, linfocítico e/ou histiocítico	1. Linfoma de Hodgkin, predominância linfocítica nodular
Nodular	
Difuso	
2. Linfoma de Hodgkin, esclerose nodular	2. Linfoma de Hodgkin, esclerose nodular
3. Linfoma de Hodgkin, celularidade mista	3. Linfoma de Hodgkin, celularidade mista
4. Linfoma de Hodgkin, fibrose difusa	4. Linfoma de Hodgkin, depleção linfocítica
5. Linfoma de Hodgkin, reticular	

Por outro lado, a classificação de Rappaport-1966, além de sofrer modificações (Berard & Dorfman, 1974; Berard, 1975; Nathwani *et al.*, 1976) (Tabela 2.3), deixou de responder à algumas observações no transcorrer de sua utilização, em função do grande avanço da imunologia no conhecimento funcional e estrutural do tecido linfóide (Nathwani *et al.*, 1976; Mann *et al.*, 1979). Uma destas observações se refere à diversidade funcional dos linfócitos, onde basicamente duas classes de linfócitos, B e T, foram identificadas e a classificação de Rappaport-1966 não traz nenhuma relação entre os linfomas e os tipos de linfócitos existentes no tecido linfóide. Mais importante que tudo, a célula que se supunha ser histiócito, era na verdade linfócito B ativado (grande célula B). Além disto, outras entidades do tecido linfóide foram identificadas, sem estar presentes na classificação de Rappaport-1966. Em função destas observações outros sistemas de classificação para os LNH foram propostos.

Tabela 2.3 - Classificação dos linfomas não-Hodgkin de Rappaport modificada (Berard & Dorfman, 1974; Berard, 1975; Nathwani *et al.*, 1976)

Linfoma Nodular

1. Linfoma linfocítico, bem diferenciado
2. Linfoma linfocítico, pouco diferenciado
3. Linfoma histiocítico e linfocítico
4. Linfoma histiocítico

Linfoma Difuso

1. Linfoma linfocítico, bem diferenciado sem características plasmocitóides
2. Linfoma linfocítico, bem diferenciado com características plasmocitóides
3. Linfoma linfocítico, pouco diferenciado sem características plasmocitóides
4. Linfoma linfocítico, pouco diferenciado com características plasmocitóides
5. Linfoma linfoblástico, convoluto
6. Linfoma linfoblástico, não-convoluto
7. Linfoma histiocítico e linfocítico
8. Linfoma histiocítico, com esclerose
9. Linfoma histiocítico, sem esclerose
10. Tumor de Burkitt
11. Linfoma indiferenciado

Linfoma Maligno, não-Classificado

Linfoma Composto

Lukes & Collins em 1974 (Tabela 2.4) propõem um sistema de classificação com cinco tipos histológicos de LNH. Nesta classificação os autores propõem que os subtipos histológicos sejam reconhecidos principalmente pelos aspectos morfológicos. Alguns aspectos morfológicos, como a formação de folículos pelas células neoplásicas, mostraram ser um indicador de linfomas de origem de células B, entretanto as características celulares nos linfomas de padrão difuso não foram suficientes para determinar um fenótipo de linhagem B ou T.

Tabela 2.4 - Classificação dos linfomas não-Hodgkin de Lukes & Collins-1974 (Lukes & Collins, 1974)

Linfoma tipo Célula não-Definida

Tipos Célula T

1. Linfoma linfocítico, tipo célula T
2. Micose fungóide/Síndrome de Sézary (cerebriforme), tipo célula T
3. Linfoma linfocítico convoluto, tipo célula T
4. Sarcoma imunoblástico, tipo célula T

Tipos Células B

1. Linfoma linfocítico, tipo célula B
2. Linfoma linfocítico plasmocitóide, tipo célula B
3. Linfomas de células do centro folicular, de pequenas células clivadas, de grandes células clivadas, de pequenas células não-clivadas ou de grandes células não-clivadas

SUBTIPOS:

- 3.1. Folicular
- 3.2. Folicular e difuso
- 3.3. Difuso
- 3.4. Esclerótico, com folículos
- 3.5. Esclerótico, sem folículos

4. Sarcoma imunoblástico, tipo célula B

Linfoma Histiocítico

Linfoma Maligno, não-Classificado

Bennett *et al.* em 1974 (Tabela 2.5) descreveram outro sistema de classificação para os LNH, conhecido por “classificação Britânica” (“British National Lymphoma Classification”). Neste sistema de classificação os LNH foram especificados de acordo com a morfologia citológica das células linfóides neoplásicas.

Tabela 2.5 – Classificação Britânica dos linfomas não-Hodgkin (Bennett *et al.*, 1974)

Linfoma Folicular
1. Linfoma de células do folículo, predominantemente células pequenas
2. Linfoma de células do folículo, células grandes e pequenas
3. Linfoma de células do folículo, predominantemente células grandes
Linfoma Difuso
1. Linfoma linfocítico, bem diferenciado (linfócitos pequenos e redondos)
2. Linfoma linfocítico, diferenciação intermediária (linfócitos pequenos do folículo)
3. Linfoma difuso linfocítico, pouco diferenciado (linfoblástico)
SUBTIPOS:
3.1. Não-Burkitt
3.2. Tumor de Burkitt
3.3. Linfoma de células convolutas mediastinal
4. Linfoma linfocítico/ grandes e pequenas células (células mistas do folículo)
5. Linfoma de grandes células indiferenciado (célula linfóide grande)
6. Linfoma de células histiocíticas (célula fagocítica mononuclear)
7. Plasmocitoma (Plasmocitoma extramedular)
8. Linfoma maligno, não-classificado
9. Linfoma difuso, com diferenciação plasmocitóide
10. Linfoma difuso, com intensa esclerose
11. Linfoma difuso, com discreta esclerose

Também em 1974, Dorfman (Tabela 2.6) realizou uma classificação morfológica dos LNH a partir de dois grupos principais: LNH folicular ou LNH difuso, e as entidades são discriminadas dentro destes dois grandes grupos. Segundo este autor esta classificação elimina a controvérsia de terminologia, introduz novas designações de acordo com a capacidade funcional dos componentes celulares e propõe termos que seriam bem aceitos por patologistas (Dorfman, 1974).

Tabela 2.6 - Classificação dos linfomas não-Hodgkin de Dorfman-1974 (Dorfman, 1974)

Linfoma Folicular

1. Linfoma linfóide de pequenas células
2. Linfoma linfóide de grandes e pequenas células
3. Linfoma linfóide de grandes células

Linfoma Difuso

1. Linfoma linfocítico, com diferenciação plasmocitóide
 2. Linfoma linfocítico, sem diferenciação plasmocitóide
 3. Linfoma linfóide de células atípicas
 4. Linfoma linfoblástico, convoluto
 5. Linfoma linfoblástico, não-convoluto
 6. Linfoma linfóide de grandes células, com diferenciação plasmocítica
 7. Linfoma linfóide de grandes células, sem diferenciação plasmocítica
 8. Linfoma linfóide de grandes e pequenas células
 9. Linfoma histiocítico
 10. Linfoma de Burkitt
 11. Linfoma linfo-epitelióide celular (Linfoma de Lennert)
 12. Micose fungóide
 13. Linfoma indiferenciado
 14. Linfoma associado à esclerose
 15. Linfoma maligno, não-classificado
 16. Linfoma composto
-

Lennert em 1975 (Lennert, 1975a; Lennert *et al.*, 1975b) mantendo os aspectos de morfologia celular dos linfócitos e baseando-se em conceitos imunológicos propôs o sistema de classificação dos LNH, que recebeu a denominação de “classificação de Kiel” (Tabela 2.7). Neste sistema os LNH foram divididos em dois grandes grupos: 1) linfomas de baixo grau de malignidade e 2) de alto grau de malignidade. Dentro destes dois grandes grupos as entidades foram separadas de acordo com as características morfológicas.

Tabela 2.7 - Classificação dos linfomas não-Hodgkin de Kiel (Lennert, 1975a; Lennert *et al.*, 1975b)

Linfoma Maligno de Baixo Grau de Malignidade
1. Linfoma linfocítico/leucemia linfocítica crônica
2. Linfoma linfoplasmocitóide
3. Linfoma centrocítico
4. Linfoma folicular centrocítico-centroblasto, com esclerose
5. Linfoma folicular centrocítico-centroblasto, sem esclerose
6. Linfoma difuso e folicular centrocítico-centroblasto, com esclerose
7. Linfoma difuso e folicular centrocítico-centroblasto, sem esclerose
8. Linfoma difuso centrocítico-centroblasto
9. Linfoma maligno de baixo grau, não-classificado
Linfoma Maligno de Alto Grau de Malignidade
1. Linfoma centroblástico
2. Linfoma linfoblástico, tipo Burkitt
3. Linfoma linfoblástico, tipo célula convoluta
4. Linfoma linfoblástico, outros (não-classificado)
5. Linfoma imunoblástico
6. Linfoma maligno de alto grau, não-classificado
Linfoma Maligno, não-Classificado (Impossibilitado de especificar baixo ou alto grau de malignidade)
Linfoma Composto

A OMS propôs, em 1976, uma classificação onde os LNH recebem a denominação de linfossarcomas e são subdivididos de acordo com os aspectos morfológicos. Nesta classificação a natureza precisa das células neoplásicas não é bem estabelecida em todas as entidades descritas (Mathe *et al.*, 1976) (Tabela 2.8).

Tabela 2.8 - Classificação dos linfomas não-Hodgkin da OMS-1976 (Mathe *et al.*, 1976)

Linfossarcoma Nodular
1. Linfossarcoma nodular, prolinfocítico
2. Linfossarcoma nodular, linfoblástico-prolinfocítico
Linfossarcoma Difuso
1. Linfossarcoma difuso, linfocítico
2. Linfossarcoma difuso, linfoplasmocítico
3. Linfossarcoma difuso, prolinfocítico
4. Linfossarcoma difuso, linfoblástico-prolinfocítico
5. Linfossarcoma difuso, linfoblástico
6. Linfossarcoma difuso, imunoblástico
7. Linfossarcoma difuso, tumor de Burkitt
8. Micose fungóide
9. Plasmocitoma
10. Reticulossarcoma
11. Linfoma maligno, não-classificado
12. Linfoma composto

Na tentativa de esclarecer as confusões e controvérsias criadas pelos sistemas de classificação para as neoplasias do tecido linfóide, o Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos da América (“National Cancer Institute of the United State of American”), em 1982, realizou um estudo clínico-patológico internacional, com 1175 casos de LNH (Non-Hodgkin’s Lymphoma Pathologic Classification Project, 1982). Avaliou a aplicabilidade e relevância clínica dos seis maiores sistemas de classificação de LNH até então propostos. Imunofenotipagem não foi utilizada neste estudo. Foi concluído que cada sistema é capaz de separar um grande número de pacientes de acordo com a razão de sobrevida e com as características clínicas. Além disto, este estudo demonstrou que nenhum dos sistemas é superior a qualquer outro. Com o estudo do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América foi desenvolvido o sistema de classificação “Working Formulation” (Tabela 2.9) para os LNH, que é uma proposta diferente e não um novo sistema de classificação. A “Working Formulation” permite transladar entre os vários sistemas de classificação dos LNH existentes, facilitando comparações clínicas de casos e de prova terapêutica. A “Working Formulation” não identifica os LNH como entidades patológicas distintas, uma vez que a terminologia utilizada descreve as características morfológicas da neoplasia dentro de três graus de malignidade (baixo grau, grau intermediário e alto grau) (Non-Hodgkin’s Lymphoma Pathologic Classification Project, 1982).

Tabela 2.9 - Classificação dos linfomas não-Hodgkin da “Working Formulation”-1982 (Non-Hodgkin’s Lymphoma Pathologic Classification Project, 1982)

Baixo Grau

1. Linfoma maligno linfocítico
 - Consistente com leucemia linfocítica crônica
 - Plasmocitóide
2. Linfoma maligno folicular predominantemente de células pequenas clivadas
 - Áreas difusas
 - Esclerose
3. Linfoma maligno folicular de grandes células e pequenas células clivadas
 - Áreas difusas
 - Esclerose

Grau Intermediário

1. Linfoma maligno folicular predominantemente de células grandes
 - Áreas difusas
 - Esclerose
2. Linfoma maligno difuso de pequenas células clivadas
 - Esclerose
3. Linfoma maligno difuso de grandes e pequenas células
 - Esclerose
 - Componente de células epitelióides
4. Linfoma maligno difuso de grandes células
 - Células clivadas
 - Células não-clivadas
 - Esclerose

Alto Grau

1. Linfoma maligno imunoblástico de grandes células
 - Plasmocitóide
 - Células claras
 - Polimorfo
 - Componente de células epitelióides
2. Linfoma maligno linfoblástico
 - Células convolutas
 - Células não-convolutas
3. Linfoma maligno de pequenas células não-clivadas
 - Burkitt
 - Áreas foliculares

Micelâneas

1. Linfoma composto
 2. Micose fungóide
 3. Linfoma histiocítico
 4. Plasmocitoma extramedular
 5. Linfoma não-classificado
 6. Outros
-

Frente aos sistemas de classificação dos LNH existentes o Grupo Internacional de Estudos de Linfomas (“International Lymphoma Study Group”) propôs uma outra classificação das neoplasias do tecido linfóide, denominada de R.E.A.L. (“Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasm”) (Harris *et al.*, 1994) (Tabela 2.10). A R.E.A.L.-1994

identifica três grandes grupos de neoplasias do tecido linfóide: 1) neoplasias de células linfóides B, 2) neoplasias de células linfóides T e NK e 3) linfoma de Hodgkin (LH). Dentro destes três grupos, outras três categorias são propostas: 1) neoplasias definitivas, 2) neoplasias provisórias e 3) neoplasias não-classificadas. Dentro dos três grupos gerais as neoplasias foram categorizadas e individualizadas, utilizando-se para isto uma combinação de características de morfologia celular, imunofenotipagem, genéticas e clínicas. Também, nesta ocasião foi proposta a definitiva nomenclatura de (LH), em substituição à DH, uma vez que neste momento foi de conhecimento que a DH é uma proliferação monoclonal de células linfóides B, sendo portanto qualificada como linfoma (Harris *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 2000a; Harris *et al.*, 2000b).

Tabela 2. 10 - Classificação das neoplasias do tecido linfóide da R.E.A.L.-1994 (Harris *et al.*, 1994)

Neoplasias de Células Linfóides B

1 – Neoplasias de Células Linfóides B Precursoras

- 1.1. Linfoma/Leucemia linfoblástico (a) de precursor B

2 – Neoplasias de Células Linfóides B Periféricas

2. 1. Leucemia linfocítica crônica de células B/Leucemia prolinfocítica/Linfoma linfocítico
2. 2. Linfoma linfoplasmocítico/Imunocitoma
2. 3. Linfoma de células do manto
2. 4. Linfoma de células do centro folicular, folicular
Graus citológicos provisórios: Grau I (pequenas células), Grau II (pequenas e grandes células) e Grau III (grandes células)
Subtipo provisório: Difuso, predominantemente de pequenas células
2. 5. Linfoma de células B da zona marginal
Extranodal (tipo MALT com ou sem células B monocitóides)
Subtipo provisório: Nodal (com ou sem células B monocitóides)
2. 6. Entidade provisória: Linfoma esplênico da zona marginal (com ou sem linfócitos vilosos)
2. 7. Tricoleucemia
2. 8. Mieloma plasmocítico/plasmocitoma
2. 9. Linfoma difuso de grandes células B*
Subtipo: Linfoma primário mediastinal (tímico) de células B
2. 10. Linfoma de Burkitt
2. 11. Entidade provisória: Linfoma de alto grau de células B, semelhante ao Burkitt

Neoplasias de Células Linfóides T e NK

1 – Neoplasias de Células Linfóides T Precursoras

1. 1. Linfoma/Leucemia linfoblástico (a) de precursor T

2 – Neoplasias de Células Linfóides T e NK Periféricas

1. 1. Leucemia linfocítica crônica de células T/leucemia prolinfocítica
1. 2. Leucemia linfocítica de grandes células granulares
Tipo célula T
Tipo célula NK
1. 3. Micose fungóide/Síndrome de Sézary
1. 4. Linfoma de células T periféricas, não-especificado*
Categorias citológicas provisórias: Células de tamanho médio, células de tamanho médio e grandes células, grandes células e célula linfo-epitelióide
Subtipos provisórios:
Linfoma de células T $\gamma\delta$ hepato-esplênico
Linfoma de células T subcutâneo paniculítico
1. 5. Linfoma de células T angioimunoblástico
1. 6. Linfoma angiocêntrico
1. 7. Linfoma de células T intestinal (com ou sem enteropatia)
1. 8. Linfoma/Leucemia de células T do adulto
1. 9. Linfoma anaplásico de grandes células
Tipos: CD30+, célula T ou “null” célula
1. 10. Entidade provisória: Linfoma anaplásico de grandes células, semelhante ao Hodgkin

Linfoma de Hodgkin

1. Linfoma de Hodgkin, predominância linfocítica
2. Linfoma de Hodgkin, esclerose nodular
3. Linfoma de Hodgkin, celularidade mista
4. Linfoma de Hodgkin, depleção linfocítica
5. Entidade provisória: Linfoma de Hodgkin clássico, rico em linfócitos
-

* Estas categorias têm a possibilidade de apresentar mais que uma entidade patológica

A partir de 1995, a Associação Européia de Hematopatologia (“European Association for Haematopathology”) e a Sociedade Americana de Hematopatologia (“American Society for Haematopathology”) começaram a desenvolver uma classificação dos tumores dos tecidos linfóide e hematopoético para a OMS. Para isto, foram criados dez comitês de patologistas que desenvolveram listas e definições das entidades, e em novembro de 1997 houve um encontro na Virginia (Airlie House, Warrenton, USA) para se discutir e relatar esta classificação (Harris *et al.*, 2000a; Harris *et al.*, 2000b). Para a classificação dos tumores dos tecidos linfóide e hematopoético, a OMS adotou os princípios definidos na classificação da R.E.A.L.-1994.

A classificação da OMS dos tumores dos tecidos linfóide e hematopoético foi publicada em 2001 e subdivide as neoplasias de acordo com a linhagem celular: mielóide, linfóide, histiocítica e células dendríticas, e mastocítica; e dentro de cada categoria as entidades são definidas de acordo com a combinação de aspectos clínicos, morfológicos, imunofenotípicos e genéticos. Para cada tipo histológico das neoplasias, a célula de origem é postulada. A classificação da OMS-2001 referente às neoplasias do tecido linfóide encontra-se na tabela 2.11 (Jaffe *et al.*, 2001).

Na classificação da OMS-2001 são reconhecidos três grandes grupos de neoplasias do tecido linfóide: neoplasias de células linfóides B, neoplasias de células linfóides T e NK e LH. Linfomas e leucemias são incluídos nesta classificação, uma vez que as fases sólida e circulante da neoplasia são presentes em muitos casos. Para as neoplasias do tecido

linfóide a célula de origem representa o estágio de diferenciação das células linfóides. Dentro do grupo de neoplasias de células linfóides B ou T e NK, duas grandes categorias são reconhecidas: neoplasias precursoras, que correspondem ao estágio inicial de diferenciação das células linfóides; e as neoplasias maduras ou periféricas, que correspondem ao estágio de diferenciação mais avançado das células linfóides (Jaffe *et al.*, 2001).

Tabela 2.11 - Classificação das neoplasias do tecido linfóide da OMS-2001
(Jaffe *et al.*, 2001)

Neoplasias de Células Linfóides B

1 – Neoplasias de Células Linfóides B Precursoras

- 1.1. Linfoma/Leucemia linfoblástico (a) de precursor B

2 – Neoplasias de Células Linfóides B Maduras

2. 1. Leucemia linfocítica crônica/Linfoma linfocítico
 2. 2. Leucemia prolinfocítica de células B
 2. 3. Linfoma linfoplasmocítico
 2. 4. Linfoma esplênico da zona marginal
 2. 5. Tricoleucemia
 2. 6. Mieloma plasmocítico
 2. 7. Plasmocitoma solitário do osso
 2. 8. Plasmocitoma extra-ósseo
 2. 9. Linfoma de células B da zona marginal extranodal do tecido linfóide associado à mucosa (Linfoma MALT)
 2. 10. Linfoma de células B da zona marginal nodal
 2. 11. Linfoma folicular
 2. 12. Linfoma de células do manto
 2. 13. Linfoma difuso de grandes células B
 2. 14. Linfoma mediastinal (tímico) de grandes células B
 2. 15. Linfoma intravascular de grandes células B
 2. 16. Linfoma primário de efusões
 2. 17. Linfoma/Leucemia de Burkitt

3. Proliferações de Células Linfóides B de Potencial Maligno Incerto

3. 1. Granulomatose linfomatóide
 3. 2. Doença linfoproliferativa pós-transplante polimórfica

Neoplasias de Células Linfóides T e NK

1 – Neoplasias de Células Linfóides T Precursoras

1. 1. Linfoma/Leucemia linfoblástico (a) de precursor T
 1. 2. Linfoma de células NK blásticas

2 – Neoplasias de Células Linfóides T e NK Maduras

2. 1. Leucemia prolinfocítica de células T
 2. 2. Leucemia linfocítica de grandes células T granulares
 2. 3. Leucemia de células NK agressiva
 2. 4. Linfoma/Leucemia de células T do adulto
 2. 5. Linfoma de células NK/T extranodal, tipo nasal
 2. 6. Linfoma de células T enteropático
 2. 7. Linfoma de células T hepato-esplênico
 2. 8. Linfoma de células T subcutâneo paniculítico
 2. 9. Micose fungóide
 2. 10. Síndrome de Sézary
 2. 11. Linfoma cutâneo primário de grandes células anaplásicas
 2. 12. Linfoma de células T periféricas, não-especificado
 2. 13. Linfoma de células T angioimunoblástico
 2. 14. Linfoma anaplásico de grandes células

3. Proliferação de Células Linfóides T de Potencial Maligno Incerto

3. 1. Papulose linfomatóide

Linfoma de Hodgkin

1. Linfoma de Hodgkin, predominância linfocítica nodular
 2. Linfoma de Hodgkin clássico
 Linfoma de Hodgkin clássico, esclerose nodular
 Linfoma de Hodgkin clássico, rico em linfócitos
 Linfoma de Hodgkin clássico, celularidade mista
 Linfoma de Hodgkin clássico, depleção linfocítica
-

2.4 Linfomas da Região de Cabeça e Pescoço

Os linfomas na região de cabeça e pescoço são encontrados nos linfonodos regionais e/ou em locais extranodais, principalmente onde existe a presença do tecido linfóide não-encapsulado e não-organizado, as áreas de MALT, que se estendem desde a boca até a região anal. Na boca, o MALT é representado pelo anel de Waldeyer, que compreende as tonsilas palatinas, as faríngeas e as linguais. Ainda, o MALT de boca compreende agregados de tecido linfóide associados aos ductos das glândulas salivares maiores e menores (Freeman *et al.*, 1972; Roitt *et al.*, 1999).

Os linfomas de boca são incomuns, representando em torno de 5% de todas as neoplasias malignas de boca (Aozasa *et al.*, 1985). Os linfomas de boca representam cerca de 2% de todos os LNH (Freeman *et al.*, 1972).

Os linfomas de boca podem localizar em tecidos moles, como nos ossos maxilares. Do total de 1.467 casos de LNH avaliados por Freeman *et al.* (1972), 417 casos (28%) foram localizados na região de cabeça e pescoço, e os sítios foram: tonsilas (32%), glândulas salivares (16,5%), boca (9,5%), nasofaringe (8,8%), tireóide (8,6%) e nariz (7,9%). Wong *et al.* (1975) descreveram 128 casos de LNH da região de cabeça e pescoço, dos quais 83 casos localizaram-se no anel de Waldeyer, 12 casos nos seios paranasais e 11 casos eram na gengiva, assoalho da boca e mucosa jugal.

Eisenbud *et al.* (1983) avaliaram 31 casos de linfomas de boca e verificaram localização intra-óssea em 48,3%, sendo dez casos em maxila e cinco em mandíbula. Dezesesseis casos (51,7%) localizaram em tecido mole,

sendo palato (10), fossa tonsilar (3), língua (1), região retromolar (1), assoalho bucal (1) e mucosa bucal (1).

Slootweg *et al.* (1985) avaliaram as características clínico-patológicas de 20 casos de linfomas de boca e observaram localização intra-óssea na maxila (12), intra-óssea na mandíbula (2), palato (2), assoalho da boca (2) e tecido mole peri-mandibular (2). Em dois casos de tecido mole houve erosão da cortical óssea.

Howell *et al.* (1987) estudaram as características clínicas e a classificação de Lukes & Collins-1974 de 34 casos de linfomas de boca. Observaram localização em tecido mole (65%) e intra-óssea (35%) dos diferentes tipos histológicos. As localizações mais comuns foram a gengiva (35%), seguida de intra-óssea na mandíbula (24%), palato (20%) e intra-óssea na maxila (12%).

Em uma análise das características clínico-patológicas de 20 casos de linfomas de boca, Fukuda *et al.* (1987) verificaram uma maior frequência de localização na gengiva (11), seguida intra-ósseo na mandíbula (3), assoalho bucal (3), mucosa bucal (2) e lábio (1).

Yin *et al.* (2000) avaliaram as características clínico-patológicas de 34 casos de linfomas de boca e verificaram que 17 casos foram localizados na região de gengiva e rebordo alveolar da maxila; seis casos na região de gengiva e rebordo alveolar da mandíbula, e mucosa jugal; nove casos em palato; um caso em região de gengiva e rebordo alveolar e palato; e um caso em lábio. Estes autores também fizeram descrição de 26 casos de linfomas não-Hodgkin da região maxilofacial com localização em linfonodos

cervicais (10), linfonodos submandibulares (12), linfonodos cervicais e submandibulares (2), linfonodos cervicais e submentonianos (1) e linfonodos submentonianos (1).

Os linfomas de boca podem estar presentes em pacientes do sexo masculino e feminino com igual proporção (Slootweg *et al.*, 1985; Howell *et al.*, 1987). Alguns estudos mostram uma maior prevalência no sexo masculino (Fukuda *et al.*, 1987; Nocini *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2000), enquanto outros no sexo feminino (Freeman *et al.*, 1972; Eisenbud *et al.*, 1983).

Os pacientes com linfomas de boca possuem um grande espectro de idade, sendo que a maioria dos casos é diagnosticada em pacientes da 4ª a 8ª décadas de vida. A idade média é dos 50 aos 60 anos (Slootweg *et al.*, 1985; Fukuda *et al.*, 1987; Howell, *et al.*, 1987; Nocini *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2000).

Com relação à idade dos pacientes com linfomas de boca, exceção é feita para os casos de linfoma de Burkitt (LB), que é mais freqüente em crianças e pacientes jovens (Shapira & Peylan-Ramu, 1998; Anavi *et al.*, 1990). O LB foi descrito em 1958 pelo cirurgião inglês Denis Burkitt (Burkitt, 1958) e atualmente representa um subgrupo de LNH com características epidemiológicas, clínicas, morfológicas, imunológicas e moleculares distintas.

Existem três variantes clínicas do LB. O LB endêmico ocorre na África equatorial, em Papua-Nova Guiné (Nova Guiné) e região nordeste do Brasil, representando a principal neoplasia maligna de crianças nestas regiões, com

pico de incidência de quatro a sete anos de idade e predominância no sexo masculino (sexo masculino:feminino 2:1). Nas regiões endêmicas existe uma correlação entre a distribuição geográfica do LB e fatores climáticos, como a altitude e precipitação pluvial, que correspondem à distribuição geográfica da malária endêmica. O LB esporádico é encontrado em crianças e pacientes jovens de outras regiões do mundo e tem uma baixa incidência, cerca de 1 a 2% de todos os linfomas da Europa e Estados Unidos da América. O LB associado à imunodeficiência é observado freqüentemente em pacientes com a infecção HIV (“Human Immunodeficiency Virus”), podendo ser uma das manifestações iniciais da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida – AIDS (“Acquired Immunodeficiency Syndrome”) (Magrath, 1991; Sandlund *et al.*, 1996; Sandlund *et al.*, 1997; Shapira & Peylan-Ramu, 1998).

Epstein *et al.* (1964) demonstraram a presença de herpes vírus em cultura de células derivadas do LB, e este vírus recebeu a designação de EBV. A freqüência de correlação entre o EBV e LB varia grandemente de acordo com as regiões do mundo e com as variantes clínicas (Philip *et al.*, 1982; Levine *et al.*, 1982; Lenoir *et al.*, 1985; Patton *et al.*, 1990; Prevot *et al.*, 1992; Hamilton-Dutoit *et al.*, 1993; Anwar *et al.*, 1995; Araújo *et al.*, 1996; Tao *et al.*, 1998; Mackenzie *et al.* 1999).

Além da associação com o LB, o EBV é o agente causador da mononucleose infecciosa, sendo também relacionado à leucoplasia pilosa, à outros tipos histológicos de linfomas associados à infecção HIV, ao carcinoma nasofaríngeo indiferenciado, ao LH, à alguns linfomas de células linfóides T, ao carcinoma indiferenciado de glândula salivar e à alguns

carcinomas gástricos (Wu *et al.*, 1991; Hamilton-Dutoit & Pallesen, 1994; Cruchley *et al.*, 1997; Raab-Traub & Webster-Cyriaque, 1997; Abreu *et al.*, 1997).

A principal forma de apresentação dos linfomas de boca é o aumento de volume da região, acompanhado por sintomatologia dolorosa, parestesia ou anestesia da região (Slootweg *et al.*, 1985; Fukuda *et al.*, 1987; Howell *et al.*, 1987).

No estudo de Slootweg *et al.* (1985), onde se avaliaram 20 casos de linfomas de boca, foi verificada ulceração da mucosa bucal em três casos e parestesia, em função da invasão neural pela neoplasia, em quatro casos.

Howell *et al.* (1987) verificaram sintomatologia dolorosa, parestesia, ou anestesia em 35% dos 34 casos de linfomas de boca. Além disto, verificaram ulceração ou coloração vermelha da mucosa em 27% das neoplasias localizadas no tecido mole.

Os linfomas de boca, quando são intra-ósseo, apresentam-se como área radiotransparente irregular associada à reabsorção do tecido ósseo alveolar e à perda da lâmina dura (Slootweg *et al.*, 1985; Howell *et al.*, 1987; Nocini *et al.*, 2000). Os sinais e sintomas são de curta duração, com a maioria dos pacientes relatando um aparecimento súbito e progressão rápida da lesão (Eisenbud *et al.*, 1983).

Na descrição histopatológica das neoplasias do tecido linfóide, geralmente dois padrões morfológicos são reconhecidos: 1) padrão folicular (linfomas foliculares) onde as células neoplásicas se dispõem em arranjo folicular à semelhança dos folículos linfóides; e 2) padrão difuso (linfomas

difusos) no qual as células neoplásicas têm uma distribuição uniforme (Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project, 1982; Harris *et al.*, 1994; Jaffe *et al.*, 2001). Nos linfomas de boca o padrão é exclusivamente difuso, e a designação individual destas neoplasias reflete os vários sistemas de classificações existentes na literatura (Eisenbud *et al.*, 1983).

Eisenbud *et al.* (1983) na revisão de 31 casos de linfomas de boca utilizando o sistema de classificação de Rappaport-1966, verificaram 11 casos de linfoma linfocítico pouco diferenciado, nove casos de linfoma histiocítico, cinco casos de linfoma histiocítico-linfocítico misto, quatro casos de linfoma de Burkitt, um caso de linfoma linfocítico bem diferenciado e um caso de linfoma linfoblástico.

Slootweg *et al.* (1985) avaliaram 20 casos de linfomas de boca e utilizaram as classificações de Rappaport-1966 e a "Working Formulation"-1982. Três casos foram classificados como linfoma de baixo grau (linfoma folicular de pequenas células clivadas-2; linfoma folicular de grandes e pequenas células-1); 14 casos como linfoma de grau intermediário (linfoma difuso de grandes células-9; linfoma difuso de grandes e pequenas células-3; linfoma difuso de pequenas células clivadas-2) e três casos de linfoma de alto grau (linfoma de grandes células imunoblástico-2; linfoma de pequenas células não-clivadas-1).

Fukuda *et al.* (1987) em estudo clínico-patológico de 20 casos de linfomas de boca utilizaram o sistema de classificação da "Working Formulation"-1982 e verificaram três casos de linfoma linfocítico, um caso de linfoma difuso de células clivadas pequenas, sete casos de linfoma difuso de

grandes células, três casos de linfoma imunoblástico de grandes células, um caso de linfoma linfoblástico e cinco casos de linfomas não-classificados.

Howell *et al.* (1987) utilizaram a classificação de Lukes-Collins-1974 na avaliação de 34 casos de linfomas de boca e observaram 33 casos categorizados como neoplasias de células linfóides B. Estes incluíram dois casos de linfoma de células do centro folicular clivadas pequenas, três casos de linfoma de células do centro folicular clivadas grandes, nove casos de linfoma de células do centro folicular não-clivadas pequenas, oito casos de linfoma de células do centro folicular não-clivadas grandes, quatro casos de sarcoma imunoblástico, seis casos de mieloma plasmocítico e plasmocitomas e um caso de linfoma linfocítico. O caso de linfoma de células não-B representou um linfoma histiocítico.

A aplicação da imuno-histoquímica, utilizando-se anticorpos monoclonais ou policlonais, para a identificação de populações celulares distintas, é de grande auxílio no diagnóstico e classificação de várias patologias (Harris *et al.*, 1994; Araújo *et al.*, 2000; Jaffe *et al.*, 2001).

Nas neoplasias do tecido linfóide a utilização da imuno-histoquímica ajuda na classificação, principalmente na identificação da origem de células linfóides B, T ou NK. Nos dois últimos sistemas de classificação, R.E.A.L.-1994 e OMS-2001, é preconizada a utilização dos aspectos morfológicos em associação a ensaios de imuno-histoquímica e de outros, para classificar e definir os subtipos das neoplasias (Harris *et al.*, 1994; Jaffe *et al.*, 2001).

Handles & Howell (1986) utilizaram o sistema de classificação de Lukes & Collins-1974 e imuno-histoquímica para imunoglobulinas de cadeia

pesada (IgG, IgM, IgA e IgD), e cadeia leve kappa (κ) e lambda (λ) e muramidase na avaliação de 34 casos de linfomas de boca. Verificaram 33 casos de neoplasias de células linfóides B e um caso linfoma histiocítico. Dos 33 casos de linfomas de células linfóides B, 13 casos (39%) foram positivos para imunoglobulina citoplasmática. Além disto, a avaliação imuno-histoquímica foi útil para distinguir entre lesões inflamatórias e neoplásicas do tecido linfóide.

Pinto Jr. (1989) utilizou a classificação de Kiel-1975 e imuno-histoquímica para CD45, κ , λ , IgG, IgM, IgA, proteína S100, lisozima, pan T e pan B na avaliação de 17 casos de linfomas de boca. Verificou a utilidade da imuno-histoquímica no estudo destas doenças de boca, a possibilidade de separar neoplasias de células pequenas e redondas de origem não-linfocitária dos linfomas, que a presença de lesões policlonais não exclui o diagnóstico de linfoma de boca uma vez que é comum a presença de infiltrado inflamatório satélite em lesões bucais, a existência marcante de neoplasias de células linfóides B com grande variedade de subtipos e a presença em todos os casos de células dendríticas e/ou interdigitantes revelada.

Nocini *et al.* (2000) avaliaram dez casos de linfomas primários dos ossos maxilares utilizando imuno-histoquímica e a classificação "Working Formulation"-1982. Estes autores verificaram oito casos de linfoma maligno difuso de alto grau tipo centroblástico e dois casos de linfoma maligno difuso de alto grau tipo imunoblástico. Na imuno-histoquímica observaram células neoplásicas de oito casos positivas para CD45RB e CD20. Os autores

concluem que a imuno-histoquímica representa uma técnica laboratorial importante no diagnóstico e caracterização dos linfomas.

Yin *et al.* (2000) utilizaram o sistema de classificação da R.E.A.L.-1994 para avaliar 34 casos de linfomas de boca e 26 casos de LNH nodal da região maxilofacial. Utilizaram os anticorpos CD20, CD79a, CD45RO, CD43, CD3 e CD56. Entre os linfomas de boca foram observados 25 casos de linfoma difuso de grandes células B, um caso de linfoma linfoplasmocítico, um caso de linfoma linfocítico, três casos de linfoma de células T periféricas, não-especificado e quatro casos de linfoma de células NK/T angiocêntrico. Nos LNH nodais da região maxilofacial foram observados 16 casos de linfoma difuso de grandes células B, um caso de linfoma de células B de alto grau, semelhante ao Burkitt, cinco casos de linfoma folicular e quatro casos de linfoma de células T periféricas, não-especificado. Os autores sugerem diferenças para as duas categorias de linfomas avaliadas em relação às características clínico-patológicas, alta incidência do padrão de crescimento difuso, alta relação de T/B e prognóstico ruim nos linfomas de boca.

Tsang *et al.* (2000) descreveram as características clínico-patológicas e imuno-histoquímica de três casos de linfoma de células NK/T extranodal, tipo nasal, localizados no palato. Os três casos foram positivos para CD56 e dois casos foram EBV positivos demonstrado pela técnica de hibridização “in situ” (ISH-“in situ hybridization”).

2.5 Doenças Linfoproliferativas Associadas à Imunodeficiência

Linfomas e outras doenças linfoproliferativas apresentam uma prevalência aumentada em pacientes com imunodeficiência primária ou secundária. Estas incluem: 1) síndromes de imunodeficiência primária ou outras doenças imunes primárias; 2) infecção HIV; 3) imunossupressão iatrogênica em pacientes que receberam transplante de órgãos ou de medula óssea e 4) imunossupressão iatrogênica associada ao tratamento com metotrexato (Jaffe *et al.*, 2001).

A prevalência e tipos histológicos de linfomas ou doenças linfoproliferativas observados em pacientes com imunodeficiência primária ou secundária variam de acordo com cada situação, sendo que a maioria das entidades é similar a neoplasias de células linfóides B ou T e NK de pacientes imunocompetentes. As neoplasias do tecido linfóide associadas à infecção HIV e reconhecidas pela OMS-2001 estão relacionadas na tabela 2.12.

Tabela 2.12 - Neoplasias do tecido linfóide associadas à infecção HIV reconhecidas pela OMS-2001 (Jaffe *et al.*, 2001)

Neoplasias Linfóides que também ocorrem em Pacientes Imunocompetentes	
1. Linfoma de Burkitt	
	Clássico
	Com diferenciação plasmocitóide
	Atípico
2. Linfoma difuso de grandes células B	
	Centroblástico
	Imunoblástico
3. Linfoma de células B da zona marginal extranodal do tecido linfóide associado à mucosa (Linfoma MALT) (raro)	
4. Linfoma de células T periféricas, não-especificado (raro)	
5. Linfoma de Hodgkin clássico	
Neoplasias Linfóides que ocorrem mais especificamente em Pacientes HIV Positivos	
1. Linfoma primário de efusões	
2. Linfoma plasmoblástico de boca	
Neoplasias Linfóides que também ocorrem em outras Imunodeficiências	
1. Linfoma de células B polimórficas, semelhante à doença linfoproliferativa pós-transplante	

Os LNH representam a segunda neoplasia mais comum em pacientes com a infecção HIV, superados apenas pelo sarcoma de Kaposi. São encontrados em 3 a 10% de todos os pacientes. Os linfomas de boca representam cerca de 3 a 12% de todos os linfomas e a maioria são neoplasias de células linfóides B (Epstein & Silverman, 1992; Camilleri-Broet *et al.*, 1997; Raphael *et al.*, 1994; Carbone *et al.*, 1998; Carbone *et al.*, 2001).

Nestes pacientes, os linfomas são heterogêneos e incluem linfomas usualmente diagnosticados em pacientes imunocompetentes e aqueles mais especificamente de pacientes HIV positivos. Estas neoplasias exibem comportamento clínico agressivo, são neoplasias de alto grau e apresentam relação com o EBV, cuja detecção varia consideravelmente de acordo com a localização e tipo histológico (Green & Eversole, 1989; Langford *et al.*, 1991; Raphael *et al.*, 1994; Bacchi *et al.*, 1996).

Carbone *et al.* (1991) avaliaram as características clínico-patológicas, imuno-histoquímicas, bem como o rearranjo gênico das neoplasias do tecido linfóide em 45 pacientes HIV positivos. Dos 45 casos, 35 representaram LNH e dez LH. Para a classificação morfológica dos LNH utilizaram a “Working Formulation”-1982. Para a imuno-histoquímica utilizaram anticorpos associados à células linfóides B ou à células linfóides T e para o rearranjo gênico avaliaram o gene IgH (cromossomo 14q32) e o gene da cadeia- β do TCR. Entre os LNH, 28 pacientes eram homens e sete eram mulheres, com idade variando de 21 a 55 anos (média=29 anos). A distribuição da localização dos LNH foi: linfonodos (5), trato gastrointestinal (10), medula

óssea (7), fígado (6), baço (6), tecidos moles (4), rim (4), nasofaringe (3), pele (2), glândulas mamárias (2), pâncreas (2), osso (2), peritônio (2), adrenal (1), pulmão (1), útero (1), ovário (1), tonsila (1) e palato (1).

No estudo de Carbone *et al.* (1991), os 35 casos de LNH foram classificados como linfoma de células pequenas e clivadas (14), linfoma imunoblástico de grandes células (7), linfoma difuso de grandes células (4), linfoma folicular de grandes células (1), linfoma linfoblástico (1), linfoma anaplásico de grandes células (4), plasmocitoma (2), linfoma histiocítico (1) e linfoma não-classificado (1). Anticorpos associados à células linfóides B foram observados em 18 (78,2%) de 23 casos avaliados, sendo 11 casos de linfoma de células pequena e clivadas, três casos de linfoma imunoblástico de grandes células, um caso de linfoma folicular de grandes células, dois casos de linfoma anaplásico de grandes células e um caso de plasmocitoma. Anticorpos associados à células linfóides B e à células linfóides T foram observados em um caso de linfoma linfoblástico e em um caso de linfoma anaplásico de grandes células. CD30 e CD45 foram observados nos quatro casos de linfoma anaplásico de grandes células. Quatro casos (dois linfomas de células pequenas e clivadas, um linfoma anaplásico de grandes células, um linfoma difuso de grandes células) foram avaliados para o rearranjo gênico e demonstraram rearranjo do IgH. Os achados imuno-histoquímicos e genéticos mostraram que 20 de 24 casos de LNH associados à infecção HIV eram neoplasias de células linfóides B.

Raphael *et al.* (1994) avaliaram 36 casos de LNH de pacientes HIV positivos. Trinta e cinco casos eram presentes em pacientes masculinos, um

caso em paciente feminino, e a idade foi de 25 a 51 anos (média=36). A distribuição de localização era: linfonodos (20), tecidos moles (4), mucosa bucal (4), pele (3), trato gastrointestinal (2), medula óssea (2), tonsila (1), fígado (1) e pulmão (1). Para a classificação morfológica os autores utilizaram a classificação de Kiel-1975 e a "Working Formulation"-1982. Todos os casos foram diagnosticados como linfomas de alto grau (classificação de Kiel-1975) e mostraram um padrão difuso de crescimento. Vinte casos foram classificados como LB (classificação de Kiel-1975) ou linfoma de células pequenas não-clivadas ("Working Formulation"-1982), três foram classificados como linfoma centrolástico (classificação de Kiel-1975) ou linfoma de células grandes não-clivadas ("Working Formulation"-1982) e dez foram classificados como linfoma imunoblástico (classificação de Kiel-1975 e "Working Formulation"-1982). De acordo com as características morfológicas, três casos não puderam ser classificados e receberam o diagnóstico de linfoma de células B de alto grau, não-especificado. Células neoplásicas linfóides com diferenciação plasmocitóide foram verificadas em quatro casos de LB e em sete casos de linfoma imunoblástico.

No estudo de Raphael *et al.* (1994), em todos os casos, as células neoplásicas expressaram CD45 e um ou mais anticorpos associados à células linfóides B. A detecção do EBV, realizada por "Southern blot" ou por ISH em material parafinado com uma sonda complementar de ácido ribonucléico-RNA ("ribonucleic acid") EBER-1 ("EBV encoded small RNA), foi verificada em oito (50%) de 16 casos de LB, em um (33,3%) dos três casos de linfoma centrolástico, em nove (90%) dos dez casos de linfoma

imunoblástico e em um (33,3%) dos três casos de linfoma de células B de alto grau, não-especificado. Rearranjo gênico, utilizando-se da técnica de hibridização por “Southern blotting”, e avaliando o gene IgH, demonstrou padrão monoclonal em nove (100%) de nove casos avaliados de LB, em dois (100%) de dois casos avaliados de linfoma centroblástico, em três (60%) de cinco casos avaliados de linfoma imunoblástico e nos três casos de linfoma de células B de alto grau, não-especificado, dois casos (66,6%) demonstraram padrão monoclonal e um caso demonstrou padrão policlonal. Segundo os autores, os seus resultados podem ajudar a classificar os LNH associados à infecção HIV, assim como ajudar no conhecimento da patogênese destas doenças.

Davi *et al.* (1998) avaliaram 103 casos de LNH associados à infecção HIV, com finalidade de caracterizar o linfoma semelhante ao Burkitt. Todos os casos foram LNH de células linfóides B de acordo com a R.E.A.L-1994, e foram representados por 26 casos (25,3%) de linfoma difuso de grandes células B centroblástico, 25 (24,3%) de LB, 19 (18,4%) de linfoma semelhante ao Burkitt, 13 (12,6%) de linfoma difuso de grandes células B imunoblástico, nove (8,7%) de linfoma primário do cérebro, oito (7,8%) de doenças linfoproliferativas atípicas e três (3%) de linfoma primário de efusões. Foi analisado o perfil molecular dos casos através da monoclonalidade do gene IgH com hibridização por “Southern blotting” e a presença do EBV por “Southern blot” ou por ISH realizada em material parafinado com uma sonda complementar de RNA (EBER-1). Os autores observaram freqüências de monoclonalidade e de EBV diferentes em cada

tipo histológico estudado e, segundo os autores, o linfoma semelhante ao Burkitt representa uma entidade freqüente em pacientes HIV positivos devendo ser considerada como uma variante do LB.

Green & Eversole (1989) avaliaram nove casos de linfomas de boca associados à infecção HIV. Todos os pacientes eram do sexo masculino, com idade de 22 a 54 anos (média=38,1). A distribuição das lesões foi: palato (2), gengiva maxilar (2), gengiva mandibular (1), língua (1), mandíbula (1), região retromolar (1) e tonsila (1). Os casos foram classificados como linfoma de grandes células (2), sarcoma imunoblástico (2), LB (2) e LNH não-especificado (3). Nenhum dos casos demonstrou imunopositividade para CD45RO e cinco (55,5%) foram imunopositivos para CD20. Presença de EBV foi verificada por ISH com uma sonda biotinilada de ácido desoxirribonucleico-DNA ("deoxyribonucleic acid") e sete (77,7%) casos foram positivos. De acordo com os autores, os linfomas de boca associados à infecção HIV, semelhantes aos LNH extrabuciais nestes pacientes, são de células linfóides B e apresentam DNA do EBV.

Langford *et al.* (1991) avaliaram 465 pacientes com a infecção HIV e verificaram cinco (1%) com linfomas de boca. Todos pacientes eram do sexo masculino, com idade de 32 a 43 anos (média=37,6). As lesões eram localizadas em seio maxilar (2), rebordo alveolar da maxila (2) e mandíbula (1). Os dois pacientes com linfomas de seio maxilar apresentaram destruição óssea do assoalho e clinicamente foi observado aumento de volume na região, associado à mobilidade dental. Os outros três pacientes clinicamente apresentaram aumento de volume, ulcerado, assintomático e associado à

destruição de tecido ósseo adjacente. De acordo com a classificação de Kiel-1975, um caso foi diagnosticado como LB, um linfoma anaplásico de grandes células B, um linfoma imunoblástico-plasmoblástico, um linfoma centroblastico tipo polimorfo e um LNH de alto grau, não-especificado. Todos os casos foram imunopositivos para um ou mais anticorpos associados à células linfóides B, cadeia leve κ ou λ ou cadeia pesada de Ig (IgG ou IgM). Três (60%) casos foram imunopositivos para CD45, e todos os casos foram imunonegativos para anticorpos associados à células linfóides T e CD21.

Delecluse *et al.* (1997) avaliaram 16 pacientes HIV positivos com linfomas de boca. Quatorze pacientes eram do sexo masculino e dois do sexo feminino, com variação de idade de 31 a 75 anos (média=41,1). Os casos localizaram-se na gengiva (8), assoalho da boca (3), palato (3), região submandibular (1) e tonsila (1). Em um caso foi observada destruição da cortical óssea. Cinco pacientes tiveram lesões também no peritônio (1), estômago (1), medula óssea (1) e abdômen (2). Morfologicamente todos os casos apresentaram características do linfoma difuso de grandes células associadas à presença de células grandes com o núcleo oval a arredondado, levemente excêntrico, com pouca cromatina e nucléolo único, proeminente e localizado centralmente (diferenciação plasmocitóide). A imunofenotipagem do 16 casos foi heterogênea para os anticorpos CD45, CD20, CD79a, IgG, cadeia leve λ e κ , sendo todos (100%) imunopositivos para VS38c.

Ainda no estudo de Delecluse *et al.* (1997) nove casos apresentaram associação com o EBV, como demonstrado pela ISH utilizando a sonda

EBER-1. Em quatro casos foi verificada a presença, pela imuno-histoquímica, da proteína latente de membrana 1-LMP-1 ("latent membrane protein-1") do EBV, mas com índices de marcação baixos (0,1-5,0%). Monoclonalidade, utilizando-se da análise do gene IgH pela reação em cadeia da polimerase-PCR ("polymerase chain reaction"), foi verificada em três (100%) de três casos submetidos a esta análise. Os autores denominam esta categoria de linfomas de boca associada à infecção HIV de linfoma plasmoblástico de boca e sugerem que ele representa um novo e distinto subtipo de linfoma difuso de grandes células.

Jordan *et al.* (1997), avaliaram seis casos de linfomas de boca, associados à infecção HIV. Todos os pacientes eram do sexo masculino com idade de 36 a 62 anos (média=47 anos). Quanto à localização, as lesões eram observadas na gengiva (3), palato (1), túber (1) e dorso da língua (1). Clinicamente as lesões apresentaram-se como aumento de volume, com duração média de dois meses, e em um caso foi observada ulceração da mucosa. Os diagnósticos clínicos foram sarcoma de Kaposi (5) e infecção ou LNH (1). Todos os casos foram diagnosticados como neoplasias de células linfóides B e classificados como linfoma de células pequenas não-clivadas ou linfoma semelhante ao Burkitt (2), linfoma imunoblástico (2), linfoma de células pequenas não-clivadas, não-Burkitt (1) e linfoma difuso de grandes células (1). Três casos exibiram restrição de cadeia leve λ , três foram imunopositivos para CD20 e um exibiu concomitantemente o CD45. Segundo os autores os seus achados demonstram a apresentação clínica incomum dos LNH e, apesar de sua

raridade, devem ser considerados no diagnóstico de qualquer lesão bucal nos pacientes HIV positivos.

Porter *et al.* (1999) descrevem as características de um caso de linfoma plasmoblástico de boca associado à infecção HIV em um paciente masculino de 36 anos de idade. A lesão era localizada no rebordo alveolar da maxila esquerda e apresentou-se como um aumento de volume, ulcerado, sintomático, medindo 3 cm e associado à mobilidade dental, à exposição de tecido ósseo e ao velamento do seio maxilar. As células neoplásicas foram imunopositivas para VS38c, CD45, apresentaram restrição de cadeia leve κ e áreas focais de imunopositividade para IgM ou IgD. Pesquisa de EBV, por ISH, foi negativa.

2.6 Células Dendríticas

As células dendríticas, também conhecidas por células apresentadoras de antígeno, são células do tecido linfóide e constituem uma população heterogênea de leucócitos não-fagocitários, com função de apresentar antígenos. A maioria das células dendríticas deriva da medula óssea, embora seu progenitor hematopoético ainda permaneça indefinido. Acredita-se que elas têm capacidade de estimular a resposta imune através da indução da resposta imune realizada pelos linfócitos Ta1 e Ta2, e apresentado antígenos à células T ou B (Roitt *et al.*, 1999). Morfologicamente as células dendríticas apresentam um complexo de projeções citoplasmáticas dendríticas, um ou mais núcleos lobulados, citoplasma claro com organelas espaçadas e não apresentam enzimas

lisossomais em grande quantidade como as células fagocitárias. (Liu *et al.*, 1992; Jaffe, 1988).

As células dendríticas estão distribuídas por várias regiões do corpo e são encontradas em locais considerados estratégicos, como linfonodo, baço, timo, trato gastrointestinal, placenta, sangue, pulmões, fígado, pele e mucosas (Steimann, 1991). Em cada uma destas localizações as células dendríticas recebem denominações diferentes. Elas podem ser classificadas em dois grandes grupos: 1) células dendríticas associadas à células B e 2) células dendríticas associadas à células T, e subclassificadas basicamente de acordo com as suas localizações, conforme a tabela 2.13 (Tew, 1993).

Tabela 2.13 - Classificação das células dendríticas (Tew, 1993)

1. Células Dendríticas associadas à Células B
Células dendríticas foliculares
2. Células Dendríticas associadas à Células T
2. A. Células Dendríticas do Tecido não-Linfóide
Células de Langerhans
Células dendríticas do tecido conjuntivo
Células dendríticas de origem desconhecida
Células indeterminadas
Células de Langerhans da derme
Células "Granstein" em camundongos
2. B. Células Dendríticas nos fluídos circulatórios
Células veladas (leucócitos dendríticos)
2. C. Células Dendríticas do Tecido Linfóide
Células dendríticas interdigitantes

Além das células dendríticas estarem distribuídas em áreas específicas do organismo, existem aspectos morfológicos e marcadores imuno-histoquímicos que podem ser utilizados para identificá-las e separá-las (Jaffe, 1988; Roitt *et al.*, 1999).

As células de Langerhans são encontradas na pele ou epitélio de revestimento das mucosas e migram como células veladas através dos

vasos linfáticos aferentes para o paracórtex dos linfonodos, onde elas se tornam residentes como células dendríticas interdigitantes e interagem com os linfócitos T. Esta migração representa um mecanismo eficiente de transporte do antígeno da pele e mucosas para as células T (Roitt *et al.*, 1999; Jaffe *et al.*, 2001). As células de Langerhans apresentam o complexo de projeções citoplasmáticas dendríticas comum a todas as células dendríticas, um núcleo lobulado com cromatina dispersa e corpos típicos denominados de grânulos de Birbeck, que são considerados marcadores morfológicos ultra-estruturais específicos (Birbeck *et al.*, 1961). As células de Langerhans são imunopositivas para complexo de histocompatibilidade principal- MHC ("Major Histocompatibility Complex") classe II, CD4, proteína S100 e CD1a (Burkhardt *et al.*, 1992; Krenács *et al.*, 1993; Shinzato *et al.*, 1995; Fonseca *et al.*, 1998; Roitt *et al.*, 1999; Jaffe *et al.*, 2001).

As células dendríticas interdigitantes estão localizadas nas áreas interfoliculares e paracórtex, regiões denominadas de áreas dependentes de células T, nos folículos linfóides dos órgãos linfóides secundários e principalmente na medula tímica, onde são especialmente abundantes (Takahashi *et al.*, 1981; Roitt *et al.*, 1999). As células dendríticas interdigitantes são funcionalmente relacionadas à apresentação de antígenos aos linfócitos T e, no timo, possuem um papel importante na eliminação de células T que reagem contra antígenos próprios, processo conhecido como seleção negativa (Bjercke *et al.*, 1985; Fonseca *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 1998; Roitt *et al.*, 1999).

As células dendríticas interdigitantes caracterizam-se por exibir núcleo endentado ou irregular ou pregueado ou bizarro, com cromatina condensada, citoplasma elétron-luscente abundante com retículo endoplasmático e complexo de Golgi bem desenvolvidos e numerosas projeções citoplasmáticas interdigitantes que fazem com que as células dendríticas interdigitantes se interdigitem aos linfócitos T e às outras células dendríticas interdigitantes próximas. As células dendríticas interdigitantes não apresentam grânulos de Birbeck ou desmosomos (Turner *et al.*, 1984; Fonseca *et al.*, 1998).

As células dendríticas interdigitantes apresentam imunopositividade para MHC classe II e para proteína S100 (Jaffe, 1988; Krenács *et al.*, 1993; Shinzato *et al.*, 1995; Shamoto *et al.*, 1995; Fonseca *et al.*, 1998; Roitt *et al.*, 1999, Jaffe *et al.*, 2001).

As células dendríticas foliculares estão localizadas no córtex, região denominada de área dependente de células B, nos folículos linfóides dos órgãos linfóides secundários. As células dendríticas foliculares parecem não ter origem mielóide, sendo provavelmente originadas de células reticulares. As células dendríticas foliculares representam uma população de células não-migratórias que criam e mantêm uma rede tridimensional estável no folículo linfóide. Com a criação e manutenção desta rede: 1) as células dendríticas foliculares capturam e mantêm por longo tempo (anos) o complexo antígeno-anticorpo em organelas denominadas de icossomos, 2) apresentam antígenos aos linfócitos B, 3) participam da ativação dos linfócitos B e 4) regulam a morte programada (apoptose) dos linfócitos B

(Imai & Yamakawa, 1996; Imai *et al.*, 1998; Tew *et al.*, 1997; Roitt *et al.*, 1999).

As células dendríticas foliculares possuem um ou mais núcleos grandes alongados ou arredondados, com cromatina condensada e citoplasma abundante. Na ultra-estrutura as células dendríticas foliculares apresentam projeções citoplasmáticas que as ligam a outras células através de junções célula-célula (“labyrinth-like”) ou de junções semelhantes aos desmossomos. As células dendríticas foliculares apresentam diferenças ultra-estruturais de acordo com a localização nas zonas do folículo linfóide (zona do manto, zona externa, zona apical clara, zona basal clara e zona escura), o que reflete diferenças nas funções e estrutura tridimensional das células dendríticas foliculares em cada um destas zonas. As células dendríticas foliculares não apresentam grânulos de Birbeck (Imai & Yamakawa, 1996).

As células dendríticas foliculares expressam uma grande variedade de marcadores imuno-histoquímicos: 1) anticorpos associados à células dendríticas foliculares (R4/23 ou DCR-1 e Ki-M4), 2) marcadores do ciclo celular (ciclina E, ciclina B1 e histona H3), 3) proteínas ligadoras de Ca^{+2} (calmodulina, caldesmona, anexina II, anexina VI e proteína S100), 4) filamentos intermediários (α -actina, β -actina, vimentina e desmina), receptores de complemento (C3d, C3b e receptor de IgE), 5) moléculas de adesão e 6) receptores de citocinas. Assim como na ultra-estrutura, a expressão destes marcadores é variável e diferente de acordo com a

localização das células dendríticas foliculares nas zonas do folículo linfóide (Imai & Yamakawa, 1996).

Todas as células dendríticas são relacionadas à diversas alterações de natureza proliferativa, neoplásica e imuno-inflamatórias. As células de Langerhans estão relacionadas à histiocitose de células de Langerhans e ao sarcoma de células de Langerhans (de Graaf *et al.*, 1996; Jaffe *et al.*, 2001). As células dendríticas interdigitantes e células dendríticas foliculares são principalmente relacionadas ao sarcoma ou tumor de células dendríticas interdigitantes e ao sarcoma ou tumor de células dendríticas foliculares, respectivamente (Fonseca *et al.*, 1998; Araújo *et al.*, 1999; Jaffe *et al.*, 2001).

As células dendríticas, em especial as células dendríticas foliculares e células dendríticas interdigitantes, têm sido estudadas nos linfomas. Os linfomas, de padrão folicular ou difuso, apresentam uma variedade de padrões desde preservado até alterado da rede de células dendríticas foliculares. Em alguns linfomas existe uma relação funcional entre as células dendríticas foliculares e as células linfóides neoplásicas semelhantes àquela observada entre as células dendríticas foliculares e as células linfóides da área dependente de células B (Carbone *et al.*, 1985a; Carbone *et al.*, 1985b; Carbone *et al.*, 1986; Mori *et al.*, 1988).

Kornstein *et al.* (1986) avaliaram a proteína S100 a fim de verificar o padrão de imuno-expressão desta proteína em LNH (22) e LH (23). Ocasionalmente células dendríticas S100 positivas foram identificadas nos LNH e LH. As células dendríticas apresentaram-se dispersas pela neoplasia e citologicamente eram células não-neoplásicas com processo citoplasmático

fino e núcleo pequeno. A frequência e localização nodal das células dendríticas S100 positivas não foram diferentes nos LNH e LH.

Mori *et al.* (1988) avaliaram as células dendríticas foliculares através do marcador DRC-1 (“dendritic reticulum cell-1”) em 38 casos de LNH de células linfóides B. DRC-1 foi observado em um dos três casos de linfoma linfocítico, em todos os casos de linfoma de células do manto (3), em todos os casos de linfoma folicular de pequenas células clivadas (10), em seis dos sete casos de linfoma folicular de grandes e pequenas células; em um dos dois casos de linfoma folicular de grandes células, e em nenhum dos casos de linfoma difuso de grandes ou pequenas células clivadas (12). Segundo os autores, os seus resultados sugerem que nos casos de linfoma linfocítico a rede das células dendríticas foliculares pode ser expressa em pseudofolículos linfóides. Além disto, a rede das células dendríticas foliculares aparece “de novo” acompanhando o crescimento neoplásico, ao contrário de se originar dos folículos linfóides residuais, e as células neoplásicas linfóides pequenas clivadas têm um grande papel na indução das células dendríticas foliculares.

Maeda *et al.* (1993) avaliaram a morfologia, fenótipos de superfície e padrão de distribuição das células dendríticas foliculares em sete casos de linfoma folicular (células pequenas clivadas-1, pequenas e grandes células-5 e grandes células-1), 12 casos de linfoma difuso de células B (células pequenas clivadas-8, pequenas e grandes células-1 e grandes células-3) e cinco casos de linfomas de células T (tipo linfadenopatia angioimunoblástica-4 e linfoblástico-1). Os marcadores utilizados foram o DRC-1, CD21, CD23 e

CD35. Todos os linfomas foliculares demonstraram um padrão de marcação (DCR-1, CD21 e CD35 positivas) reticular distinto das células dendríticas foliculares coincidente com os folículos linfóides neoplásicos. Nove casos de linfoma difuso de células B apresentaram dois padrões de distribuição das células dendríticas foliculares (DCR-1 positivas): 1) padrão vestigial- focos de marcação vestigial em folículos linfóides pré-existentes, e/ou 2) padrão difuso- distribuição ampla da marcação. Todos os casos de linfomas de células T tipo linfadenopatia angioimunoblástica apresentaram padrão difuso de distribuição das células dendríticas foliculares. Nos linfomas foliculares os autores sugerem que as células dendríticas foliculares têm a função de manter o complexo antígeno-anticorpo em sua superfície assim como nos folículos linfóides. Nos linfomas de células B ou linfomas de células T os autores sugerem que o micro-ambiente organizado pelas células dos linfomas é necessário para o desenvolvimento das células dendríticas foliculares.

Tsunoda *et al.* (1999) avaliaram a habilidade das células dendríticas foliculares em capturar Ca^{2+} em folículos linfóides, a imuno-expressão de seis proteínas ligadoras de Ca^{2+} (caldesmona, proteína S100, calcinerina, calbidina-D, calmodulina e anexina VI) em folículos linfóides, e a imuno-expressão da caldesmona e proteína S100 em folículos linfóides de linfomas foliculares. As células dendríticas foliculares demonstraram grande captura de Ca^{2+} no núcleo e citoplasma, observada nos linfócitos foliculares. Todas as proteínas ligadoras de Ca^{2+} foram localizadas nos folículos linfóides e sempre presentes na zona basal clara. Pela técnica de imuno-eletrônica, a

caldesmona foi distribuída na periferia do citoplasma, enquanto a proteína S100, calcinerina, calbidina-D e calmodulina foram distribuídas difusamente pelo citoplasma. Os autores sugerem que proteínas ligadoras de Ca^{2+} podem regular o Ca^{2+} em diferentes sítios subcelulares e o seu papel parece ser heterogêneo.

Ainda no estudo de Tsunoda *et al.* (1999), na investigação da proteína S100 e caldesmona foi verificado que as células dendríticas foliculares em folículos linfóides neoplásicos grau I e II expressaram apenas a caldesmona, e a proteína S100 foi imuno-expressa em áreas focais de folículos linfóides neoplásicos grau II. Células dendríticas foliculares em folículos linfóides neoplásicos grau III demonstram freqüentemente proteína S100. Os autores sugerem que a rede de células dendríticas foliculares em folículos linfóides neoplásicos grau I parecer ser similar àquela da zona basal clara, em folículos linfóides neoplásicos grau III parece ser similar àquela das zonas basal clara e escura e em folículos linfóides neoplásicos grau II parece ser intermediária ao grau I e grau II.

Bagdi *et al.* (2001) avaliaram a rede de células dendríticas foliculares através dos marcadores CD21, CD23 e CD35 em material parafinado em tecido linfóide reacional (11) e neoplásico (69). Com estes marcadores foram observadas células dendríticas foliculares nos folículos linfóides das hiperplasias linfóides (11), e uma rede expandida de células dendríticas foliculares nos casos de linfoma de células do manto (8), linfoma de células B de baixo grau tipo MALT (7) e linfoma folicular de baixo grau (6). Fileiras de células dendríticas foliculares foram observadas em linfomas de células T

angioimunoblástico (9). Esparsas ou ausência total da rede das células dendríticas foliculares foi verificada em linfoma folicular com transformação para alto grau (5), linfoma de células B rico em células T (5) e LH com esclerose nodular grau II (4). Segundo os autores, a demonstração das células dendríticas foliculares em material parafinado proporciona informações inestimáveis no diagnóstico das doenças linfoproliferativas.

2.7 Marcadores Imuno-histoquímicos

A imunofenotipagem é uma importante chave para o diagnóstico e subclassificação dos linfomas, uma vez que estas neoplasias em sendo de origem das células do tecido linfóide, guardam propriedades fenotípicas e funcionais das células de origem. Utilizando-se da imunologia pode-se identificar e individualizar subtipos de doenças dentro das neoplasias do tecido linfóide. Os avanços em patologia e imunologia têm resultado em um grande número de marcadores que podem ser utilizados nos estudos de linfomas, em particular, o desenvolvimento de anticorpos monoclonais que reconhecem populações específicas de células do tecido linfóide, o sistema CD (Harris *et al.*, 1994; Abbas *et al.*, 1997; Roitt *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000; Hsi & Yegappan, 2001).

Os recentes avanços na técnica de imuno-histoquímica em relação à recuperação antigênica, métodos de detecção mais sensíveis e a disponibilidade de anticorpos monoclonais (sistema CD) tem contribuído para a realização detalhada da imunofenotipagem do material de linfomas fixados em formol, antes realizada somente em material congelado ou por

citometria de fluxo (Pileri, *et al.*, 1997; Chan, 1998a; Shi *et al.*, 2001). Os dois mais recentes sistemas de classificação das neoplasias do tecido linfóide, R.E.A.L.-1994 e OMS-2001, detalham o imunofenótipo de cada entidade.

Como neste estudo utilizamos alguns destes anticorpos, e de outros para a avaliação das células dendríticas, é importante discorrermos sobre eles.

2.7.1 *Anticorpos utilizados no diagnóstico de neoplasias de células linfóides*

B

A) **CD5**

O CD5 é uma glicoproteína de 67kD (“kilo Dalton”) que parece estar relacionada à modulação da sinalização de receptores das células T e B. É considerado um pan-marcador células T, está presente em timócitos e células T pós-tímicas e em um pequeno grupo de células B não-neoplásicas (linfócitos B-1). A expressão do CD5 é observada em todos os casos de linfoma linfocítico/leucemia linfocítica crônica e na grande maioria dos casos de linfoma de células do manto, estando geralmente ausente em outras doenças linfoproliferativas e neoplasias de pequenas e grandes células B (Jaffe, 1995; Jaffe *et al.*, 2001; Hsi & Yegappan, 2001).

B) **CD10**

O CD10, antígeno comum da leucemia linfoblástica aguda-CALLA (“common acute lymphoblastic leukemia antigen”) é uma endopeptidase de superfície celular de 100kD relacionada à modulação da resposta celular a peptídeos hormonais. É expresso por muitos tipos celulares incluindo células epiteliais, células linfóides e granulócitos. Ele não é linhagem específica e

entre as células linfóides não-neoplásicas é expresso por células precursoras e maduras, particularmente células B do centro germinativo. O CD10 é utilizado na caracterização do linfoma/leucemia linfoblástico (a) de precursor B ou T, linfoma folicular, LB e alguns casos de linfoma difuso de grandes células B. A expressão imuno-histoquímica do CD10 é de membrana e citoplasmática (Jaffe, 1995; Chu *et al.*, 2000; Jaffe *et al.*, 2001; Hsi & Yegappan, 2001).

C) **CD20**

O CD20 é uma proteína de membrana relacionada aos sinais de transdução. Apresenta propriedades de canais de cálcio e é associada à tirosina kinases. O CD20 é considerado um pan-marcador de células B e normalmente imuno-expresso em células B maduras e algumas células B precursoras, e na grande maioria (90-100%) das neoplasias de células linfóides B maduras. O anticorpo L-26 é comumente utilizado para reconhecer a molécula do CD20 e mostra imuno-reatividade de membrana em linfomas de células B. Alguns casos de LH expressam CD20 nas células RS e suas variantes (Jaffe, 1995; Jaffe *et al.*, 2001; Hsi & Yegappan, 2001).

D) **CD79a**

O CD79a/mb-1 e o CD79b/B29 compreendem as moléculas do dímero CD79 (mb-1/B29). Estas moléculas são associadas àlg de superfície e estão relacionadas à sinalização intracelular. O CD79a é considerado um excelente marcador de linhagem específica de células B, sendo expresso em todos os estágios de diferenciação das células B, desde células B precursoras até plasmócitos maduros. O anticorpo monoclonal

JCB117/MoAb, que reconhece a molécula do CD79a, mostra imunopositividade em 97-100% das neoplasias de células linfóides B e muitas doenças originadas de plasmócitos, freqüentemente com padrão citoplasmático (Jaffe *et al.*, 2001; Hsi & Yegappan, 2001; Chu & Arber, 2001).

E) *Ciclina D1*

A ciclina D1 é um produto do gene BCL-1, sendo uma importante ciclina relacionada à progressão do ciclo celular. Anticorpos monoclonais ou policlonais para ciclina D1 apresentam imuno-reatividade nuclear na maioria (70-100%) dos casos de linfoma de células do manto. A ciclina D1 não é imuno-expressa pelas células linfóides não-neoplásicas. A imuno-reatividade com este anticorpo é difícil e a utilização de recuperação antigênica intensa deve ser utilizada, assim como controle de qualidade para evitar falso negativo (Jaffe *et al.*, 2001; Hsi & Yegappan, 2001).

F) *Imunoglobulinas (Igs)*

A imuno-expressão com restrição de Igs de cadeia leve (κ ou λ) representa uma grande evidência de neoplasias de células linfóides B, sendo que alguns linfomas de células B podem não apresentar expressão destes anticorpos. A restrição de cadeia leve κ ou λ é também um importante meio de imunofenotipagem na distinção entre neoplasias de células linfóides B e processos reativos. Expressão citoplasmática de cadeia κ ou λ , em material parafinado, é observada em neoplasias de células plasmocíticas, linfoma linfoplasmocítico, linfoma de células B da zona marginal extranodal do MALT (linfoma MALT) e alguns casos de linfoma

difuso de grandes células B (Jaffe, 1995; Jaffe *et al.*, 2001; Hsi & Yegappan, 2001).

A expressão de Igs de cadeia pesada é utilizada em determinadas situações para o diagnóstico de neoplasias de células linfóides B maduras. Expressão de IgA indica diagnóstico de plasmocitoma, enquanto expressão de IgM favorece diagnóstico de linfoma. A distinção entre linfoma de células B da zona marginal extranodal do MALT (linfoma MALT) e linfoma de células B da zona marginal nodal do baço, pode ser realizada, em parte, pela expressão de IgD no linfoma esplênico da zona marginal. Entretanto, na maioria dos casos de linfomas a avaliação da expressão de Igs de cadeia pesada não é necessária (Jaffe *et al.*, 2001; Hsi & Yegappan, 2001).

G) *Anticorpo Antiplasmócito*

O VS38c é um marcador associado ao retículo endoplasmático e representa um anticorpo monoclonal que detecta diferenciação plasmocitóide em material fixado em formol. Ele reconhece um antígeno intracitoplasmático de 64kD presente em células plasmocitárias neoplásicas ou não-neoplásicas. O anticorpo também reconhece células epiteliais, mas esta ausente em outras células da linhagem hematopoética. O VS38c é de grande importância no diagnóstico das neoplasias de plasmócitos (mieloma plasmocítico, plasmocitoma ou macroglobulinemia de Waldenström), e nos casos de linfoma plasmoblástico de boca associado à infecção HIV (Turley *et al.*, 1994; Jaffe, 1995; Porter *et al.*, 1999; Jaffe *et al.*, 2001).

2.7.2 Anticorpos utilizados no diagnóstico de neoplasias de células linfóides T e NK

A) **CD1a**

O CD1a representa uma glicoproteína de 49kD não-polimórfica relacionada ao MHC classe I, sendo imuno-expressa pelas células dendríticas tipo Langerhans e por timócitos corticais. Na identificação de células dendríticas tipo Langerhans neoplásicas e não-neoplásicas o CD1a é mais específico que a proteína S100 (Krenács *et al.*, 1993; Shinzato *et al.*, 1995; Jaffe, 1995; Roitt *et al.*, 1999; Jaffe *et al.*, 2001; Hsi & Yegappan, 2001).

A expressão do CD1a em células T é aberrante, sendo uma evidência de processo linfoproliferativo de células T, principalmente no linfoma linfoblástico de precursor T, mas a possibilidade de timócitos não-neoplásicos deve ser excluída (Jaffe *et al.*, 2001; Hsi & Yegappan, 2001).

B) **CD2**

O antígeno CD2 é uma glicoproteína de 50kD que corresponde ao receptor para formação em roseta com eritrócitos de carneiro. Ele é imuno-expresso em todas as células T precursoras ou maduras não-neoplásicas, e considerado um pan-marcador de células T. O CD2 é imuno-expresso na maioria dos casos de neoplasias de células linfóides T e NK precursoras ou maduras, sendo importante no diagnóstico desta categoria de lesões. Entretanto, o CD2 pode ser expresso por blastos da leucemia mieloide aguda e por histiocitos não-neoplásicos, não sendo inteiramente um marcador de linhagem específica (Jaffe, 1995; Jaffe *et al.*, 2001).

C) **CD3**

O antígeno CD3 representa um complexo de cinco polipeptídeos, as cadeias β , α , γ , δ e ϵ , que formam o TCR-CD3, sendo imuno-expresso em todas as células T não-neoplásicas. A expressão de CD3 é observada em 41-95%, com anticorpo policlonal, e em 66%, com anticorpo monoclonal, dos linfomas de células T. Padrão de marcação citoplasmática e de membrana é observado quando se utiliza anticorpo policlonal, e marcação apenas de membrana com anticorpo monoclonal. A marcação de membrana do CD3 é indicada para ser específica para neoplasias linfóides de células T; e a sua expressão citoplasmática é freqüentemente observada em neoplasias linfóides de células T e NK. Células de RS podem expressar o CD3 em cerca de 7 a 11% dos casos de LH, quando se utiliza anticorpo policlonal (Jaffe *et al.*, 2001; Hsi & Yegappan, 2001).

C) **CD45RO**

O CD45RO representa um antígeno restrito de células T que reconhece uma isoforma de 205-220kD do CD45 sendo detectado pelo anticorpo monoclonal UCHL-1 em tecido fixado em formol. A expressão do CD45RO é verificada em 78-94% dos casos de linfoma de células T periféricas, não-especificado, 63-78% das leucemias linfoblástica de precursor T, e 100% dos casos de micose fungóide. Cerca de 10% das neoplasias de células linfóides B e 27% das neoplasias de células linfóides B associadas à infecção HIV são imuno-reativas para o CD45RO, de forma que este anticorpo é sensível, mas não específico para células T (Jaffe *et al.*, 2001; Hsi & Yegappan, 2001).

E) **CD56**

O antígeno CD56 é uma isoforma de 140kD da molécula de adesão celular neural (N-CAM, “neural cellular adhesion molecule”), sendo imuno-expressa em células do sistema nervoso central e periférico, células epiteliais do túbulo proximal do rim, células epiteliais da tireóide e células NK. A expressão do CD56 é de membrana e, nas neoplasias do tecido linfóide, a imuno-reatividade deste antígeno é utilizada no diagnóstico do linfoma de células NK/T extranodal, tipo nasal. Além deste, o linfoma de células T enteropático, linfoma de células T hepato-esplênico, linfoma de células T subcutâneo paniculítico, raras neoplasias de células linfóides B, neoplasias de origem plasmocíticas e neoplasias não-hematopoética (rabdomiossarcoma) podem imuno-expressar este antígeno (Jaffe *et al.*, 2001; Hsi & Yegappan, 2001).

F) **CD16**

O CD16 é uma glicoproteína de 50-60kD que tem uma baixa afinidade para o receptor Fc de IgG. Este antígeno é imuno-expresso pelas células NK, neutrófilos, macrófagos e algumas células T. A expressão do CD16 é de membrana e nas neoplasias de células linfóides T e NK é importante para no diagnóstico das neoplasias de células NK maduras, principalmente a leucemia de células NK agressiva e o linfoma de células NK/T extranodal, tipo nasal (Jaffe, 1995; Jaffe *et al.*, 2001; Hsi & Yegappan, 2001).

2.7.3 Outros anticorpos

A) **CD45**

O CD45 ou LCA (Leukocyte Common Antigen) é uma molécula com atividade de tirosina fosfatase, sendo um marcador de leucócitos. O CD45 apresenta-se com múltiplos epítomos de diferentes graus de linhagem específica. Epítomos restritos de CD45 incluem o CD45RA, CD45RB e CD45RO. O CD45 é imuno-expresso por células T, células B, células NK, monócito, macrófago e por granulócito. A imuno-expressão do CD45 é particularmente útil na avaliação diagnóstica de neoplasias pouco diferenciadas, nas quais o diagnóstico diferencial inclui neoplasias do tecido linfóide (Jaffe, 1995; Roitt *et al.*, 1999; Jaffe *et al.*, 2001).

B) **CD21 e CD35**

O CD21 e CD35 são anticorpos que reconhecem receptores de complemento, o C3d e C3b, respectivamente. Eles são normalmente imuno-expressos pelas células dendríticas foliculares, sendo úteis na identificação de neoplasias originadas destas células. Além disto, estes anticorpos são utilizados para demonstrar arquitetura nodal e a presença de folículos linfóides, uma vez que se verifica uma rede de células dendríticas foliculares. Linfoma folicular demonstra uma rede compacta e bem definida de células dendríticas foliculares, enquanto no linfoma de células do manto se verifica uma rede pouco definida e descontínua. O CD21 e CD35 também têm sido utilizados para demonstrar a presença de folículos linfóides nos vários tipos histológicos do LH (Jaffe, 1995; Jaffe *et al.*, 2001; Hsi & Yegappan, 2001).

C) **Proteína S100**

A proteína S100 é uma proteína de 20kD, ligadora de Ca^{2+} e com três formas conhecidas ($\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ e $\beta\beta$) resultantes da dimerização de duas subunidades. Estas três formas são distribuídas variavelmente em diferentes células e tecidos. A sua designação de S100 é devido à sua solubilidade (100%) em sulfato de amônia, pH neutro. Inicialmente foi considerada uma proteína específica de células do tecido nervoso, mas posteriormente foi detectada em melanócitos, adipócitos, condrócitos, células dendríticas, células musculares, células acinares serosas, epitélio dos ductos intercalar e estriado de glândulas salivares menores e em algumas neoplasias originadas destas células (Haimoto *et al.*, 1987; Ninomiya *et al.*, 1989).

D) **Caldesmona**

Existem duas formas de caldesmona, a h-caldesmona que é uma proteína de 120-150kD e a l-caldesmona que é uma proteína de 70 a 80kD. A h-caldesmona é mais especificamente encontrada em células musculares lisas do que em tecido ou células não-musculares, sendo relacionada à diferenciação das células musculares lisas. A l-caldesmona está geralmente presente em tecidos ou células não-musculares. A caldesmona é essencial para a contração das células musculares lisas e não-musculares, através da sua ligação com as proteínas calmodulina e actina, sendo esta ligação dependente da concentração de Ca^{2+} (Ueki *et al.*, 1987; Sobue & Selles, 1991; Matsumura & Yamashiro, 1993).

E) **CD34**

O CD34 é uma glicoproteína trans-membrana de 105 a 120kD. O CD34 se concentra nas projeções interdigitantes da junção luminal das células endoteliais, é associado aos micro-processos do broto vascular, o que sugere uma função de adesão e migração celular. É considerado um marcador de células endoteliais, sendo também imuno-expresso em todas células hematopoéticas precursoras, desaparecendo nesta linhagem celular, quando sofrem processo de diferenciação. O CD34 apresenta uma imuno-expressão citoplasmática, sendo grandemente utilizado no diagnóstico das neoplasias vasculares (Andrews *et al.*, 1986; Fina *et al.*, 1990; Martins, 1998).

2.8 Monoclonalidade das Neoplasias do Tecido Linfóide

O diagnóstico e classificação das neoplasias e lesões reativas do tecido linfóide são freqüentemente realizados através da análise morfológica associada à imunofenotipagem. A análise da monoclonalidade, verificada pelo estudo do rearranjo dos genes IgH para as neoplasias de células linfóides B ou do gene TCR para neoplasias de células linfóides T, através da hibridização por “Southern blotting” ou por amplificação de DNA pela PCR, têm sido utilizada na distinção entre as doenças do tecido linfóide. A técnica de hibridização por “Southern blotting” apresenta certas limitações quando utilizada rotineiramente: 1) é uma técnica complexa, 2) requer muito tempo para a sua realização (1 a 2 semanas), 3) requer o uso de isótopos radioativos, 4) necessita de grande quantidade de DNA (1-5 µg) e 5) não

tem sido empregada para estudo de material embebido em parafina e fixado em formol (Cleary *et al.*, 1984; Waldmann, 1987).

O método de detecção e análise de monoclonalidade, das neoplasias de células linfóides B, é baseado nos eventos fisiológicos que ocorrem durante o rearranjo do gene IgH, sendo este rearranjo gênico responsável pela diversidade e especificidade das Igs. Nas células tronco e, portanto em todas as células, exceto nas células B, os denominados segmentos, variável (V_H) e constante (C_H), do gene IgH são separados por milhões de pares de bases (pb) de DNA no cromossomo 14q32 (Waldmann; 1987). Nas células B, o gene da IgH apresenta uma série de rearranjos resultando em uma aproximação dos segmentos V_H e C_H , mas que permanecem ainda separados por aproximadamente 1500 pb. No gene IgH rearranjado e entre estes dois segmentos, existem ainda dois segmentos gênicos denominados de diversidade (D_H) e de junção (J_H) (Ravetch *et al.*, 1981; Tonegawa, 1983; Waldmann, 1987; Brisco *et al.*, 1990; Roitt *et al.*, 1999).

No processo de rearranjo do gene IgH, um dos muitos segmentos D_H é introduzido sobre um dos seis segmentos J_H . Durante este processo, a deoxirribonucleotídeo terminal transferase (TdT, “terminal deoxyribonucleotide transferase”) insere nucleotídeos entre os segmentos D_H e J_H criando um segmento gênico de tamanho e sequência variáveis, denominada de região N_1 . Em seguida, um segundo rearranjo aproxima um dos mais de 100 segmentos V_H para o locus gênico $D_H-N_1-J_H$ e a TdT cria uma segunda região (N_2) entre V_H e D_H . Assim o DNA do gene IgH passa a conter um locus gênico $V_H-N_2-D_H-N_1-J_H$ que é então transcrito em ácido

ribonucléico mensageiro (RNA_m - “messenger ribonucleic acid”) pela RNA polimerase, codificando assim a cadeia pesada das Igs (Figura 2.1) (Tonegawa, 1983; McCarthy *et al.*, 1990; Roitt *et al.*, 1999).

Figura 2.1 - Diagrama do rearranjo do gene da imunoglobulina de cadeia pesada. V_H : segmento variável; D_H : segmento de diversidade; J_H : segmento de junção; C_H : segmento constante; N_1 : segmento N_1 ; N_2 : segmento N_2 (McCarthy *et al.*, 1990).

O segmento V_H do gene IgH, que é responsável pela codificação da região da Ig que reconhece o antígeno, contém três sub-regiões hipervariáveis denominadas de regiões determinadoras de complementaridade- CDR 1, 2, e 3 (“complementarity-determining regions”), sub-regiões estas que sofrem alterações durante o processo de rearranjo do

gene e são as que fazem contato com o antígeno. As CDR estão situadas ao lado de quatro sub-regiões menos variáveis e de suporte essencial para as CDR, denominadas de sub-regiões “framework” (FR1, 2, 3 e 4) (Tonegawa, 1983; McCarthy *et al.*, 1990; Roitt *et al.*, 1999).

Alguns estudos têm utilizado iniciadores para a sub-região conservada FR3 do segmento V_H (FR3A) e iniciadores (VJH e LVJH) para o segmento J_H para a amplificação, por “semi-nested” PCR (snPCR), do gene IgH para a avaliação da monoclonalidade das neoplasias do tecido linfóide. A amplificação destes segmentos com estes iniciadores, pela snPCR, produz um fragmento de DNA de 100-120 pb, que pode ser visualizado em gel de agarose (Yamada *et al.*; 1989; Trainor *et al.*, 1990; Wan *et al.*, 1990; Weirich *et al.*, 1995).

Trainor *et al.* (1990) desenvolveram um método para a detecção de monoclonalidade de lesões linfoproliferativas B através da análise do rearranjo do IgH e utilizando a amplificação de DNA pela snPCR e iniciadores para os segmentos V_H e J_H do gene IgH. Estes autores utilizaram amostras de sangue, medula óssea e linfonodos não-fixados e congelados e verificaram monoclonalidade em 15 de 15 linhagens de células linfoblastóide B e em 19 de 23 casos de neoplasias linfóides de células B. Não observaram monoclonalidade em 16 clones de linfócitos T normais, nove casos de neoplasias linfóides de células T, 20 casos de linfócitos do sangue periférico e oito casos de tecido linfóide reativo. Segundo os autores, o método estabelecido para a detecção da monoclonalidade é plausível de ser

utilizado rotineiramente no diagnóstico, apresentando simplicidade, versatilidade e rapidez.

Wan *et al.* (1990), utilizando a metodologia de Trainor *et al.* (1990), realizaram a análise de monoclonalidade em populações de células B a partir de material embebido em parafina e fixado em formol. Foi realizada a snPCR para amplificar as regiões V_H - J_H do gene IgH. Dos 26 casos de linfomas de células B, 24 apresentaram uma banda de monoclonalidade e nenhum dos sete casos de linfomas de células T apresentou amplificação. Nove casos de linfonodos reativos produziram uma banda policlonal e 12 casos de carcinoma não apresentaram amplificação ou banda policlonal. De acordo com os autores, a detecção da monoclonalidade é um método de valor para ser utilizado em diagnóstico de rotina, uma vez que ele tem simplicidade, versatilidade, e aplicabilidade em material embebido em parafina e fixado em formol.

Além destes iniciadores, outros têm sido desenhados e também utilizados com o mesmo objetivo. Ramasamy *et al.* (1992) utilizando iniciadores para a sub-região conservada FR2 do segmento V_H (Fr2A e Fr2B) e para o segmento J_H (LJH, VLJH, ELJH/*Bam*) avaliaram 25 casos de lesões linfoproliferativas de células B através da PCR e snPCR. Os autores demonstraram a validade destes iniciadores na detecção da monoclonalidade de lesões linfoproliferativas B.

Inghirami *et al.* (1993) avaliaram o rearranjo do gene IgH em DNA genômico de 139 casos de leucemia de células linfóides B, 84 casos de LNH de células linfóides B não-fixados, 55 casos de LNH de células linfóides B

fixados em formol, 19 casos de tecido linfóide normal, nove linhagens de células linfoblásticoide e 11 casos de leucemia de células linfóides T. Utilizaram a técnica da snPCR e iniciadores para a região conservada FR3 do segmento V_H e para o segmento J_H do gene IgH. Para verificar se o DNA genômico era adequado para a amplificação pela snPCR, foi realizada investigação, pela PCR, com controles e gene (p53) não relacionado ao gene IgH. Sessenta e três por cento dos casos de LNH de células linfóides B não-fixados e 64% dos casos de LNH fixados apresentaram monoclonalidade, verificada pela presença de uma banda distinta (100-120 bp) no gel de agarose. Não observaram diferença na detecção de monoclonalidade entre as diferentes categorias de LNH, assim como não observaram monoclonalidade nos casos de tecido linfóide normal e leucemia de células linfóides T. Os autores sugerem que a monoclonalidade das neoplasias de células linfóides B humanas pode ser eficientemente avaliada pela PCR, tanto para tecidos não-fixados como fixados em formol. Além disto, esta técnica demonstrou grande utilidade no diagnóstico e pesquisa destas lesões, assim como, na análise retrospectiva de material de arquivo.

Nakamura *et al.* (2000) avaliaram o gene IgH em quatro casos de síndrome de Richter de células linfóides B para verificar se o linfoma difuso de grandes células B origina de um mesmo clone celular que a leucemia linfocítica crônica ou se representa um evento “de novo”. Além disto, verificou também se o linfoma difuso de grandes células B apresenta micro-heterogeneidade intraclonal. Dois casos de linfoma difuso de grandes células B demonstraram diferença na amplificação do gene IgH em relação à

leucemia linfocítica crônica, demonstrando assim ser um novo clone maligno. A região V_H do gene IgH dos casos de linfoma difuso de grandes células B exibiram 0,5%-9,0% de mutação somática e não demonstraram micro-heterogeneidade.

3 PROPOSIÇÃO

Propomo-nos, neste estudo, a:

- 3.1** Reclassificar os linfomas de boca de acordo com a classificação da OMS-2001;
- 3.2** Verificar as principais características clínicas dos linfomas de boca;
- 3.3** Detectar a presença do EBV em determinados tipos histológicos de linfomas de boca;
- 3.4** Caracterizar as células dendríticas e relacioná-las com os tipos histológicos de linfomas de boca;
- 3.5** Confirmar a monoclonalidade das neoplasias de células linfóides B de boca.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos Casos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da USP (Nº 150/00). Para a realização do deste estudo foram selecionados casos diagnosticados como linfoma e localizados na boca pertencentes ao arquivo dos Serviços de Patologia Cirúrgica das Disciplinas de Patologia Bucal das Faculdades de Odontologia da USP (São Paulo-SP), da UFMG (Belo Horizonte-MG), da UNESP (São José dos Campos-SP) e da UFPel (Pelotas-RS). Os dados clínicos das lesões foram obtidos a partir de informações contidas nas fichas de requisição para exame anatomo-patológico e estes incluíram: idade, sexo e cor dos pacientes; sintomatologia, tamanho, aspectos clínico e radiográfico, duração, localização e diagnóstico clínico das lesões, quando relatados.

4.2 Reclassificação dos Casos

Os linfomas de boca foram reclassificados de acordo com o sistema de classificação da OMS-2001 (Tabela 2.11).

Para a análise morfológica das células neoplásicas linfóides foram utilizados cortes teciduais de 4µm de espessura, obtidos dos espécimes fixados em formol a 10%, incluídos em parafina e corados pela técnica da hematoxilina-eosina (HE). No sistema de classificação da OMS-2001 se utiliza a imunofenotipagem para a individualização e denominação específica dos linfomas. Para a imunofenotipagem foi utilizada a reação imuno-histoquímica com anticorpos associados à células linfóides B (CD5, CD10, CD20, CD79a, VS38c, cadeia leve κ e λ), anticorpos associados à células linfóides T (CD2, CD3, CD45RO), anticorpos associados à células linfóides NK (CD16, CD56) e outros (CD45, ciclina D1). As origens e o protocolo de trabalho (recuperação antigênica, concentrações e tempos de incubação) destes anticorpos encontram-se na tabela 4.1.

4.3 Caracterização das Células Dendríticas

Para a caracterização das células dendríticas foi utilizada a reação de imuno-histoquímica. Para identificar as células dendríticas foliculares foram utilizados o CD21; CD35 e caldesmona. O padrão de expressão das células dendríticas foliculares, visualizado através dos anticorpos CD21 e CD35, foi observado e computado para cada tipo histológico de linfomas de boca.

A caldesmona é um anticorpo também expresso em parede de vasos sangüíneos e em outras células. Assim foi realizado também neste estudo a imuno-histoquímica com o anticorpo CD34. A análise com o CD34 foi realizada com o objetivo de eliminar a marcação dos vasos sangüíneos pela caldesmona, dando assim mais validade na análise da caldesmona para as

células dendríticas foliculares. A imuno-histoquímica da caldesmona e o do CD34 foi realizada em cortes teciduais consecutivos (cortes seriados).

Na análise da caldesmona e CD34 foi realizada a quantificação da imuno-expressão de cada anticorpo em um sistema computadorizado que utiliza o “software” Imagelab[®]. Foram selecionados cinco campos de cada caso em microscópico de luz (Laborlux-Leitz) com aumento final de 100x. A imagem dos campos foi adquirida (câmera JVC modelo TK 870 U) e transferida para um monitor de computador com área de 640x480 “pixels”, onde se realizou a quantificação da imuno-expressão de cada anticorpo através de subtração de imagens.

O “software” Imagelab[®] foi desenvolvido no Laboratório de Informática Dedicado a Odontologia-FOUSP (LIDO), cuja característica principal é analisar as estruturas de uma imagem pelo tom de cores vermelha, verde e azul (sistema RGB) efetuando assim, a individualização das estruturas analisadas, e realizando análise quantitativa ou morfométrica.

Os valores obtidos na quantificação da imuno-expressão foram expressos em porcentagem. Estes foram transformados em ângulos, segundo a Tabela de BLISS (Snedecor; Cochran, 1967), antes de serem submetidos à análise estatística. Os valores da quantidade de imuno-expressão da caldesmona foram calculados pela subtração dos valores da quantificação da imuno-expressão do CD34. Assim, os valores médios da quantidade de imuno-expressão da caldesmona dos cinco campos analisados em cada caso dos tipos histológicos dos linfomas de boca, foram obtidos e submetidos à análise estatística utilizando-se o Teste de Mann-

Whitney. Este teste foi realizado através do “software MINITAB® for Windows”, versão 12.1.

Para identificar as células dendríticas interdigitantes foi utilizada a proteína S100. Como a proteína S100 representa também um marcador para células de Langerhans, foi realizada a imuno-histoquímica para o anticorpo CD1a com a finalidade de se excluir a presença das células de Langerhans nos casos estudados. A imuno-histoquímica da proteína S100 e o CD1a foi realizada em cortes teciduais consecutivos (cortes seriados).

Na análise das células dendríticas interdigitantes/S100+ foram consideradas células onde se verificou o núcleo celular associado à citoplasma de formato dendrítico, localizadas por entre as células linfóides neoplásicas. As células dendríticas interdigitantes/S100+ foram quantificadas em um microscópio de luz (Laborlux-Leitz) em aumento final de 400x. Foram selecionados dez campos para contagem, e os valores das células dendríticas interdigitantes/S100+ por campo de cada caso dos tipos histológicos dos linfomas de boca, foram obtidos e submetidos à análise estatística utilizando-se o Teste de Mann-Whitney. Este teste foi realizado através do “software MINITAB® for Windows”, versão 12.1.

As origens e o protocolo de trabalho (recuperação antigênica, concentrações e tempos de incubação) destes anticorpos utilizados no estudo das células dendríticas são apreciados Tabela 4.1.

4.4 Imuno-histoquímica

Para a realização da técnica de imuno-histoquímica com todos os anticorpos utilizados neste estudo, os espécimes foram submetidos ao método da streptavidina-biotina (SABC). A imuno-histoquímica para os anticorpos CD2, CD16 e CD56 foi realizada no Laboratório de Imuno-histoquímica do Instituto Adolfo Lutz-USP; e a imuno-histoquímica para todos os outros anticorpos foi realizada no Laboratório de Imuno-histoquímica da Disciplina de Patologia Bucal-FOUSP.

Cortes teciduais de 3µm de espessura, montados sobre lâmina preparada com solução de ATPS ("3-aminopropyltriethoxysilene"; SIGMA CHEMICAL CO, St. Louis, MO, USA) a 5% em etanol absoluto, foram desparafinizados em xilol e hidratados por passagens sucessivas em etanol de concentrações descendentes (etanol absoluto a etanol 80%). A remoção do pigmento formólico foi realizada em solução de hidróxido de amônia a 10% em etanol 95% por 10 minutos.

Previamente à incubação com soros primários, as lâminas foram submetidas ao tratamento para recuperação antigênica, de acordo com o fabricante e padronização para cada anticorpo (Tabela 4.1). Após o tratamento específico para cada anticorpo, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena através de solução de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol (V/V) ou água (V/V), em duas passagens de cinco ou 15 minutos cada, respectivamente. As lavagens entre as etapas foram realizadas com solução tamponada de Tris-HCl (TRIS-Hydroximetil-Aminometano/Ácido clorídrico; SIGMA CHEMICAL CO., St. Louis, MO, USA) 0,05M, pH 7,4.

O soro secundário utilizado foi o polivalente, anticabra, anticoelho e anticomundongo; e o soro terciário foi a streptavidina-biotina com peroxidase conjugada. Estas soluções são pré-fabricadas e requerem incubação em temperatura ambiente por 30 minutos (Kit LSAB+, DAKO CORPORATION, Carpinteria, CA, USA, Nº K0690).

A revelação da reação foi realizada através de solução cromógena, contendo 0,03% de 3-3'-diaminobenzidina (3,3',4,4'-tetraaminobiphenyl-tetrahydrochloride, SIGMA CHEMICAL CO., St. Louis, MO, USA) em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,4 e adicionando peróxido de hidrogênio a 0,3%. Após a revelação, foram realizadas a contra-coloração das lâminas com hematoxilina de Meyer, a desidratação em cadeia de concentrações ascendentes de etanol (etanol 50% a etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem em Permount® (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

Para cada tipo de anticorpo foi utilizado um controle positivo (tecido sabidamente positivo), e o controle negativo foi realizado pela abolição do anticorpo primário. Nas reações de imuno-histoquímica realizadas no Laboratório de Imuno-histoquímica da Disciplina de Patologia Bucal-FOUSP foi utilizado um sistema automático universal de coloração (Dako Auto Staining®, DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA). Neste sistema, as etapas de incubação do soro primário até etapa de contra-coloração com hematoxilina de Mayer foram feitas de forma automática.

Tabela 4.1 - Origens e protocolo de trabalho (recuperação antigênica, concentrações e tempos de incubação) dos anticorpos utilizados no presente estudo

Anticorpos	Origem	Protocolo de Trabalho
Anticorpos associados à células linfóides B		
CD5 (Anticorpo monoclonal)	DAKO ¹ -54/F6	TRIS-EDTA ^a , 0,001M, pH 9-banho Maria a 95°C, 30'; 1:50; 40' a 37°C
CD10 (Anticorpo monoclonal)	Serotec ² -56C6	TRS1x ^d , pH 6-banho Maria a 95°C, 30'; 1:50; 40' a 37°C
CD20 (Anticorpo monoclonal)	DAKO ¹ -L26	Acido cítrico, 0,01M, pH 6-microondas, 10'; 1:500; 40' a 37°C
CD79a (Anticorpo monoclonal)	DAKO ¹ -JCB117	Acido cítrico, 0,01M, pH 6-banho Maria a 95°C, 30'; 1:50; 40' a 37°C
VS38c (Anticorpo monoclonal)	DAKO ¹ -VS38c	Acido cítrico, 0,01M, pH 6-banho Maria a 95°C, 30'; 1:100; 30' a 37°C
Cadeia leve κ (Anticorpo monoclonal)	BioGenex ⁴ -L1C1	Acido cítrico, 0,01M, pH 6-banho Maria a 95°C, 30'; 1:100; 30' a 37°C
Cadeia leve λ (Anticorpo monoclonal)	BioGenex- ⁴ HP6054	Acido cítrico, 0,01M, pH 6-banho Maria a 95°C, 30'; 1:100; 30' a 37°C
Anticorpos associados à células linfóides T		
CD2 (Anticorpo monoclonal)	Serotec ² -AB75	Acido cítrico, 0,01M, pH 6-panela de Pressão, 3'; 1:40; 18hs a 4°C
CD3 (Anticorpo policlonal)	DAKO ¹ -A0452	Acido cítrico, 0,01M, pH 6-banho Maria a 95°C, 30'; 1:100; 40' a 37°C
CD45RO (Anticorpo monoclonal)	DAKO ¹ -UCLH1	Acido cítrico, 0,01M, pH 6-microondas, 5'; 1:500; 40' a 37°C
Anticorpos associados à células linfóides NK		
CD16 (Anticorpo monoclonal)	Novocastra ³ -2H7	Acido cítrico, 0,01M, pH 6-panela de Pressão, 3'; 1:80; 18hs a 4°C
CD56 (Anticorpo monoclonal)	Novocastra ³ -1B6	TRIS-EDTA ^a , 0,001M, pH 9-panela de Pressão, 3'; 1:100; 18hs a 37°C
Anticorpos associados à células dendríticas foliculares		
CD21 (Anticorpo monoclonal)	DAKO ¹ -1F8	TRS1x ^d , pH 6-banho Maria a 95°C, 30'; 1:50; 40' a 37°C
CD35 (Anticorpo monoclonal)	DAKO ¹ -MAC-CDR	TRS1x ^d , pH 6-banho Maria a 95°C, 30'; 1:20; 40' a 37°C
Caldesmona (Anticorpo monoclonal)	Novocastra ³ -TD107	Acido cítrico, 0,01M, pH 6-banho Maria a 95°C, 30'; 1:50; 30' a 37°C
Anticorpos associados à células dendríticas interdigitantes		
Proteína S100 (Anticorpo policlonal)	DAKO ¹ -Z0311	Sem tratamento; 1:800; 30' a 37°C
Outros anticorpos		
CD45 (Anticorpo monoclonal)	DAKO ¹ -M0701	Sem tratamento; 1:500; 40' a 37°C
Ciclina D1 (Anticorpo monoclonal)	DAKO ¹ -DCS-6	Acido cítrico, 0,01M, pH 6-banho Maria a 95°C, 30'; 1:150; 30' a 37°C
CD1a (Anticorpo monoclonal)	Serotec ² -010	Acido cítrico, 0,01M, pH 6-banho Maria a 95°C, 30'; prt. ^b ; 30' a 37°C
CD34 (Anticorpo monoclonal)	Novocastra ³ -QBE/10	Acido cítrico, 0,01M, pH 6-banho Maria a 95°C, 30'; 1:50; 30' a 37°C

1-Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA; **2**-www.serotec.co.uk; **3**-Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, UK; **4**-BioGenex, San Ramon, CA, USA, **d**-TRS-"Target Retrieval Solution (DAKO-S1700); **a**-TRIS-EDTA -TRIS-Hydroximetil-Aminometano/"Etylenediamine-Tetraacetic Acid"; **b**-prt.- Solução de soro primário pronta para uso.

4.5 Hibridização “in situ” (ISH)

A técnica de ISH foi desenvolvida com os princípios da imuno-histoquímica, na qual uma sonda de ácido nucléico (DNA ou RNA) substitui a sonda convencional de soro primário. A ISH emprega uma série de sondas de ácidos nucléicos para detectar semiquantitativamente e localizar espacialmente, alvos de DNA ou RNA em células ou cortes de tecidos. Assim, a técnica ISH possibilita o estudo da anatomia celular da transcrição gênica, a detecção de seqüências de DNA ou RNA de patógenos celulares e a localização primária de genes em cromossomos individuais.

No presente estudo, a técnica da ISH foi realizada com o objetivo de detectar a presença de DNA do EBV nas células neoplásicas dos linfomas de boca. Esta técnica foi realizada no Laboratório de Imuno-histoquímica do Instituto de Medicina Tropical-USP. Foi utilizada uma sonda biotinizada de DNA de 100-1000 pb da ENZO (Enzo Diagnostic Inc, Farmingdale, NY, USA, Nº 40836) que hibridiza com o DNA homólogo do EBV, e um sistema de amplificação e revelação comercial da DAKO (DAKOGenPoint®; DAKO CORPORATION, Carpinteria, CA, USA, Nº K0620).

Em todas as etapas da ISH, descritas abaixo, foram utilizadas estratégias apropriadas de controle (uso de luvas, máscara, desinfecção do local de trabalho com álcool 70%, realização dos experimentos em câmara de fluxo laminar, uso de soluções e vidraria estéreis, etc), com o objetivo de evitar contaminação cruzada dos espécimes com DNA ou RNA exógeno.

Cortes teciduais, do material parafinado, de 3µm de espessura foram colocadas sobre lâminas preparada com solução de ATPS a 5% em etanol absoluto, e submetidos à técnica da ISH, como se segue:

- a) Desparafinização em xilol a temperatura ambiente (3 trocas com 30, 5 e 5 minutos, respectivamente);
- b) Hidratação em cadeia de concentração descendente de etanol (2 trocas em etanol absoluto-1 minuto cada e 2 trocas em etanol 95%-1 minuto cada), seguida de lavagem em água destilada (3 trocas-1 minuto cada);
- c) Tratamento com proteinase K (Life Technologies, Gaithersburg, CA, USA) na concentração de 25µg/ml-15 minutos a 37°C;
- d) Lavagem em água destilada (3 trocas-5 minutos cada);
- e) Bloqueio da peroxidase endógena (água oxigenada 6% V/V com metanol; 2 trocas-10 minutos cada);
- f) Lavagem em água destilada (3 trocas-3 minutos cada);

g) Aplicação da sonda de EBV biotinilada na diluição de 1:80 em tampão de hibridização;

Tampão de hibridização

1. Dextran sulfato 50% em água livre de RNA	10 ml
2. SSC 20x	7,5 ml
Cloreto de sódio	175,3 g
Citrato de sódio	88,2 g
Água livre de RNA	completar para 1000 ml
3. Solução de Denhardt 50x	1 ml
Ficoll	100 mg
Pirrolidone polivinil	100 mg
Albumina bovina	100 mg
Água livre de RNA	10 ml
4. DNA de esperma de salmão-10 mg/ml em água livre de RNA	0,5 ml
5. tRNA ("transport RNA") de levedura-10 mg/ml em água livre de RNA	0,625 ml
6. Ácido poliA-poliC-poliadinílico-citidílico-1 mg/ml em água livre de RNA	0,5 ml
7. Pirofosfato de sódio inorgânico-100 mg/ml em Tris-HCL 1M, pH 7,4	0,5 ml
8. Formamida deionizada	25 ml
9. Água livre de RNA	4,375 ml
Volume total da solução	50 ml

- h) Desnaturação dos cortes com a sonda incubada a 95°C, 5 minutos, realizada em placa de aquecimento (Tecnal[®], Piracicaba, Brasil);
- i) Hibridização da sonda, realizada em câmara úmida a 37°C, 18hs;
- j) Lavagem com TBST (Tris-HCL 0,05M, pH 7,6; Tween 20 a 2%) (SIGMA CHEMICAL CO, St. Louis, MO, USA) (2 trocas, 10 minutos cada);
- k) Incubação das lâminas em solução de estringência (1:50, DAKO CORPORATION, Carpinteria, CA, USA, Nº S3500), em banho Maria a 55°C por 20 minutos;
- l) Lavagem com TBST (1 troca, 5 minutos);
- m) Incubação do anticorpo primário (Streptavidina-HRP; DAKO GenPoint[®]; DAKO CORPORATION, Carpinteria, CA, USA, Nº K0620) na diluição de 1:400 em PBS ("phosphate buffered saline" 10mM, pH 7,4), 15 minutos;
- n) Lavagem com TBST (3 trocas, 5 minutos cada);
- o) Incubação com solução de biotil-tiramida (DAKO GenPoint[®]; DAKO CORPORATION, Carpinteria, CA, USA, Nº K0620), 15 minutos;
- p) Lavagem com TBST (3 trocas, 5 minutos cada);
- q) Incubação do anticorpo secundário (Streptavidina-HRP; DAKO GenPoint[®]; DAKO CORPORATION, Carpinteria, CA, USA, Nº K0620), 15 minutos;
- r) Lavagem com TBST (3 trocas, 5 minutos cada);
- s) Revelação da reação com 3-3'-diaminobenzidina (DAKO GenPoint[®]; DAKO CORPORATION, Carpinteria, CA, USA, Nº K0620) na diluição de 1:50, 2 minutos;

- t) Parada da reação em água destilada, seguida de três lavagens em água destilada, 3 minutos cada;
- u) Contra-coloração com hematoxilina de Meyer e lavagem em água corrente;
- v) Desidratação das lâminas em cadeia de concentração ascendente de etanol, diafanização em xilol e montagem em Permount® (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

Na realização da ISH foram utilizadas duas lâminas de cada caso estudado, onde em uma delas se omitiu a etapa da aplicação da sonda (controle negativo individual), e para cada reação de ISH um controle positivo (tecido sabidamente positivo para a presença do EBV) foi utilizado.

Na avaliação dos casos, foram considerados casos positivos para a presença do EBV, aqueles que demonstraram pequenos pontos (“pinpoints”), únicos ou múltiplos, localizados no interior do núcleo celular e de coloração acastanhada, sem nenhuma evidência deste padrão de marcação na lâmina correspondente ao controle negativo individual.

4.6 Monoclonalidade das Neoplasias de Células Linfóides B de Boca

A monoclonalidade dos casos de neoplasias de células linfóides B de boca foi confirmada pela análise do rearranjo do gene IgH, através da amplificação do DNA genômico pela PCR ou snPCR.

Foram também incluídos casos de tecido linfóide reacional (tonsila, 2), mieloma plasmocítico de boca (2), neoplasias de células linfóides T e NK de boca, e carcinoma epidermóide de boca (2). Todos estes casos foram

utilizados com o objetivo de validação do experimento, uma vez que os casos de tecido linfóide reacional apresentam policlonalidade; os casos de mieloma plasmocítico de boca apresentam imprescindivelmente monoclonalidade (controle positivo) e os casos de neoplasias de células linfóides T e NK de boca e carcinoma epidermóide de boca não apresentam poli ou monoclonalidade do gene IgH. Todos os casos submetidos à análise do gene IgH eram fixados em formol 10% e embebidos em parafina. A padronização e execução deste experimento foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Patologia Bucal-FOUSP.

A PCR foi concebida inicialmente por Mullis (1986) e consiste de uma técnica “in vitro” fundamentalmente simples, rápida e sensível, capaz de produzir em poucas horas especificamente milhões de cópias de uma determinada sequência de DNA. O fator técnico responsável pelo desenvolvimento de um método de PCR adequado, foi o isolamento de uma DNA polimerase termo-estável encontrada em um micróbio, o *Thermus aquaticus*, habitante natural de fontes naturais de águas quentes. Esta enzima é denominada de Taq polimerase sendo capaz de permanecer ativa durante os processos de desnaturação do DNA ou ácido desoxirribonucléico complementar-cDNA (“complementary deoxyribonucleic acid”) por temperatura elevada, requeridos durante o início de cada ciclo de amplificação.

A PCR pode amplificar cadeias simples de DNA ou cDNA, este último produzido a partir de RNA via transcrição reversa, detectar diretamente e distinguir entre genes portadores de mutação em uma única base, ou

proporcionar quantidade suficiente de DNA para análise ou manipulação subsequente. A PCR consta basicamente de três etapas (Figura 4.1):

- 1) **Etapla de desnaturação:** Nesta etapa as seqüências gênicas (DNA ou cDNA) tornam-se disponíveis para cópia, através de desnaturação por temperatura elevada da dupla-fita de DNA ou cDNA.
- 2) **Etapla de associação:** As extremidades das seqüências gênicas alvo a ser copiada são definidas pela hibridização ou associação de dois oligonucleotídeos iniciadores, sintéticos e curtos (iniciador “forward” e iniciador “reverse”), denominados de iniciadores da amplificação. Esta associação possibilita a subsequente ligação e ativação da DNA polimerase. Esta etapa é normalmente realizada a uma temperatura próxima à de ligação dos iniciadores, no sentido de assegurar uma associação altamente específica.
- 3) **Etapla de extensão:** As seqüências gênicas alvo são copiadas, normalmente como uma dupla-fita de DNA, através da adição de novas bases de nucleotídeos (adenina, timina, citosina e guanina) às extremidades 3’ livres dos iniciadores e no sentido de 5’ para 3’. Isto é feito por uma DNA polimerase, sendo usualmente realizado a 70°C, que representa a temperatura na qual esta enzima se encontra mais ativa.

Assim que combinados, os reagentes da PCR são submetidos a 25 a 40 ciclos de amplificação em um bloco de aquecimento programável, que assegura temperaturas e tempos acurados, de forma que ao final de uma

PCR se tem uma quantidade suficiente de DNA para análise e/ou manipulação. A alta sensibilidade da PCR pode gerar efeitos indesejáveis, como a contaminação cruzada com outra amostra de DNA que pode dar resultados falsos positivos.

A reação da snPCR tem como objetivo aumentar a especificidade e eficiência da amplificação do DNA pela PCR. A snPCR tem o mesmo princípio da PCR, na qual se executa duas PCRs. Na segunda PCR da snPCR se utiliza, como DNA alvo a ser amplificado, uma determinada quantidade de DNA amplificado na primeira PCR e se altera o iniciador “reverse” (iniciador “reverse” interno), sendo este diferente do utilizado no primeiro ciclo e com uma localização de associação mais interna que a do iniciador “reverse” utilizado na primeira PCR.

Figura 4.1 - Esquema da reação em cadeia da polimerase demonstrando as três principais etapas da reação

Em todos os experimentos descritos abaixo foram utilizadas estratégias apropriadas de controle (uso de luvas, máscara, desinfecção do local de trabalho com álcool 70%, realização dos experimentos em câmara de fluxo laminar, uso de soluções e vidraria estéreis, etc), com o objetivo de evitar contaminação cruzada com DNA ou RNA exógeno.

Um dos primeiros passos para a realização da PCR ou snPCR é a obtenção do DNA genômico. Para isto foram obtidos 10 a 20 cortes de 10µm

de espessura do material, e estes transferidos para tubos de centrifugação de 1,5 ml.

4.3.1 *Preparo dos cortes*

Foi adicionado aos tubos de centrifugação 1 ml de xilol aquecido a 65°C, e mantidos por dez minutos. Os tubos foram então centrifugados a 10.000 rpm durante cinco minutos, desprezado o sobrenadante, seguido de novas trocas de xilol aquecido, até remoção completa da parafina. O corpo de fundo de tecido foi hidratado em cadeia descendente de etanol (etanol absoluto, etanol 95% e 70% em água bidestilada). Cada troca foi precedida de homogeneização e centrifugação a 10.000 rpm durante cinco minutos. Os corpos de fundo de tecido obtidos foram submetidos à técnica de extração de DNA genômico, descrita abaixo:

4.3.2 *Extração do DNA genômico*

O DNA genômico foi extraído pelo método orgânico baseado no protocolo descrito por Isola *et al.* (1994) e modificado para as nossas condições laboratoriais por Mesquita *et al.* (2001). Foi adicionado ao corpo de fundo de tecido 200µl de tampão de lise estéril (Cloreto de Sódio-NaCl 1M; Tris-HCL 1M, pH 8; EDTA- “Etylenediamine-Tetraacetic Acid” 0,5M, pH 8; SDS-“Sodium dodecyl sulfate” 10%) (SIGMA CHEMICAL CO, St. Louis, MO, USA) e proteinase K (Life Technologies, Gaithersburg, CA, USA) na concentração final de 500 µg/ml. Os tubos foram mantidos a 55°C em banho Maria por três a cinco dias até a completa dissolução do corpo de fundo de

tecido. Foi adicionada proteinase K (10 a 30 μ l na concentração de 250 μ g/ml) em intervalos de 24 horas, e os tubos foram invertidos pelo menos uma vez ao dia. Para inativação da proteinase K os tubos foram incubados a 95°C durante dez minutos.

Após inativação da proteinase K foi adicionado 1 ml de fenol saturado e tamponado (pH 8) (Life Technologies, Gaithersburg, CA, USA), e os tubos centrifugados a 3.000 rpm por 20 minutos, quando o sobrenadante foi transferido para outro tubo semelhante. Foi então acrescentado 1 ml de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) (Life Technologies, Gaithersburg, CA, USA), que homogeneizado, foi centrifugado a 3.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi novamente transferido para outro tubo de 1,5 ml e então acrescentado 1 ml de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após centrifugação a 3.000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi transferido para um tubo de 1,5 ml e seguiu para a precipitação do DNA genômico.

Para precipitação do DNA genômico foram adicionados 2 a 3 volumes de etanol absoluto gelado (-20°C) e 1/10 do volume de acetato de amônio 7M (SIGMA CHEMICAL CO, St. Louis, MO, USA), sendo o tubo deixado a -20°C por 18hs. O tubo foi centrifugado a 14.000 rpm durante 20 minutos e o corpo de fundo de DNA obtido foi lavado com etanol 70%. Após a evaporação do etanol 70% à temperatura ambiente o corpo de fundo de DNA foi dissolvido em 30 a 50 μ l de tampão de re-suspensão TE (Tris-HCL 10mM, pH 7,4 e EDTA 1mM, pH 8) e mantido a 4°C até quantificação e análise em gel de integridade.

4.3.4 Gel de Integridade

A qualidade do DNA genômico foi verificada pela eletroforese do DNA obtido (50 Volts por 10 minutos e 100 Volts por 60 minutos) em gel de agarose 0,7% (Seakem GTG, FMC Bioproducts, Uppsala, Sweden) contendo brometo de etídeo (0,5 g/ml) (Life Technologies, Gaithersburg, CA, USA), utilizando-se uma cuba horizontal (Life Technologies, Gaithersburg, CA, USA) com tampão de corrida TAE 1x (Tris 0,04M; ácido acético glacial 0,02M; EDTA 0,01M) (SIGMA CHEMICAL CO, St. Louis, MO, USA) pH 8,1. Para a visualização e documentação do gel de integridade do DNA genômico foi utilizado um transluminador de luz ultravioleta (UV) (Fotodyne, Inc.) e uma câmara fotográfica tipo polaróide (Fisher Biotech).

4.3.4 Quantificação e Amplificação do DNA

A quantidade e pureza do DNA genômico obtido foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (DU-640; BECKMAN).

Como controle de qualidade para verificar se as amostras de DNA genômico obtidas eram apropriadas para amplificação pela snPCR, o DNA genômico de todas as amostras foi previamente amplificado pela PCR, utilizando-se iniciadores para parte do exon 7 (190 pb) do gene da citoqueratina humana tipo 14 (CK-14) (cromossomo 17q). A sequência dos iniciadores foi obtida com base no GeneBank (número de acesso J00124), sendo:

Iniciador “Forward” (K7F3): 5'-GTTCTGAACCAAGAACTGAGGG-3'

Iniciador “Reverse” (K7F3N): 5'-CCAGAGAGAGGGCGAGAATTA-3'

A PCR para parte do exon 7 foi realizada em um termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc.) adicionando-se os seguintes reagentes a um tubo para PCR de 0,5 ml: formamida 1% (Life Technologies, Gaithersburg, CA, USA); tampão da PCR 1x (Tris-HCL 200mM, pH 8,4; KCl 500 mM) (Life Technologies, Gaithersburg, CA, USA); dNTP 0,3 mM (2'-deoxinucleotídeos 5'-trifosfato, dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Life Technologies, Gaithersburg, CA, USA); Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$) 1,5 mM (Life Technologies, Gaithersburg, CA, USA); iniciadores 100 pM (Life Technologies, Gaithersburg, CA, USA); *Taq* DNA polymerase recombinante 1 unidade (U) (Life Technologies, Gaithersburg, CA, USA); 1 µg de DNA genômico alvo; e volume de H_2O estéril para volume final de 25 µl. As condições da PCR utilizadas foram de desnaturação inicial a 94°C-3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C-1 minuto, associação a 58°C-1 minuto, extensão a 72°C-50 segundos e extensão final de 72°C-7 minutos. Casos que não apresentaram amplificação para o exon 7 da CK-14 não foram submetidos à amplificação do gene IgH.

A amplificação do gene IgH foi realizada através da snPCR, utilizando-se iniciadores para a região conservada FR3 do segmento V_H e para o segmento de junção J_H .

Na primeira PCR da snPCR os iniciadores utilizados foram o FR3A e o LJH (Wan *et al.*, 1990; Figura 4.2), sendo:

Iniciador “Forward” (FR3A): 5'-ACACGGC(C/T)(G/C)TGTATTACTGT-3'

Iniciador “Reverse” (LJH): 5'-TGAGGAGACGGTGACC-3'

A primeira PCR foi realizada em um termociclador adicionando-se os seguintes reagentes a um tubo para PCR de 0,5 ml: formamida 1%; tampão da PCR 1x; dNTP 0,3 mM; $MgCl_2$ 3,75 mM; iniciadores 100 pM; *Taq* DNA polymerase recombinante 1 U; 2 μ g de DNA genômico alvo; e volume de H_2O estéril para volume final de 20 μ l. As condições da PCR utilizadas foram de desnaturação inicial a 94°C-3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C-1 minuto, associação a 60°C-1 minuto, extensão a 72°C-50 segundos, e extensão final de 72°C-7 minutos.

Na segunda PCR da snPCR, foi utilizado 2 μ L do DNA amplificado na primeira PCR como DNA alvo, com os iniciadores FR3A e VLJH (Wan *et al.*, 1990; Figura 4.2):

Iniciador “Forward” (FR3A): 5'-ACACGGC(C/T)(G/C)TGTATTACTGT-3'

Iniciador “Reverse” (VLJH): 5'-GTGACCAGGGTNCCTTGGCCCCAG-3'

A segunda PCR foi realizada com os mesmos reagentes e concentrações da primeira PCR, mudando-se apenas o iniciador “reverse” (VLJH). As condições da PCR utilizadas também foram as mesmas, mudando-se o número de ciclos de amplificação, que na segunda PCR foi de 25 ciclos.

Figura 4.2 - Diagrama do gene da imunoglobulina de cadeia pesada com os seus respectivos segmentos, e a localização dos iniciadores FR3A e LJH utilizados na primeira PCR; e FR3A e VLJH utilizados na segunda PCR. IgH: gene da imunoglobulina de cadeia pesada; 1ª: primeira; 2ª: segunda; V_H: segmento variável; D_H: segmento de diversidade; J_H: segmento de junção; C_H: segmento constante; snPCR: "semi-nested PCR; pb: pares de base

Em todos os experimentos das PCRs foi realizado um controle negativo, constituído por todos o reagentes utilizados na reação e eliminação do DNA alvo.

O sucesso da amplificação do DNA genômico, pela PCR do exon 7 da CK-14 ou pela snPCR do gene IgH, foi visualizado através da eletroforese do DNA amplificado (100 Volts por 50 minutos) em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídeo (0,5 g/ml) e utilizando-se uma cuba horizontal com tampão de corrida TAE 1x, pH 8,1. Para a visualização e documentação do gel de amplificação do DNA genômico foi utilizado um transluminador de luz ultravioleta (UV) (Fotodyne, Inc.) e uma câmara fotográfica tipo polaróide (Fisher Biotech).

Em todos os géis (gel de integridade, gel de amplificação) foi colocado juntamente com as amostras a serem analisadas, um marcador de peso molecular em pares de base (pb), que representa uma mistura equimolar de fragmentos de DNA de 2000 a 100 pb (Low DNA Mass Ladder, Life Technologies, Gaithersburg, CA, USA).

4.3.5 Verificação da Monoclonalidade

A verificação da monoclonalidade dos tecidos considerados neste estudo, foi realizada através da análise da presença e tipo de bandas obtidas a partir da amplificação do DNA genômico pela snPCR para o gene IgH.

Nos casos de neoplasias de células linfóides B encontra-se e visualiza-se um padrão de banda única, discreta e de tamanho homogêneo (100-120pb), padrão este que indica a monoclonalidade; nos casos de tecido linfóide reacional (tonsila) encontra-se e visualiza-se um padrão de uma ou mais bandas, amplas e de tamanho heterogêneo (100-120pb), padrão este que indica policlonalidade; e nos casos de neoplasias de células linfóides T e NK e carcinoma epidermóide não se obtém amplificação (Trainor *et al.*, 1990; Wan *et al.*, 1990).

A porcentagem das neoplasias de células linfóides B de boca que apresentaram monoclonalidade foi calculada em relação ao número absoluto de casos de neoplasias de células linfóides B de boca analisados.

5 RESULTADOS

Este estudo constou de 46 casos de linfomas de boca. Destes casos, 36 pertencem ao arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da USP, seis casos ao arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFMG, três casos ao arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UNESP e três casos ao arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFPel.

Dos 46 casos, 42 (91,3%) representaram neoplasias de células linfóides B maduras e quatro (8,7%) casos foram neoplasias de células linfóides T e NK maduras. O número de casos e porcentagens de cada tipo histológico dos 46 casos de linfomas de boca reclassificados de acordo com a OMS-2001 (Jaffe *et al.*, 2001) estão expressos na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Reclassificação dos casos de linfomas de boca de acordo com a OMS- 2001 (Jaffe *et al.*, 2001) (N=46)

Linfomas de Boca	N	% em relação ao grupo	% em relação ao total
Neoplasias de Células Linfóides B Maduras			
Linfoma de Burkitt	15	35,7	32,6
Linfoma difuso de grandes células B	13	31	28,2
Linfoma de células B da zona marginal extranodal do tecido linfóide associado à mucosa (Linfoma MALT)	2	4,7	4,3
Linfoma de células do manto	1	2,4	2,2
Neoplasias de Células Linfóides B Maduras Associadas à Infecção HIV*			
Linfoma difuso de grandes células B, subtipo plasmoblástico	10	23,8	21,8
Linfoma de Burkitt	1	2,4	2,2
Total	42	100	91,3
Neoplasias de Células Linfóides T e NK Maduras			
Linfoma de células NK/T extranodal, tipo nasal	3	7,5	6,5
Linfoma de células T periféricas, não-especificado	1	2,5	2,2
Total	4	100	8,7

*HIV ("human immunodeficiency virus"); **N**: número de casos; **%**: porcentagem

5.1 Linfoma Difuso de Grandes Células B

O linfoma difuso de grandes células B e o seu subtipo histológico plasmoblástico foi o mais freqüente (50%) em nossa amostra, representando 23 casos. Foi também o mais freqüente entre as neoplasias de células linfóides B maduras, representado por 13 casos (28,2%) de pacientes imunocompetentes e dez casos (21,8%) de pacientes com imunodeficiência devido à infecção HIV.

5.1.1 Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGC-B)

Os dados clínicos referentes aos 13 casos de LDGC-B encontram-se

Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Dados clínicos referentes aos casos de linfoma difuso de grandes células B

Linfoma Difuso de Grandes Células B (N=13)	
Sexo	<i>Masculino</i> : 8 (61,5%) casos <i>Feminino</i> : 5 (38,5%) casos
Raça	<i>Leucoderma</i> : 10 (77%) casos <i>DNF</i> : 2 (15,3%) casos <i>Melanoderma</i> : 1 (7,7%) caso
Idade	<i>Variação</i> : 8 a 92 anos (média=56,9 anos) em 12 (92,3%) casos <i>DNF</i> : 1 (7,7%) caso <i>Distribuição</i> : 7ª década (3), 8ª década (2), 4ª década (2), 1ª década (1), 3ª década (1), 6ª década (1), 9ª década (1) e 10ª década (1)
Localização	<i>Tecido mole</i> : 13 (100%) casos <i>Maxila</i> : 6 (46,1%) casos (palato duro-2, maxila-1, maxila direita-1, tuber, 1, rebordo alveolar direito-1) <i>Mandíbula</i> : 3 (23,1%) casos (mandíbula-1, região retromolar-1, rebordo alveolar-1) <i>Mucosa jugal</i> : 2 (15,4%) casos <i>Região sublingual</i> : 1,0 (7,7%) caso <i>Faringe</i> : 1,0 (7,7%) caso
Radiográfico	<i>Tecido mole</i> : 13 (100%) casos <i>Sem envolvimento do tecido ósseo adjacente</i> : 6 (46,1%) casos <i>Envolvimento do tecido ósseo adjacente (radiotransparente)</i> : 5 (38,5%) casos <i>DNF</i> : 2 (15,4%) casos
Aspecto	<i>Vermelha</i> : 5 (38,5%) casos <i>Ulcerada</i> : 4 (30,75%) casos <i>DNF</i> : 4 (30,75%) casos
Sintomatologia	<i>Assintomática</i> : 6 (46,1%) casos <i>Sintomática</i> : 5 (38,5%) casos <i>DNF</i> : 2 (15,4%) casos
Tamanho	<i>Variação</i> : 4 a 7cm (média=5cm) em 7 (53,8%) casos <i>>10cm</i> : 3 (23,1%) casos <i>DNF</i> : 3 (23,1%) casos
Duração	<i>Variação</i> : 15 dias a 6 meses (média=2,8 meses) em 11 (84,6%) casos <i>DNF</i> : 2 (15,4%) casos
Diagnóstico clínico	<i>linfoma</i> (9), <i>carcinoma epidermóide</i> (2), <i>processo inflamatório crônico inespecífico</i> (1), <i>hiperplasia linfóide reacional</i> (1), <i>adenoma pleomórfico</i> (1), <i>sarcoma</i> (1) e <i>DNF</i> (1)

N: número de casos; **DNF**: dado não-fornecido

Na análise morfológica todos os casos de LDGC-B apresentaram padrão difuso de crescimento (Figura 5.1A), e foram compostos por células linfóides neoplásicas grandes (núcleo duas vezes o tamanho do núcleo de um linfócito não-neoplásico ou do tamanho do núcleo de um macrófago não-neoplásico). Mais especificamente, foi observada uma composição, em diferentes proporções, de dois tipos celulares; 1) centroblastos: células linfóides neoplásicas de tamanho grande, com núcleo arredondado a ovóide, vesicular, apresentando cromatina dispersa e nucléolos múltiplos (dois a quatro) localizados próximos à membrana nuclear; e citoplasma escasso e basofílico; 2) imunoblastos: células linfóides neoplásicas de tamanho grande, com núcleo arredondado a ovóide e vesicular apresentando cromatina dispersa e nucléolo único, proeminente e localizado centralmente; e citoplasma relativamente abundante e basofílico (Figura 5.1B). Foram observadas células linfóides neoplásicas pleomórficas e figuras de mitoses atípicas (Figura 5.1B). O estroma lesional era escasso e constituído por tecido conjuntivo frouxo bastante vascularizado. Raras áreas focais de células linfóides neoplásicas com uma disposição semelhante ao folículo linfóide (pseudofolículos linfóides neoplásicos) foram observadas em dois casos (Figura 5.1C).

Na imunofenotipagem (Tabela 5.7), as células linfóides neoplásicas de todos os casos de LDGC-B foram imunopositivas para CD20 e CD79a (Figuras 5.1E e 5.1F). Dos 13 casos, dez (77%) demonstraram células imunopositivas para CD45 (Figura 5.1D).

Figura 5.1 - **Linfoma Difuso de Grandes Células B.** **A)** Padrão difuso de crescimento (HE, 100x); **B)** células linfóides neoplásicas grandes: centroblasto (**destaque em amarelo**) e imunoblasto (**destaque em azul**), e figuras de mitose (**setas verde**) (HE, 640x); **C)** pseudofolículo linfóide neoplásico (HE, 320x); **D)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD45 (SABC, 640x); **E)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD20 (SABC, 640x); **F)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD79a (SABC, 640x); e **G)** identificação, com o anticorpo CD21, das células dendríticas foliculares, formando uma rede de permeio às células linfóides neoplásicas do pseudofolículo (SABC, 640x)

5.1.2 Linfoma Difuso de Grandes Células B, subtipo Plasmoblástico (LDGC-Bp)

Todos o pacientes com LDGC-Bp eram sabidamente HIV positivos. Os dados clínicos dos dez casos de LDGC-Bp são apreciados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Dados clínicos referentes aos casos de linfoma difuso de grandes células B, subtipo plasmoblástico

Linfoma Difuso de Grandes Células B, subtipo Plasmoblástico (N=10)	
Sexo	<i>Masculino: 7 (70%) casos</i> <i>Feminino: 3 (30%) casos</i>
Raça	<i>Leucoderma: 10 (100%) casos</i>
Idade	<i>Variação: 28 a 49 anos (média=32,2 anos) em 10 casos (100%)</i> <i>Distribuição: 3ª década (4), 4ª década (4), 5ª década (2)</i>
Localização	<i>Tecido mole: 10 (100%) casos</i> <i>Maxila: 7 (70%) casos (rebordo alveolar-3, palato-3 e gengiva-1)</i> <i>Mandíbula: 2 (20%) casos (gengiva posterior-2)</i> <i>DNF: 1 (10%) caso</i>
Radiográfico	<i>Tecido mole: 10 (100%) casos</i> <i>Sem envolvimento do tecido ósseo adjacente: 5 (50%) casos</i> <i>Envolvimento do tecido ósseo adjacente (radiotransparente): 5 (50%) casos</i>
Aspecto	<i>Vermelha: 4 (40%) casos</i> <i>Ulcerada: 4 (40%) casos</i> <i>Branca: 1 (10%) caso</i> <i>Semelhante à mucosa da boca: 1 (10%) caso</i>
Sintomatologia	<i>Sintomática: 5 (50%) casos</i> <i>Assintomática: 4 (40%) casos</i> <i>DNF: 1 (10%) caso</i>
Tamanho	<i>Variação: 1 a 9cm (média=3,6cm) em 8 (80%) casos</i> <i>>10cm: 1 (10%) caso</i> <i>DNF: 1 (10%) caso</i>
Duração	<i>Variação: 6 dias a 8 meses (média=1,9 mês) em 8 (80%) casos</i> <i>DNF: 2 (20%) casos</i>
Diagnóstico clínico	<i>linfoma (5), carcinoma epidermóide (4), sarcoma de Kaposi (2), DNF (2), neoplasia de glândula salivar (1) hiperplasia gengival (1), lesão periférica de células gigantes (1), micose profunda (1) e granuloma piogênico (1)</i>

N: número de casos; **DNF:** dado não-fornecido

Na análise morfológica todos os casos de LDGC-Bp apresentaram padrão de crescimento difuso (Figura 5.2A), e a semelhança do LDGC-B foram compostos por células linfóides neoplásicas grandes (semelhantes aos imunoblastos ou aos centroblastos) (Figura 5.2B). Foram observadas

também, em todos os casos de LDGC-Bp e em quantidade variável, células linfóides neoplásicas com diferenciação plasmocitóide. Estas eram células grandes (núcleo duas vezes o tamanho do núcleo de um linfócito não-neoplásico ou do tamanho do núcleo de um macrófago não-neoplásico) com núcleo arredondado a ovóide, excêntrico, vesicular apresentando cromatina dispersa com nucléolo único, proeminente, localizado centralmente ou nucléolos múltiplos (dois a três) localizados próximos à membrana nuclear; e citoplasma abundante e basofílico (Figura 5.2C). Células linfóides neoplásicas pleomórficas e figuras de mitoses foram observadas (Figura 5.2B). O estroma lesional era escasso e constituído por tecido conjuntivo frouxo bastante vascularizado.

Na imunofenotipagem (Tabela 5.7) as células linfóides neoplásicas de todos os casos de LDGC-Bp foram imunopositivas para VS38c (Figura 5.2E). Todos os casos apresentaram restrição de cadeia leve κ (seis casos, 60%) (Figura 5.2F) ou cadeia leve λ (quatro casos, 40%) (Figura 5.2G). Dos dez casos, nove (90%) demonstraram células imunopositivas para CD45 (Figura 5.2D).

Na ISH (Tabela 5.7, Figura 5.2H) verificou-se a presença do EBV nas células linfóides neoplásicas de todos os casos de LDGC-Bp.

Figura 5.2 - **Linfoma Difuso de Grandes Células B, subtipo Plasmoblástico**. A) Padrão difuso de crescimento (HE, 100x); B) células linfóides neoplásicas grandes: centroblasto (**seta amarela**), imunoblasto (**seta azul**) e figura de mitose (**seta verde**) (HE, 640x); C) células linfóides neoplásicas com diferenciação plasmocitóide (**destaque em amarelo**) (HE, 640x); D) células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD45 (SABC, 640x); E) células linfóides neoplásicas imunopositivas para VS38c (SABC, 640x); F) células linfóides neoplásicas imunopositivas para cadeia leve κ (SABC, 640x); G) células linfóides neoplásicas imunopositivas para cadeia leve λ (SABC, 640x) e H) identificação da presença do EBV na forma de “pinpoints”, de coloração acastanhada e localizados no núcleo das células linfóides neoplásicas (**destaque em verde**) (ISH, 640x)

5.2 Linfoma de Burkitt

O linfoma de Burkitt e sua respectiva variante clínica associada à infecção HIV foram o segundo (16 casos, 34,8%) mais freqüente. Quinze 15 casos (32,6%) eram em pacientes imunocompetentes e um caso (2,2%) em paciente com imunodeficiência devido à infecção HIV.

5.2.1 Linfoma de Burkitt (LB)

Os dados clínicos referentes aos 15 casos de LB podem ser visualizados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 - Dados clínicos referentes aos casos de linfoma de Burkitt

Linfoma de Burkitt (N=15)	
Sexo	<i>Masculino:</i> 11 (73,3%) casos <i>Feminino:</i> 4 (26,7%) casos
Raça	<i>Leucoderma:</i> 13 (86,6%) casos <i>Melanoderma:</i> 2 (13,4%) casos
Idade	<i>Variação:</i> 3 a 41 anos (média=11,8 anos) em 15 (100%) casos <i>Distribuição:</i> 1ª década (10), 2ª década (3), 3ª década (1), 5ª década (1)
Localização	<i>Tecido mole:</i> 14 (93,7%) casos <i>Mandíbula:</i> 11 (78,5%) casos (gengiva-7, mandíbula-2, rebordo alveolar-1 e região retromolar-1) <i>Maxila:</i> 3 (21,5%) casos (maxila posterior-1, fornex direito-1 e tuber esquerdo-1) <i>Intra-ósseo:</i> 1 (6,7%) caso <i>Mandíbula:</i> 1 (100%) caso (ângulo e ramo mandibular-1)
Radiográfico	<i>Tecido mole:</i> 14 (93,7%) casos <i>Envolvimento do tecido ósseo adjacente (radiotransparente):</i> 6 (42,8%) casos <i>DNF:</i> 5 (35,7%) casos <i>Sem envolvimento do tecido ósseo adjacente:</i> 3 (21,5%) casos <i>Intra-ósseo:</i> 1 (6,7%) caso <i>Radiotransparente:</i> 1 (100%) caso
Aspecto	<i>DNF:</i> 9 (60%) casos <i>Vermelha:</i> 4 (26,6%) casos <i>Ulcerada:</i> 2 (13,4%) casos
Sintomatologia	<i>DNF:</i> 11 (73,4%) casos <i>Sintomática:</i> 4 (26,6%) casos
Tamanho	<i>DNF:</i> 8 (53,4%) casos <i>>10cm:</i> 4 (26,6%) casos <i>3cm:</i> 3 (20%) casos
Duração	<i>Variação:</i> 20 dias a 4 meses (média=1,7 mês) em 9 (60%) casos <i>DNF:</i> 6 (40%) casos
Diagnóstico clínico	<i>DNF (5), linfoma (3), histiocitose (2), sarcoma (2), carcinoma epidermóide (1), metástase (1), tumor odontogênico (1), fibrossarcoma (1), neoplasia neurogênica (1), neoplasia maligna (1), angiossarcoma (1) e linfossarcoma de Burkitt (1)</i>

N: número de casos; DNF: dado não-fornecido

Na análise morfológica todos os casos de LB apresentaram padrão difuso de crescimento (Figura 5.3A), e foram compostos por células linfóides neoplásicas de tamanho médio (núcleo de tamanho igual ou menor do que o núcleo de um macrófago não-neoplásico) e citologicamente monomórficas (uniformidade em tamanho e forma). Estas eram células com núcleo arredondado, vesicular, apresentando membrana nuclear proeminente, cromatina agrupada e distribuída irregularmente, e nucléolos múltiplos (dois a cinco), proeminentes e localizados centralmente; e citoplasma relativamente abundante e basofílico que proporciona uma aparência de “coesão” das células linfóides neoplásicas (Figura 5.3B). Figuras de mitoses foram freqüentemente observadas, assim como alta taxa de morte celular representada por restos celulares e nucleares (“karyorrhexis”) (Figura 5.3B). A presença, em quantidade variável, de macrófagos não-neoplásicos, apresentando citoplasma grande e claro, e localizados entre as células linfóides neoplásicas foram observados em dez (66,7%) casos do LB. A distribuição destes macrófagos de permeio às células linfóides neoplásicas produz uma aparência de “estrelas no céu”, e tem sido denominado de “padrão de céu estrelado” (Figura 5.3A). O estroma lesional era escasso e constituído por tecido conjuntivo frouxo bastante vascularizado.

Na imunofenotipagem (Tabela 5.7) o anticorpo CD10 foi realizado em dez (66,7%) dos 15 casos de LB, e as células linfóides neoplásicas foram imunopositivas para este anticorpo em todos os dez (100%) casos (Figura 5.3D). Todos os 15 casos demonstraram células linfóides neoplásicas

imunopositivas para CD20 ou CD79a (Figuras 5.3E e 5.3F). Dos 15 casos, 14 (93,4%) demonstraram células imunopositivas para CD45 (Figura 5.3C).

A presença do EBV (Tabela 5.7, Figura 5.3G) nas células linfóides neoplásicas foi detectada em 13 (86,7%) dos 15 casos de LB pela ISH.

5.2.2 Linfoma de Burkitt associado à infecção HIV (LBh)

O LBh esteve presente em um paciente sabidamente HIV positivo, do sexo masculino, leucoderma e de 32 anos de idade. A lesão estava localizada no tuber da maxila e rebordo alveolar inferior com envolvimento do tecido ósseo adjacente (radiotransparente), era ulcerada, assintomática, media 3,5 cm, teve duração de 15 dias e diagnóstico clínico de linfoma de Burkitt.

Na análise morfológica o LBh representou um linfoma de Burkitt clássico (Figuras 5.3A e 5.3B), como descrito acima. Na imunofenotipagem as células linfóides neoplásicas foram imunopositivas para CD45, CD20 e CD79a (Figuras 5.3C, 5.3E e 5.3F), assim como foi detectada a presença do EBV pela ISH (Tabela 5.7, Figura 5.3G).

Figura 5.3 - **Linfoma de Burkitt**. **A)** Padrão difuso de crescimento com a presença de macrófagos não-neoplásicos (**setas marrom**), resultando no “padrão de céu estrelado” (HE, 100x); **B)** células linfóides neoplásicas homogêneas de tamanho médio (**destaque em amarelo**), figura de mitose (**seta verde**) e “karyorrhexis” (**seta azul**) (HE, 640x); **C)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD45 (SABC, 640x); **D)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD10 (SABC, 640x); **E)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD20 (SABC, 640x); **F)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD79a (SABC, 640x) e **G)** identificação da presença do EBV na forma de “pinpoints”, de coloração acastanhada e localizados no núcleo das células linfóides neoplásicas (**destaque em verde**) (ISH, 640x)

5.3 Linfoma de Células B da Zona Marginal Extranodal do Tecido Linfóide Associado à Mucosa (Linfoma MALT)

O linfoma MALT foi o quarto (4,3%) mais freqüente, representado por dois casos; sendo o terceiro (4,7%) mais freqüente entre as neoplasias de células linfóides B maduras.

Os dados clínicos referentes aos dois casos de linfoma MALT encontram-se na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 - Dados clínicos dos casos de linfoma de células B da zona marginal extranodal do tecido linfóide associado à mucosa (Linfoma MALT)

Linfoma de Células B da Zona Marginal Extranodal do Tecido Linfóide Associado à Mucosa (Linfoma MALT) (N=2)	
Sexo	<i>Masculino: 1 (50%) caso</i> <i>Feminino: 1 (50%) caso</i>
Raça	<i>Leucoderma: 2 (100%) casos</i>
Idade	<i>62 anos: 1 (50%) caso</i> <i>68 anos: 1 (50%) caso</i> <i>Distribuição: 7ª década (2)</i>
Localização	<i>Tecido mole: 2 (100%) casos</i> <i>Rebordo alveolar: 1 (50%) caso</i> <i>Lábio Inferior: 1 (50%) caso</i>
Radiográfico	<i>Tecido mole: 2 (100%) casos</i> <i>Sem envolvimento do tecido ósseo adjacente: 2 (100%) casos</i>
Aspecto	<i>DNF: 2 (100%) casos</i>
Sintomatologia	<i>Assintomática: 2 (100%) casos</i>
Tamanho	<i>1cm: 1 (50%) caso</i> <i>DNF: 1 (50%) caso</i>
Duração	<i>3 meses: 1 (50%) caso</i> <i>6 meses: 1 (50%) caso</i>
Diagnóstico clínico	<i>hiperplasia linfóide (1) e sarcoma (1)</i>

N: número de casos; **DNF:** dado não-fornecido

Na análise morfológica os casos de linfoma MALT apresentaram padrão difuso de crescimento (Figura 5.4A) e foram compostos por células linfóides neoplásicas de tamanho pequeno (núcleo de tamanho igual ao do linfócito não-neoplásico) e com heterogeneidade celular (diferenças em

tamanho e/ou forma). Estas incluíram: 1) células da zona marginal (semelhantes aos centrócitos): células linfóides neoplásicas de tamanho pequeno, com núcleo arredondado, irregular, clivado, vesicular apresentando cromatina dispersa e nucléolos pouco evidentes; e citoplasma relativamente abundante e pálido (Figura 5.4C); 2) células monocitóides: células linfóides neoplásicas de tamanho pequeno, com núcleo arredondado, apresentando cromatina condensada e nucléolo pouco evidente; e citoplasma abundante e pálido (Figura 5.4D); 3) linfócitos pequenos: células linfóides neoplásicas de tamanho pequeno que se assemelham a linfócitos não-neoplásicos (Figura 5.4D); 4) células com diferenciação plasmocitóide: células linfóides neoplásicas de tamanho pequeno que se assemelham a plasmócitos não-neoplásicos (Figura 5.4D). A quantidade destas células era variável, sendo as células da zona marginal presentes em maior quantidade. Células linfóides neoplásicas grandes (semelhantes aos imunoblastos ou aos centroblastos) foram observadas em pouca quantidade. Observou-se, nos dois casos, a presença de ductos de glândula salivar, que eram invadidos por agregados de células linfóides neoplásicas, resultando no quadro histopatológico de lesão linfo-epitelial (Figura 5.4B). Em um caso de linfoma MALT foi observada a presença de folículos linfóides reativos, no qual as células linfóides neoplásicas localizaram-se na zona marginal e distribuíram-se pela região interfolicular (Figura 5.4A). O estroma lesional era escasso e constituído por tecido conjuntivo frouxo bastante vascularizado.

Na imunofenotipagem (Tabela 5.7) as células linfóides neoplásicas dos dois casos de linfoma MALT foram imunopositivas para CD45, CD20 e

CD79a (Figuras 5.4E, 5.4F e 5.4G). Em um caso foi realizada imuno-histoquímica para anticorpo cadeia leve (λ e κ), o qual apresentou restrição de cadeia leve λ (Figura 5.4H).

Figura 5.4 - **Linfoma de Células B da Zona Marginal Extranodal do Tecido Linfóide Associado à mucosa (Linfoma MALT)**. **A)** Padrão difuso de crescimento com a presença de folículos linfóides (**setas marrom**) (HE, 100x); **B)** ductos de glândulas salivares (**setas amarelas**) invadidos pelas células linfóides neoplásicas formando a lesão linfo-epitelial (HE, 640x); **C)** células linfóides neoplásicas da zona marginal, semelhantes aos centrócitos (**destaque em amarelo**) (HE, 640x); **D)** células linfóides neoplásicas monocitóides, linfócitos pequenos e com diferenciação plasmocitóide, respectivamente no **destaque em azul** de cima para baixo (HE, 640x); **E)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD45 (SABC, 640x); **F)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD20 (SABC, 640x); **G)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD79a (SABC, 640x); **H)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para cadeia leve λ e **I)** identificação, com o anticorpo CD21, das células dendríticas foliculares, formando uma rede de permeio às células linfóides do folículo linfóide (SABC, 320x)

5.4 Linfoma de Células do Manto (LCM)

O LCM foi um dos linfomas de boca e a neoplasia de células linfóides B maduras menos freqüente (2,2%), representado por um caso.

O LCM esteve presente em um paciente do sexo masculino, leucoderma e de 66 anos de idade. A lesão estava localizada no palato duro sem envolvimento do tecido ósseo adjacente (radiotransparente), de coloração vermelha, assintomática, medindo 4 cm, com duração de um ano e teve diagnóstico clínico de lesão vascular.

Na análise morfológica o LCM apresentou padrão de crescimento vagamente nodular (Figura 5.5A), e era composto por células linfóides neoplásicas de tamanho pequeno a médio, e citologicamente homogêneas (semelhantes aos centrócitos), com núcleos arredondados, com contorno nuclear irregular, cromatina condensada ou moderadamente dispersa e nucléolos pequenos e pouco evidentes, e citoplasma escasso (Figura 5.5B). O estroma lesional era escasso e constituído por tecido conjuntivo frouxo bastante vascularizado.

Na imunofenotipagem (Tabela 5.7) do LCM, as células linfóides neoplásicas foram imunopositivas para CD45, CD5, CD20, CD79a e para ciclina D1 (Figuras 5.5C, 5.5D, 5.5E, 5.5F e 5.5G).

Figura 5.5 - **Linfoma de Células do Manto**. **A)** Padrão de crescimento vagamente nodular (**setas marrom**) (HE, 100x); **B)** células linfóides neoplásicas da zona marginal, semelhantes aos centrócitos (**destaque em amarelo**) (HE, 640x); **C)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD45 (SABC, 640x); **D)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD5 (SABC, 640x); **E)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD20 (SABC, 640x); **F)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD79a; **G)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para ciclina D1 (**setas vermelhas**) e **H)** identificação, com o anticorpo CD35, das células dendríticas foliculares, formando uma rede de permeio às células linfóides neoplásicas (SABC, 640x)

5.5 Linfoma de Células NK/T Extranodal, tipo Nasal (LNK/Tn)

O LNK/Tn foi o terceiro (6,5%) mais freqüente, representado por três casos, sendo também o mais freqüente (75%) entre as neoplasias de células linfóides T e NK maduras.

Os dados clínicos dos três casos de LNK/Tn são apreciados na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 - Dados clínicos referentes aos casos de linfoma células NK/T extranodal, tipo nasal

Linfoma de Células NK/T Extranodal, tipo Nasal (N=3)	
Sexo	<i>Masculino</i> : 1 (33,4%) caso <i>Feminino</i> : 1 (33,3%) caso <i>DNF</i> : 1 (33,3%) caso
Raça	<i>Leucoderma</i> : 2 (66,4%) casos <i>DNF</i> : 1 (33,3%) caso
Idade	<i>Varição</i> : 26 a 37 anos (média=32,3 anos) em 3 (100%) casos <i>Distribuição</i> : 4ª década (2) e 3ª década (1)
Localização	<i>Tecido mole</i> : 3 (100%) casos <i>Maxila</i> : 3 (100%) casos (palato-2, rebordo alveolar-1)
Radiográfico	<i>Tecido mole</i> : 3 (100%) casos <i>Sem envolvimento do tecido ósseo adjacente</i> : 2 (66,7%) casos <i>Envolvimento do tecido ósseo adjacente (radiotransparente)</i> : 1 (33,3%) caso
Aspecto	<i>Vermelha</i> : 1 (33,4%) caso <i>Ulcerada</i> : 1 (33,3%) caso <i>DNF</i> : 1 (33,3%) caso
Sintomatologia	<i>Assintomática</i> : 1 (33,4%) caso <i>Sintomática</i> : 1 (33,3%) caso <i>DNF</i> : 1 (33,3%) caso
Tamanho	<i>DNF</i> : 2 (66,7%) casos <i>3,5cm</i> : 1 (33,3%) caso
Duração	<i>Varição</i> : 2 a 10 meses (média=5 meses) em 3 (100%) casos
Diagnóstico clínico	<i>linfoma</i> (1), <i>processo proliferativo não-neoplásico</i> (1), <i>linfoma angiocêntrico</i> (1), <i>granuloma letal mediano</i> (1) e <i>lesão glandular</i> (1)

N: número de casos; **DNF**: dado não-fornecido

Na análise morfológica os casos de LNK/Tn apresentaram padrão difuso de crescimento associado aos padrões angiocêntrico (Figura 5.6A), angio-invasivo (Figura 5.6B) e angiodestrutivo (Figura 5.6C); e eram

compostos por células linfóides neoplásicas polimórficas com espectro morfológico amplo. Foram observadas células linfóides neoplásicas de tamanho pequeno, médio, grande ou células anaplásicas (Figura 5.6D). Especificamente, foi observada mais uma composição de células linfóides neoplásicas pequenas e grandes. As células linfóides neoplásicas pequenas apresentaram núcleo arredondado, irregular, com cromatina condensada e nucléolo pequeno e pouco evidente, e citoplasma relativamente abundante e pálido (Figura 5.6D). As células linfóides neoplásicas grandes apresentaram núcleo arredondado, vesicular, com cromatina dispersa e nucléolo pequeno e pouco evidente, e citoplasma escasso e pálido (Figura 5.6D). Figuras de mitoses foram observadas. Infiltrado de plasmócitos, linfócitos reacionais e histiócitos foi observado em quantidade variável. Áreas de necrose por coagulação foram verificadas em um caso (Figura 5.6C). O estroma lesional era escasso e constituído por tecido conjuntivo frouxo bastante vascularizado.

Na imunofenotipagem (Tabela 5.7) as células linfóides neoplásicas dos casos de LNK/Tn foram imunopositivas para CD45RO, CD3 ϵ , CD2, CD16 e CD56 (Figuras 5.6F, 5.6G, 5.6H, 5.6I e 5.6J). Um (33,4%) caso demonstrou células imunopositivas para CD45 (Figura 5.6E).

Na ISH (Tabela 5.7, Figura 5.6K) verificou-se a presença do EBV nas células linfóides neoplásicas de dois (66,7%) casos de LNK/Tn.

Figura 5.6 - **Linfoma de Células NK/T Extranodal, tipo Nasal.** **A)** Padrão de crescimento difuso e angiocêntrico (**seta marrom**) (HE, 200x); **B)** padrão angio-invasivo (**seta azul**) (HE, 640x); **C)** padrão angiodestrutivo (**seta vermelha da esquerda**) e área de necrose (**seta vermelha da direita**) (HE, 200x); **D)** células linfóides neoplásicas grandes, pequenas e anaplásicas, respectivamente, no **destaque amarelo** de cima para baixo (HE, 640x); **E)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD45 (SABC, 640x); **F)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD45RO (SABC, 640x); **G)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD3ε (SABC, 640x); **H)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD2 (SABC, 640x); **I)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD16 (SABC, 640x); **J)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD56 (SABC, 640x) e **K)** identificação da presença do EBV na forma de “pinpoints”, de coloração acastanhada e localizados no núcleo das células linfóides neoplásicas (**destaque em verde**) (ISH, 640x)

5.6. Linfoma de Células T Periféricas, não-Especificado (LTn)

O LTn foi um dos linfomas de boca e a neoplasia linfóide de células T e NK maduras menos freqüente (2,2%), representado por um caso.

O LTn esteve presente em um paciente do sexo masculino, leucoderma, com 71 anos de idade. A lesão estava localizada no fundo de sulco da maxila esquerda, região do 26, com envolvimento do tecido ósseo adjacente (radiotransparente), de aspecto ulcerado e coloração vermelha, sintomática, medindo 6 cm, com duração de dez dias e teve diagnóstico clínico de linfoma.

Na análise morfológica o caso de LTn apresentou padrão difuso de crescimento (Figura 5.7A) e era composto por células linfóides neoplásicas polimórficas com espectro morfológico amplo. Mais especificamente foi observada uma composição de células linfóides neoplásicas pequenas e grandes. A diferença entre os dois tipos celulares foi o tamanho do núcleo, sendo pleomórfico nos dois tipos celulares (Figura 5.7B). Figuras de mitoses foram observadas (Figura 5.7B). O estroma lesional era escasso e constituído por tecido conjuntivo frouxo bastante vascularizado.

Na imunofenotipagem (Tabela 5.7) as células linfóides neoplásicas do LTn foram imunopositivas para CD45, CD45RO e CD3 (Figuras 5.7C, 5.7D e 5.7E).

Figura 5.7 - **Linfoma de Células T Periféricas, não-Especificado**. **A)** Padrão difuso de crescimento (HE, 100x); **B)** figura de mitose (**seta verde**) e células linfóides neoplásicas grandes e pequenas pleomórficas, respectivamente, no **destaque amarelo** superior e inferior (HE, 640x); **C)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD45 (SABC, 640x); **D)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD45RO (SABC, 640x) e **E)** células linfóides neoplásicas imunopositivas para CD3 (SABC, 640x)

Tabela 5.7 - Imunofenotipagem e hibridização “in situ” (ISH) do DNA do EBV dos linfomas de boca (N=46)

LINFOMAS DE BOCA						ANTICORPOS										ISH				
						Anticorpos associados à células linfóides B		Anticorpos associados à células linfóides T				Anticorpos associados à células linfóides NK		Outros anticorpos						
NEOPLASIAS DE CÉLULAS LINFOIDES B MADURAS						CD5	CD10	CD20	CD79a	VS38c	Cadeia leve κ	Cadeia leve λ	CD2	CD3	CD45RO	CD16	CD56	Ciclina D1	EBV	
NÚMERO DE CASOS POSITIVOS/NÚMERO DE CASOS REALIZADOS																				
Linfoma de Burkitt (N=15)						NR	10/10	14/15	14/15	NR	NR	NR	NR	0/15	0/15	NR	NR	14/15	NR	13/15
Linfoma difuso de grandes células B (N=13)						NR	NR	13/13	13/13	0/13	NR	NR	NR	0/13	0/13	NR	NR	10/13	NR	NR
Linfoma de células B da zona marginal extranodal do tecido linfóide associado à mucosa (Linfoma MALT) (N=2)						NR	NR	2/2	2/2	NR	0/1	1/1	NR	0/2	0/2	NR	NR	2/2	NR	NR
Linfoma de células do manto (N=1)						1/1	NR	1/1	1/1	NR	NR	NR	NR	0/1	0/1	NR	NR	1/1	1/1	NR
NEOPLASIAS DE CÉLULAS LINFOIDES B MADURAS ASSOCIADAS À INFECÇÃO HIV*																				
Linfoma difuso de grandes células B, subtipo plasmoblástico (N=10)						NR	NR	0/10	0/10	10/10	6/10	4/10	NR	0/10	0/10	NR	NR	9/10	NR	10/10
Linfoma de Burkitt (N=1)						NR	NR	1/1	1/1	0/1	NR	NR	NR	0/1	0/1	NR	NR	1/1	NR	1/1
NEOPLASIAS DE CÉLULAS LINFOIDES T E NK MADURAS																				
Linfoma de células NK/T extranodal, tipo nasal (N=3)						NR	NR	0/3	0/3	NR	NR	NR	3/3	3/3(ε)	3/3	3/3	3/3	1/3	NR	2/3
Linfoma de células T periféricas, não-especificado (N=1)						NR	NR	0/1	0/1	NR	NR	NR	0/1	1/1	1/1	0/1	0/1	1/1	NR	0/1

N: número de casos; *HIV (“human immunodeficiency virus”); NR: anticorpo não-realizado; ε: “epsilon”

5.7 Células Dendríticas

Os anticorpos CD21, CD35, caldesmona, CD34, proteína S100 e CD1a foram realizados em todos os 46 casos.

O CD34 imunodetectou vasos sanguíneos e células endoteliais localizados por entre as células linfóides neoplásicas (Figura 5.8C).

5.7.1 Células Dendríticas Foliculares

Células dendríticas foliculares, identificadas pelos anticorpos CD21 e CD35, foram observadas em quatro (8,7%) dos 46 casos, a saber: dois casos de LDGC-B, um caso de linfoma MALT e no caso de LCM. O padrão de imuno-expressão destes dois anticorpos foi coincidente.

No LDGC-B as células dendríticas foliculares foram observadas nos dois casos que tiveram pseudofolículos linfóides neoplásicos. O padrão de imuno-expressão foi a formação de uma rede por entre as células linfóides neoplásicas (Figura 5.1G). No linfoma MALT as células dendríticas foliculares foram observadas no caso que apresentou folículos linfóides reativos. O padrão de imuno-expressão foi a formação de uma rede por entre as células linfóides (Figura 5.4I). No LCM o padrão foi a formação de uma rede desorganizada e expandida localizada na periferia da neoplasia e por entre as células linfóides neoplásicas (Figura 5.5H).

Células dendríticas foliculares, identificadas pelo anticorpo caldesmona foram observadas em todos os 46 (100%) casos de linfomas de boca.

O padrão de imuno-expressão das células dendríticas foliculares/caldesmona+ foi coincidente em todos os tipos histológicos, sendo representado pela formação de uma rede, que por raras vezes apresentou áreas de descontinuidade, localizada por entre as células linfóides neoplásicas de todo o espécime (Figuras 5.8A e 5.8B). Nos dois casos de LDGC-B, no caso de linfoma MALT e LCM, a imuno-expressão das células dendríticas foliculares/caldesmona+ foi coincidente com o padrão de imuno-expressão do CD21 e CD35.

5.7.2 Células Dendríticas Interdigitantes

Células dendríticas identificadas pela proteína S100 representaram células dendríticas interdigitantes. Não se verificou qualquer tipo celular imunopositivos para o anticorpo CD1a em todos (100%) os 46 casos.

As células dendríticas interdigitantes/S100+ foram observadas em todos (100%) os 46 casos e o padrão de imuno-expressão foi coincidente em todos os tipos histológicos. Este padrão foi a detecção de células grandes, com núcleo arredondado (quando possível sua visualização na imuno-histoquímica) e citoplasma irregular e dendrítico. Estas células foram distribuídas por entre as células linfóides neoplásicas de todo o espécime, em quantidade variável (Figura 5.8D). Não houve imunodeteção de uma rede nos pseudofolículos dos dois casos de LDGC-B, nos folículos linfóides do caso de linfoma MALT, e nas áreas identificadas pelos anticorpos CD21, CD35 e caldesmona no LCM, pela proteína S100.

Os valores das médias aritméticas da quantificação da imunopressão das células dendríticas foliculares/caldesmona+ e das células dendríticas interdigitantes/S100+ em cada tipo histológico dos linfomas de boca encontram-se na Tabela 5.8. Análise estatística destes valores foi realizada com as amostras dos LDGC-B, LDGC-Bp e LB. Observou-se diferença estatisticamente significativa entre o LDGC-B/LDGC-Bp e o LB em ambas quantificações ($P < 0,01$).

Tabela 5.8 - Valores das médias aritméticas da quantificação das células dendríticas foliculares/caldesmona+ e das células dendríticas interdigitantes/ S100+ nos linfomas de boca (N=46)

Linfomas de Boca Neoplasias de Células Linfóides B Maturas	Células Dendríticas	
	Foliculares/Caldesmona+	Interdigitantes/S100+
	$\bar{X}$	$\bar{X}$
Linfoma de Burkitt (N=15)	9,4	1,6
Linfoma difuso de grandes células B (N=13)	15	2,7
Linfoma de células B da zona marginal extranodal do tecido linfóide associado à mucosa (Linfoma MALT) (N=2)	16	7
Linfoma de células do manto (N=1)	23,7	9,7
Neoplasias de Células Linfóides B Maturas Associadas à Infecção HIV*	5	1,5
Linfoma difuso de grandes células B, subtipo plasmoblástico (N=10)	12	2,6
Linfoma de Burkitt (N=1)	5	1,5
Neoplasias de Células Linfóides T e NK Maturas		
Linfoma de células NK/T extranodal, tipo nasal (N=3)	5,6	1,2
Linfoma de células T periféricas, não-especificado (N=1)	10,1	0,2

*HIV ("human immunodeficiency virus"); N: número de casos; $\bar{X}$: valores das médias aritméticas

Figura 5.8. **A) Células Dendríticas Foliculares** identificadas pelo anticorpo caldesmona e formando uma rede de permeio às células linfóides neoplásicas de um caso de linfoma difuso de grandes células B (SABC, 200x); **B) Células Dendríticas Foliculares** identificadas pelo anticorpo caldesmona com descontinuidade da rede, de permeio às células linfóides neoplásicas de um caso de linfoma difuso de grandes células B (SABC, 200x); **C) Vasos Sangüíneos e Células Endoteliais** imunodetectados pelo anticorpo CD34 em um caso de linfoma difuso de grandes células B (SABC, 200x) e **D) Células Dendríticas Interdigitantes** identificadas pelo anticorpo proteína S100 e apresentado citoplasma irregular e dendrítico de permeio às células linfóides neoplásicas de um caso de linfoma difuso de grandes células B (SABC, 320x)

5.8 Monoclonalidade das Neoplasias de Células Linfóides B Maduras de Boca

Foram incluídos neste experimento 19 casos de linfomas de boca, a saber: 1) 16 casos de neoplasias de células linfóides B maduras: LDGC-B (5), LDGC-Bp (3), LBh (1); linfoma MALT (1), LCM (1) e LB (5); 2) três casos de neoplasias de células linfóides T e NK maduras: LNK/Tn (3); além dos casos de tecido linfóide reacional (tonsila, 2), de mieloma plasmocítico de boca (2), e de carcinoma epidermóide de boca (2). Não foi incluído um número maior de casos de linfomas de boca, neste experimento, em função da pouca quantidade de material para a extração de DNA genômico.

O gel de integridade mostrou para as 25 amostras de tecido utilizadas melhores resultados para DNA genômico de baixo peso molecular (Figura 5.9, **Gel de Integridade**). A quantidade do DNA genômico obtida das 25 amostras variou de 0,6 a 23,5 µg/µl, e a pureza variou de 1,3 a 1,9.

Na amplificação do DNA genômico de todas as 25 amostras pela PCR para parte do exon 7 (190pb) da CK-14, não se obteve amplificação em um caso de LDGC-B e um caso de LB (Figura 5.9, **Gel CK-14**). Estas duas amostras não foram submetidas à amplificação pela snPCR do gene IgH.

Na amplificação do DNA genômico das 23 amostras pela snPCR para o gene IgH, obteve-se amplificação nos dois casos de tecido linfóide reacional (tonsila) e em 14 (87,5%) dos 16 casos de neoplasias de células linfóides B maduras de boca. Não houve amplificação nos dois casos de carcinoma epidermóide de boca e nos três casos de neoplasias de células linfóides T e NK maduras de boca. Mais especificamente nos 14 casos de neoplasias de células linfóides B maduras de boca foi observada amplificação nos dois (100%) casos de mieloma plasmocítico de boca, em três (75%) dos quatro casos de LDGC-B, nos três (100%) casos de LDGC-Bp, no caso (100%) de LBh, no caso (100%) de linfoma MALT, no caso (100%) de LCM e em três (75%) dos quatro casos de LB (Figura 5.9, **Gel IgH**).

O padrão de banda nos casos de neoplasias de células linfóides B maduras de boca foi padrão monoclonal, ou seja, presença e visualização de uma banda única, discreta e de tamanho homogêneo (100-120pb). Nos casos de tecido linfóide reacional-tonsila, o padrão de banda foi policlonal,

ou seja, presença e visualização de uma ou mais bandas, amplas e de tamanho heterogêneo (100-120pb) (Figura 5.9, **Gel IgH**).

Figura 5.9. **Gel de Integridade.** Verifica-se melhores resultados de DNA genômico de baixo peso molecular nas 25 amostras (eletroforese em gel agarose 0,7% com brometo de etídeo 0,5 g/ml);

Gel CK-14. Verifica-se amplificação do exon 7 da CK-14 (190pb) do DNA genômico em 23 amostras do experimento e ausência de amplificação em um caso de LDGC-B (seta marrom) e em um caso de LB (seta azul escuro) (eletroforese em gel agarose 2% com brometo de etídeo 0,5 g/ml);

Gel IgH. Verifica-se amplificação do IgH (80 a 120pb) com padrão de banda monoclonal nos dois casos de Mp, em três casos de LDGC-B, nos três casos de LDGC-Bp, no caso de LBh, no caso de MALT, no caso de LCM, e em três casos de LB; amplificação com padrão de banda policlonal nos dois casos de tonsilas; e não-amplificação nos dois casos de carcinoma epidermóide de boca, em um caso de LDGC-B, nos três casos de LNK/Tn e em um caso de LB (eletroforese em gel agarose 2% com brometo de etídeo 0,5 g/ml);

M: Marcador de Peso Molecular em pares de base (pb); **C-:** Controle Negativo; **T:** Tonsilas; **Mp:** Mielomas Plasmocíticos; **Ca:** Carcinomas Epidermóides; **LDGC-B:** Linfomas Difusos de Grandes Células B; **LDGC-Bp:** Linfomas Difusos de Grandes Células B, subtipo Plasmoblástico; **LBh:** Linfoma de Burkitt Associado à Infecção HIV; **LNK/Tn:** Linfomas de Células NK/T Extranodal, tipo Nasal; **MALT:** Linfoma de Células B da Zona Marginal Extranodal do Tecido Linfóide Associado à Mucosa (Linfoma MALT); **LCM:** Linfoma de Células do Manto e **LB:** Linfomas de Burkitt

6 DISCUSSÃO

Neste estudo foram analisadas as características clínicas, realizada a reclassificação de acordo com a classificação da OMS-2001, verificada a presença do EBV, a confirmação da monoclonalidade das neoplasias de células linfóides B e a caracterização das células dendríticas em 46 casos de linfomas de localização específica, a boca. Pelo fato dos linfomas representarem um grupo importante, complexo e heterogêneo de distúrbios proliferativos malignos originados das células do tecido linfóide, se justifica e faz pertinente o conhecimento de todos os aspectos destas entidades. Assim, é possível chegar a um diagnóstico conclusivo, o que conduzirá o paciente a um tratamento adequado.

O ponto inicial para classificação dos LNH é a determinação da linhagem celular, B ou T e NK, da qual se originam. A primeira classificação a fazer menção aos subtipos B ou T foi a de Lukes & Collins-1974. Entretanto, a subdivisão em B ou T foi basicamente realizada de acordo com as características citomorfológicas das células linfóides neoplásicas, o que a princípio parece difícil, uma vez que os critérios citomorfológicos utilizados para distinguir células linfóides B ou T neoplásicas são ineficazes.

Nas duas mais recentes classificações das neoplasias do tecido linfóide, R.E.A.L.-1994 e OMS-2001, os LNH são classificados nas categorias B ou T e NK. Baseiam-se na identificação de marcadores específicos (sistema CD), com o uso de anticorpos monoclonais ou policlonais, em associação à técnicas de citometria de fluxo à imuno-histoquímica de material congelado ou fixado em formol. Nos laboratórios de anatomia patológica, onde o material de trabalho é representado principalmente por tecidos fixados em formol, a utilização da imuno-histoquímica representa uma chave importantíssima para a imunofenotipagem dos LNH.

A imunofenotipagem é crucial para o diagnóstico das neoplasias do tecido linfóide, tanto que ela é detalhada para cada tipo histológico dos linfomas e leucemias nas classificações da R.E.A.L.-1994 e da OMS-2001, sendo até possível inferir que hoje não se diagnostica neoplasias do tecido linfóide sem a utilização da imunofenotipagem. Informações clínicas, morfológicas e genéticas são também utilizadas no diagnóstico das neoplasias do tecido linfóide (Harris *et al.*, 1994; Jaffe *et al.*, 2001). Justifica-se assim a utilização, no presente estudo, das características clínicas, da pesquisa do EBV e da análise do gene IgH para o diagnóstico dos linfomas de boca.

As classificações da R.E.A.L.-1994 e da OMS-2001 são correlacionadas, sendo a OMS-2001 uma R.E.A.L.-1994 atualizada. Todos os autores das maiores classificações das neoplasias hematológicas concordam que a classificação da OMS-2001 é a primeira de abrangência

mundial, verdadeira e de consenso. Assim, se justifica a sua utilização em nosso estudo.

Na OMS-2001 são reconhecidos 18 tipos de LNH e leucemias dentro do grupo de neoplasias de células linfóides B precursoras e maduras; e 16 tipos de leucemia e LNH dentro do grupo de neoplasias de células linfóides T e NK; além de duas e uma entidades de potencial maligno incerto no primeiro e segundo grupo, respectivamente. Cinco tipos histológicos de LH são reconhecidos (Jaffe *et al.*, 2001).

Entre os 46 casos de linfomas de boca estudados, foram reconhecidas quatro neoplasias de células linfóides B e duas neoplasias de células linfóides T e NK. Todas representaram LNH e eram de células linfóides maduras. O LH raramente localiza-se na boca. As suas manifestações na boca representam uma associação com LH localizado nos linfonodos cervicais ou um sítio secundário quando existe disseminação sistêmica do LH (Aozasa *et al.*, 1985; Freeman *et al.*, 1972).

Em nosso estudo as neoplasias de células linfóides B maduras foram as mais freqüentes, representando 91,3% da amostra. Este achado é também encontrado em outros estudos que trazem a freqüência de neoplasias do tecido linfóide (Handles & Howell, 1986; Howell *et al.*, 1987; Pinto Jr.; 1989; Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997; Armitage & Weisenburger, 1998; Nocini *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2000; Hsi & Yegappan, 2001). Entre as neoplasias de células linfóides B maduras o LDGC-B foi o freqüente; como demonstrado em outros estudos (Eisenbud *et al.* 1983; Slootweg *et al.* 1985; Handles & Howell, 1986; Howell *et al.*, 1987;

Pinto Jr., 1989; Fukuda *et al.*, 1987; Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997; Nocini *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2000).

O LDGC-B é definido como uma proliferação difusa de grandes células linfóides neoplásicas B que apresentam o núcleo duas vezes o tamanho do núcleo de um linfócito não-neoplásico, ou do tamanho do núcleo de um macrófago não-neoplásico, e as suas características morfológicas podem diferir entre os seus subtipos morfológicos. As células cuja origem se pressupõe para o LDGC-B são células B periféricas originadas do centro germinativo ou pós-centro germinativo (Jaffe *et al.*, 2001).

A(s) causa(s) do LDGC-B permanece(m) desconhecida(s). Ele freqüentemente se origina “*de novo*” (lesão primária) ou pode representar a progressão (lesão secundária) de uma neoplasia do tecido linfóide, como o linfoma linfocítico, linfoma folicular, linfoma de célula B da zona marginal ou LH clássico, predominância linfocítica nodular (Jaffe *et al.*, 2001). No presente estudo, todos os 23 casos de LDGC-B, assim com os outros 23 casos de linfomas de boca, representaram lesões primárias de boca.

Quarenta por cento dos casos de LDGC-B são localizados em sítios extranodais, sendo o trato gastrointestinal (estômago e região do íleo) o local mais comum. Outros sítios extranodais, como a boca, são locais incomuns para o LDGC-B (Harris *et al.*, 1994; Jaffe *et al.*, 2001).

O LDGC-B (13 casos) foi mais freqüente em pacientes do sexo masculino, leucodermas e distribuídos em faixa etária ampla, assim como nos estudos de linfoma de boca de Eisenbud *et al.* (1983); Slootweg *et al.* (1985); Howell *et al.* (1987); Fukuda *et al.* (1987); Pinto Jr. (1989); Nocini *et*

al. (2000) e Yin *et al.* (2000), e nos estudos de LNH do Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project (1997) e Armitage & Weisenburger (1998).

O LDGC-B localizou-se especialmente na maxila em região de palato e rebordo alveolar, apresentou envolvimento do tecido ósseo adjacente, ulceração ou coloração vermelha da mucosa bucal e sintomatologia dolorosa; aspectos clínicos estes observados em outros estudos de linfomas de boca (Slootweg *et al.*, 1985; Fukuda *et al.*, 1987; Howell *et al.* 1987; Yin *et al.* 2000).

Sete dos 13 casos de LDGC-B tinham tamanho médio de 5cm e três foram maiores que 10cm. Os estudos de linfoma de boca assinalam o aumento de volume como um achado freqüente destas lesões, mas eles não descrevem especificamente o tamanho (Eisenbud *et al.*, 1983; Slootweg *et al.*, 1985; Handles & Howell, 1986; Howell *et al.*, 1987; Fukuda *et al.*, 1987; Nocini *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2000). A duração dos sinais e sintomas clínicos do LDGC-B variou de 15 dias a seis meses em 11 casos. Isto corrobora com a literatura, que descreve as lesões dos linfomas de boca como sendo de surgimento súbito e de progressão rápida (Eisenbud *et al.*, 1983; Slootweg *et al.*, 1985). As informações dos dados clínicos do LDGC-B localizado na boca podem ajudar no direcionamento do diagnóstico, assim como, indicam o caráter neoplásico desta entidade.

O LDGC-B apresentou padrão difuso de crescimento, com a substituição da lâmina própria e submucosa pelas células linfóides neoplásicas. Esta é a morfologia descrita do LDGC-B, que substitui a arquitetura normal do linfonodo ou do tecido extranodal com um padrão

difuso de crescimento, sendo as células neoplásicas representadas por células linfóides grandes, transformadas (Harris *et al.*, 1994; Jaffe *et al.*, 2001).

Os 13 casos de LDGC-B foram imunopositivos para CD20 e CD79a e imunonegativos para CD3 e CD45RO, corroborando com outros estudos, e demonstrando a sua monoclonalidade e origem a partir de células linfóides B. Além destes anticorpos, outros têm sido utilizados na imunofenotipagem do LDGC-B, como o CD19, CD22, Igs, CD5 e CD10. LDGC-B CD5+ são imunonegativos para ciclina D1, o que representa uma das chaves para a sua distinção com a variante blastóide do LCM. A imuno-expressão do CD138; uma proteoglicana ligada ao colágeno tipo 1 da família “syndecan-1”, sendo um anticorpo que detecta diferenciação plasmocitóide; é encontrada em uma minoria de casos (Handles & Howell, 1986; Pinto Jr., 1989; Nocini *et al.*, 2000; Yin *et al.* 2000; Jaffe *et al.*, 2001). No presente estudo, todos os casos de LDGC-B foram imunonegativos para o VS38c.

Os anticorpos CD19 e CD22 não foram utilizados em nosso estudo para a imunofenotipagem do LDGC-B, pois os mesmos são disponíveis no mercado apenas para material congelado. Quanto aos anticorpos CD10, CD5, imunoglobulinas de cadeia pesada (IgM, IgG ou IgA) e de cadeia leve (λ ou κ) optamos por não utilizá-los por apresentarem imunodeteção variável no LDGC-B, e por ter sido a imuno-expressão dos anticorpos CD20 e CD79a suficiente para o diagnóstico.

Obtivemos ainda imuno-expressão para o CD45 em dez casos de LDGC-B. Nas duas últimas classificações, o CD45 é pouco citado para o

diagnóstico das neoplasias do tecido linfóide. A imunodeteção do CD45 representa uma chave no diagnóstico histológico diferencial das neoplasias do tecido linfóide com outras neoplasias não-linfóides de células pequenas, pouco diferenciadas (Carbone *et al.*, 1991; Raphael *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 1994; Jaffe, 1995; Jaffe *et al.*, 2001).

Não foi realizada a pesquisa do EBV nos casos de LDGC-B, porque nesta doença freqüentemente não se detecta este vírus (Harris *et al.*, 1994; Jaffe e al., 2001; Yin *et al.*, 2001).

Rearranjo do gene IgH com padrão de banda monoclonal, foi verificado em três dos quatro casos avaliados. Isto corrobora com outros estudos e confirma a monoclonalidade e origem a partir de células linfóides B do LDGC-B (Trainor *et al.*, 1990; Wan *et al.*, 1990; Inghirami *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 2000; Jaffe *et al.*, 2001).

A incidência de todos os tipos histológicos do LNH é aumentada em 60 a 200 vezes em pacientes com a infecção HIV, sendo neoplasias heterogêneos e predominantemente de células linfóides B (Tabela 2.12) (Beral *et al.*, 1991; Carbone *et al.*, 1991; Raphael *et al.*, 1994; Davi *et al.*, 1998; Carbone *et al.*, 1998; Goedert, 2000; Carbone *et al.*, 2001).

LDGC-B e LB foram neoplasias associadas à infecção HIV encontradas em nosso estudo, representando dez (21,8%) e um (2,2%) caso (s), respectivamente. Estes tipos histológicos são também descritos em outros estudos (Green & Eversole, 1989; Langford *et al.*, 1991; Epstein & Silverman, 1992; Delecluse *et al.*, 1997; Jordan *et al.*, 1997; Porter *et al.*, 1999).

O LDGC-B de boca associado à infecção HIV é um subtipo morfológico do LDGC-B, designado por Jaffe *et al.* (2001) como LDGC-Bp. Também tem recebido a designação de linfoma plasmoblástico de boca (Delecluse *et al.*, 1997; Porter *et al.*, 1999; Carbone *et al.*, 2001; Jaffe *et al.*, 2001) (Tabela 2.12). Optamos pela denominação LDGC-Bp, ao invés de linfoma plasmoblástico de boca, porque, apesar desta última denominação estar citada em vários estudos, ela não é listada na classificação oficial da OMS-2001 (Tabela 2.11).

O LDGC-Bp esteve presente mais freqüentemente em pacientes do sexo masculino, leucodermas e com maior freqüência na 3ª e 4ª décadas de vida, assim como verificado nos estudos de Green & Eversole (1989); Carbone *et al.* (1991); Raphael *et al.* (1994); Langford *et al.* (1991); Jordan *et al.* (1997); Delecluse *et al.* (1997) e Porter *et al.* (1999). A predominância no sexo masculino e a idade dos pacientes com LDGC-Bp são correlacionados à incidência da infecção HIV (Ministério da Saúde, 2001).

Os LDGC-Bp apresentaram-se como lesões localizadas preferencialmente no rebordo alveolar/gengiva da maxila e palato, com envolvimento do tecido ósseo adjacente, ulceração ou coloração vermelha da mucosa bucal, sintomatologia dolorosa e a duração dos sinais e sintomas clínicos foi de seis dias a oito meses. Estes dados clínicos foram também verificados nos estudos de LDGC-Bp de Green & Eversole (1989); Delecluse *et al.* (1997); Jordan *et al.* (1997); e Porter *et al.* (1999). Entretanto, no estudo de Langford *et al.* (1991) as lesões foram assintomáticas.

O tamanho médio das lesões do LDGC-Bp foi 3,6cm em oito casos, sendo que um caso era maior que 10cm. Porter *et al.* (1999) observaram um tamanho de 3cm no seu caso de LDGC-Bp.

Os diagnósticos clínicos diferenciais citados para o LDGC-Bp foram linfoma, carcinoma epidermóide e sarcoma de Kaposi. No estudo de Jordan *et al.* (1997) os três casos de LDGC-Bp tiveram diagnósticos clínicos de sarcoma de Kaposi, infecção ou LNH. Os dados clínicos do LDGC-Bp indicam o caráter neoplásico desta doença. Além disto, o diagnóstico clínico de LDGC-Bp deve ser considerado entre os diagnósticos clínicos diferenciais para neoplasias localizada na boca de pacientes HIV positivos.

Os dez casos de LDGC-Bp apresentaram-se com a morfologia descrita para esta entidade, isto é, padrão difuso de crescimento, com substituição da lâmina própria e submucosa pelas células linfóides neoplásicas com variáveis proporções de células semelhantes aos imunoblastos ou aos centroblastos, e células com diferenciação plasmocitóide (Carbone *et al.*, 1991; Raphael *et al.*, 1994; Davi *et al.*, 1998; Jaffe *et al.*, 2001). A característica morfocitológica de diferenciação plasmocitóide não é exclusiva do LDGC-Bp, sendo também verificada nos casos de LB associados à infecção HIV (Jaffe *et al.*, 2001) (Tabela 2.12).

A alta frequência de mitoses e ausência de plasmócitos neoplásicos maduros, associados às características clínicas, ajudam na distinção do LDGC-B, LB e LDGC-Bp, das neoplasias de plasmócitos (mieloma plasmocítico e plasmocitoma solitário do osso ou extra-ósseo) (Jaffe *et al.*, 2001).

Com relação à imunofenotipagem, os dez casos de LDGC-Bp foram imunopositivos para VS38c e imunonegativos para CD20, CD79a, CD3 e CD45RO. O caso de LB associado à infecção HIV apresentou padrão morfológico de LB clássico, sendo imunopositivo para CD20, CD79a e CD45, e imunonegativo para VS38c, CD3 e CD45RO. Estes resultados corroboram com outros estudos e demonstram a monoclonalidade e origem a partir de células linfóides B destes dois tipos histológicos de LNH (Green & Eversole, 1989; Langford *et al.*, 1991; Carbone *et al.*, 1991; Raphael *et al.*, 1994; Delecluse *et al.*, 1997; Carbone *et al.*, 1998; Porter *et al.*, 1999; Carbone *et al.*, 2001; Jaffe *et al.*, 2001).

O LDGC-B associado ou não à infecção HIV é imunopositivo para CD20 e CD79a, e imunonegativo ou com poucas células imunopositivas para VS38c ou CD138. O LB associado à infecção HIV é imunopositivo para CD20 e CD79a, e imunonegativo para VS38c ou CD138. A maioria das neoplasias de plasmócitos é imunopositiva para CD79a (50% dos casos) ou CD138; o VS38c é tipicamente imunoexpresso em todos os casos, e são imunonegativas para CD20 e CD45 (Green & Eversole, 1989; Langford *et al.*, 1991; Carbone *et al.*, 1991; Raphael *et al.*, 1994; Delecluse *et al.*, 1997; Carbone *et al.*, 1998; Porter *et al.*, 1999; Carbone *et al.*, 2001; Jaffe *et al.*, 2001). Assim, a imunofenotipagem auxilia no diagnóstico histológico diferencial entre estas doenças e o LDGC-Bp.

Foi observada, ainda, restrição de cadeia leve κ ou λ em todos os dez casos de LDGC-Bp e nove casos foram imunopositivos para CD45; diferente dos achados de Delecluse *et al.* (1997) onde, dos 16 casos de LDGC-Bp,

sete casos foram imunopositivos para CD45 com proporção variável de células neoplásicas positivas, três apresentaram restrição de cadeia leve λ e dois restrição de cadeia κ .

O EBV foi observado nos casos de LDGC-Bp e no caso de LB. Isto tem sido observado também em outros estudos, porém com frequências variáveis (Green & Eversole, 1989; Raphael *et al.*, 1994; Delecluse *et al.*, 1997; Davi *et al.*, 1998; Carbone *et al.*, 1998; Mackenzie *et al.*, 1999, Porter *et al.*, 1999; Carbone *et al.*, 2001). A presença do EBV é relacionada à patogênese destes dois tipos histológicos de LNH, porém o seu papel ainda não é totalmente conhecido (Green & Eversole, 1989; Langford *et al.*, 1991; Raphael *et al.*, 1994; Cesarman *et al.*, 1995; Bacchi *et al.*, 1996; Bain, 1997).

Todos os três casos de LDGC-Bp e o caso de LB associado à infecção HIV demonstraram padrão de banda monoclonal, corroborando com outros estudos e confirmando a origem a partir de células linfóides B e sua monoclonalidade (Carbone *et al.*, 1991; Raphael *et al.*, 1994; Delecluse *et al.*, 1997; Davi *et al.*, 1998).

O LB é definido como um linfoma de alta agressividade, freqüentemente localizado em sítios extranodais ou como leucemia aguda. É composto por células linfóides neoplásicas de tamanho médio, com citoplasma basofílico, e apresenta inúmeras figuras de mitose. As células cuja origem se pressupõem para o LB são células do centro germinativo (Jaffe *et al.*, 2001).

Existem três variantes clínicas do LB: 1) LB endêmico; 2) LB esporádico e 3) LB associado à imunodeficiência. A interação do EBV com

infecções parasitárias, particularmente a malária, favorece o desenvolvimento do LB. Anormalidades genéticas no gene MYC representam outro fator na sua patogênese (Facer & Playfair, 1989; Yano *et al.*, 1993; Jaffe *et al.*, 2001).

O LB representou a segunda neoplasia (16 casos) mais freqüente. Este achado é esperado, uma vez que os maxilares e outros ossos da face representam um sítio freqüente do LB endêmico ou esporádico (Adatia, 1978; Levine *et al.*, 1982; Eisenbud *et al.*, 1983; Ziegler *et al.*, 1984; Howell *et al.*, 1987; Hesselling *et al.*, 1989; Anavi *et al.*, 1990; Shapira & Peylan-Ramu, 1998). Dos 16 casos, 15 representaram o LB esporádico (LBes), porque as regiões centro-oeste (São Paulo-SP e Belo Horizonte-MG) e sul (Pelotas-RS) são localizações do Brasil que não correspondem à região endêmica do LB; e um caso (2,2%) foi LB associado à infecção HIV.

O LBes foi mais freqüente no sexo masculino (masculino:feminino 2,8:1), em pacientes leucodermas e com maior distribuição na 1ª e 2ª décadas de vida. Estes achados são também verificados nos estudos de Levini *et al.* (1982); Eisenbud *et al.* (1983); Pinto Jr. (1989) e Anavi *et al.* (1990). Entretanto, no estudo de Howell *et al.* (1987) o LB foi discretamente mais freqüente no sexo feminino (55,5%).

A localização mais freqüente do LBes foi a região de gengiva mandibular. Apenas um caso era intra-ósseo, embora a localização intra-óssea seja mais freqüente. Seis casos de tecido mole apresentaram envolvimento do tecido ósseo adjacente e o caso intra-ósseo apresentou-se

como lesão radiotransparente, assim como nos estudos de Howell *et al.* (1987) e Anavi *et al.* (1990).

Os pacientes com LBes apresentaram lesões com ulceração ou coloração vermelha da mucosa bucal, sintomatologia dolorosa, as lesões mediam mais que 10cm em quatro casos e de 3cm em três casos, e a duração dos sinais e sintomas clínicos variou de 20 dias a quatro meses. No estudo de Howell *et al.* (1987) aumento de volume associado à sintomatologia dolorosa, parestesia e ou anestesia foi verificado em 44,5% dos casos, aumento de volume associado à mucosa bucal de coloração vermelha em 33,5% dos casos e somente aumento de volume em 22% casos de LB. No estudo de Anavi *et al.* (1990) parestesia ou anestesia foram verificadas em 25.8% dos casos de LB.

Os sinais e sintomas clínicos do LBes indicam o caráter neoplásico maligno desta doença. Também o diagnóstico clínico de LB pode ser considerado entre os diagnósticos clínicos diferenciais de lesões neoplásicas localizadas no complexo maxilo-mandibular de pacientes jovens.

Morfologicamente, todos os 15 casos LBes apresentaram os aspectos clássicos de LB, isto é, padrão difuso de crescimento, composto por células linfóides neoplásicas de tamanho médio e citologicamente monomórficas (Hui *et al.*, 1988; Jaffe *et al.*, 2001).

Os 15 casos de LBes foram imunopositivos para CD20 e/ou CD79a e imunonegativos para CD3 e CD45RO, corroborando com outros estudos e demonstrando a sua monoclonalidade e origem a partir de células linfóides B deste tipo histológico de LNH. É também descrito que o LB imuno-expressa

CD10, CD19, CD22, BCL-6, IgM e apresenta restrição de cadeia leve κ ou λ (Handles & Howell, 1986; Hui *et al.*, 1988; Pinto Jr., 1989; Anavi *et al.*, 1990; Harris *et al.*, 1994; Spina *et al.*, 1997; Jaffe *et al.*, 2001).

O CD45 foi imunopositivo em 14 casos de LBes. Imunodetecção do CD10 foi realizada em dez casos, sendo todos positivos. Em dez casos cujo diagnóstico de LBes não foi conclusivo após as reações com CD20 ou CD79a, foi realizada a reação para CD10, que foi positiva em todos eles. Assim, a imunofenotipagem com CD10, em conjunto com outros resultados de imunofenotipagem, da pesquisa do EBV e dados clínicos, corroborou para o diagnóstico dos dez casos de LBes.

Treze dos 15 casos de LBes foram associados ao EBV, assim como demonstrado em outros estudos. Entretanto, a frequência da presença do EBV no LB varia de acordo com as regiões do mundo e com as variantes clínicas (Levine *et al.*, 1982; Philip *et al.*, 1982; Lenoir *et al.*, 1985; Prevot *et al.*, 1992; Hamilton-Dutoit *et al.*, 1993; Anwar *et al.*, 1995; Araújo *et al.*, 1996; Tao *et al.*, 1998; Patton *et al.*, 1990; Mackenzie *et al.*, 1999).

Três dos quatro casos de LBes demonstraram padrão de banda monoclonal, corroborando com outros estudos, como a demonstração da monoclonalidade e origem a partir de células linfóides B do LBes (Tamaru *et al.*, 1995; Jaffe *et al.*, 2001).

Isaacson & Wright, 1984 propuseram que a origem de alguns tipos de linfomas localizados no trato gastrointestinal, pulmão, glândulas salivares e na tireóide, era a partir do MALT, e denominaram estes linfomas de “linfoma de células B de baixo grau do MALT”. Atualmente, esta entidade é

designada de linfoma de células B da zona marginal extranodal do tecido linfóide associado à mucosa (Linfoma MALT), sendo definido como um linfoma extranodal e apresentando morfológicamente células B pequenas e heterogêneas. A provável célula de origem do linfoma MALT é a célula B da zona marginal pós-centro germinativo (Jaffe *et al.*, 2001).

Em vários casos de linfoma MALT existe uma história de inflamação crônica, como a gastrite crônica associada à bactéria “*Helicobacter pylori*” e doenças auto-imunes (síndrome de Sjögren e tireoidite de Hashimoto) (Kassan *et al.*, 1978; Aozasa, 1990; Wotherspoon *et al.*, 1991; Thieblemont *et al.*, 1997). Isaacson (1994) sugere que o “MALT adquirido”, secundário à infecção ou à doenças auto-imunes, pode formar um micro-ambiente para o desenvolvimento das neoplasias do tecido linfóide. No presente estudo, nos dois pacientes com linfoma MALT não foi possível obter a informação de que os pacientes apresentavam ou não alguma das situações clínicas acima descritas.

O linfoma MALT foi o quarto linfoma entre as neoplasias de células linfóides B ou T e NK, e o terceiro entre as neoplasias de células linfóides B. No estudo de Eisenbud *et al.* (1983), o linfoma MALT representou o segundo (38,7%) tipo histológico, o terceiro (20%) no estudo de Fukuda *et al.* (1987) e foi pouco freqüente (2 casos-10%) no estudo de Slootweg *et al.* (1985).

O linfoma MALT esteve presente em um paciente do sexo masculino e outro do sexo feminino, ambos leucodermas e na 7^a década de vida, assim como nos estudos de Eisenbud *et al.* (1983), Slootweg *et al.* (1985) e do Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project (1997). O linfoma MALT é

descrito como sendo mais comum em pacientes do sexo feminino (Fukuda *et al.* 1987; Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997).

Os dois casos de linfoma MALT estavam localizados em tecido mole da mucosa bucal, ambos eram assintomáticos, um caso media 1cm e a duração dos sinais e sintomas foi de três ou seis meses. No estudo de Slootweg *et al.* (1985) os dois casos de linfoma MALT localizavam-se em tecido mole (palato e tecido mole peri-mandibular).

Os dois casos de linfoma MALT apresentaram duas características histomorfológicas usualmente descritas: 1) células linfóides neoplásicas de tamanho pequeno que compreendem as células da zona marginal (semelhantes aos centrócitos); as células monocitóides; os linfócitos pequenos e as células com diferenciação plasmocitóide; e 2) lesão linfopitelial, formada quando as células linfóides neoplásicas infiltram o tecido epitelial. Um caso apresentou outra característica do linfoma MALT: 3) presença de folículos linfóides reativos (Jaffe, 1995; Jaffe *et al.*, 2001). Os dois casos de linfoma MALT estudados representam linfoma MALT de glândula salivar, uma vez que o tecido epitelial presente era representado por ductos de glândula salivar.

A análise histomorfológica das células da zona marginal, auxilia na distinção entre o linfoma MALT e processos reativos como gastrite por "*Helicobacter pylori*", síndrome de Sjögren e tireoidite de Hashimoto. Em casos mais difíceis, tanto a imunofenotipagem, como a análise molecular para avaliar a monoclonalidade das células linfóides são necessárias para estabelecer ou excluir o diagnóstico de MALT. A distinção entre o linfoma

MALT e outros linfomas de pequenas células B (linfoma folicular, LCM e linfoma linfocítico) é feita através da morfologia e imunofenotipagem (Harris *et al.*, 1994; Jaffe *et al.*, 2001).

Os dois casos de linfoma MALT foram imunopositivos para CD20, CD79a e CD45 e imunonegativos para CD3 e CD45RO. Este achado corrobora com Harris *et al.* (1994) e Jaffe *et al.* (2001), e demonstra a monoclonalidade e origem a partir de células linfóides B.

Em um dos casos de linfoma MALT, o mesmo que apresentou na morfologia os folículos linfóides reativos, foi verificada restrição cadeia leve λ , imunonegatividade para CD5 e ciclina D1, e banda monoclonal na análise do gene IgH. A restrição de imunoglobulina de cadeia leve λ foi importante para o diagnóstico histológico diferencial com hiperplasia linfóide. A imunonegatividade para CD5 foi importante para o diagnóstico histológico diferencial com LCM e linfoma linfocítico, que são imunopositivos para CD5; e a imunonegatividade para ciclina D1 foi importante para o diagnóstico histológico diferencial com LCM, que é imunopositivo para ciclina D1 (Harris *et al.*, 1994; Jaffe *et al.*, 2001). A avaliação do gene IgH auxiliou na confirmação da monoclonalidade e origem a partir de células linfóides B do linfoma MALT, assim como corroborou na confirmação do linfoma contra uma hiperplasia linfóide. O rearranjo do gene IgH no linfoma MALT é também demonstrado em outros estudos (Qin *et al.*, 1995; Du *et al.*, 1996).

O LCM foi inicialmente reconhecido por Berard & Dorfman (1974) com a denominação de linfoma maligno de diferenciação intermediária, tipo linfocítico (IDL-“intermediately differentiated lymphocytic lymphoma”). Apesar

do reconhecimento do IDL por muitos patologistas, ele não é descrito na maioria das classificações das neoplasias do tecido linfóide. Banks *et al.* em 1992 recomendaram a substituição do termo IDL por linfoma de células do manto (LCM).

O LCM é definido como uma neoplasia de células linfóides B composto por células linfóides neoplásicas de tamanho pequeno a médio semelhantes aos centrócitos, mas com contorno nuclear menos irregular. Supõe-se que a célula de origem do LCM seja a célula B periférica da zona interna do manto. Centroblastos, células do centro folicular não-clivadas, para-imunoblastos e pseudofolículos ou folículos linfóides reativos estão ausentes no LCM (Jaffe *et al.*, 2001).

O LCM representa 3 a 10% dos LNH, sendo a sexta mais freqüente deste grupo (Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997). O LCM preferencialmente localiza-se em sítios nodais. O trato gastrointestinal e o anel de Waldeyer são os principais sítios extranodais do LCM (Norton *et al.*, 1995; O'Briain *et al.*, 1989).

No presente estudo, o LCM foi um dos tipos histológicos menos freqüente. No estudo de linfomas de boca de Slootweg *et al.* (1985) o LCM foi representado por dois (10%) casos.

O caso de LCM esteve presente em um paciente do sexo masculino, leucoderma e com 66 anos. O LCM é mais freqüente em pacientes do sexo masculino (masculino:feminino, 2:1) e na 7ª década de vida (Slootweg *et al.*, 1985; Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997; Jaffe *et al.*, 2001). A lesão estava localizada no palato duro com a mucosa que revestia

apresentando-se vermelha, era assintomática, media 4 cm e os sinais e sintomas clínicos apresentavam duração de um ano. No estudo de Slootweg *et al.* (1985) um caso de LCM teve localização intra-óssea na maxila e o outro em tecido mole do assoalho da boca, e a duração dos sinais e sintomas era de três meses em um caso.

No presente estudo, o LCM apresentou-se com padrão vagamente nodular de crescimento e era constituído por células semelhantes aos centrócitos, como descrito por Banks *et al.* (1992) e Jaffe *et al.* (2001). As células linfóides neoplásicas eram imunopositivas para CD5, CD20, CD79a, ciclina D1 e para CD45 e imunonegativas para CD3 e CD45RO. Este padrão de imunofenotipagem demonstra a monoclonalidade e origem a partir de células linfóides B do LCM e corrobora com outras descrições do LCM (Banks *et al.*, 1992; Harris *et al.*, 1994; Jaffe *et al.*, 2001). Casos raros de LCM CD5 negativos podem existir, mas eles tipicamente imuno-expressam a ciclina D1 (Harris *et al.*, 1994; Jaffe *et al.*, 2001).

A imunofenotipagem do LCM com CD5 e ciclina D1 é importante para o diagnóstico histológico diferencial com linfoma MALT e linfoma folicular, uma vez que ambos são imunonegativos para CD5 e ciclina D1. A expressão de ciclina D1 no LCM é resultado da translocação gênica t(11;14) (q13;q32), que ocorre entre os genes IgH e da CICLINA D1 (CCND1, PRAD1, BCL-1/cromossomo 11q13) (Harris *et al.*, 1994; Jaffe *et al.*, 2001)

O caso de LCM deste estudo teve padrão de banda monoclonal, corroborando com outros estudos e confirmando a monoclonalidade e a

origem a partir de células linfóides B do LCM (Du *et al.*, 1997; Jaffe *et al.*, 2001).

Em nosso estudo, as neoplasias de células linfóides T e NK maduras foram incomuns (8,7%), assim como descrito em outros estudos (Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997; Yin *et al.*, 2000).

O LNK/Tn é definido como um linfoma predominantemente extranodal e caracterizado por um espectro morfológico amplo. O infiltrado é predominantemente angiocêntrico e angio-invasivo, com proeminente destruição vascular e necrose. As células cuja origem se pressupõe para o LNK/Tn são células NK ativadas ou menos possivelmente linfócitos T citotóxicos (Chan *et al.*, 1994; Gaal *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2000; Tsang *et al.*, 2000; Jaffe *et al.*, 2001).

O LNK/Tn representa a terceira neoplasia mais freqüente entre as neoplasias de células linfóides T e NK maduras (Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997), sendo mais prevalente em pacientes da Ásia, México, América Central e América do Sul. A cavidade nasal, nasofaringe, palato, tecidos moles, trato gastrointestinal e testículos são os principais sítios para o LNK/Tn (Chan, 1998b; Jaffe *et al.*, 2001).

No presente estudo, o LNK/Tn foi a terceira neoplasia (3 casos, 6,5%) mais freqüente, sendo o tipo histológico mais freqüente entre as neoplasias de células linfóides T/NK maduras. No estudo de LNK/Tn de Gaal *et al.* (2000) a boca foi sítio de três (20%) casos. No estudo de linfomas de boca de Yin *et al.* (2000) foi o segundo mais freqüente entre as neoplasias e o

mais freqüente entre as neoplasias de células linfóides T e NK, representado por quatro casos.

Em dois casos de LNK/Tn, um foi visto no sexo masculino e outro no feminino, ambos leucodermas. A distribuição da idade, em três casos, foi na 3ª e 4ª décadas de vida. O LNK/Tn é descrito como sendo mais freqüente no sexo masculino e com ampla faixa etária (Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997; Gaal *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2000; Tsang *et al.*, 2000). No estudo de Tsang *et al.* (2000) todos os casos de LNK/Tn eram em pacientes xantodermas (Chineses).

A localização dos três casos de LNK/Tn era o tecido mole do palato e/ou rebordo alveolar da maxila e ulceração ou mucosa de coloração vermelha estavam presentes em dois casos. Um caso apresentou envolvimento do tecido ósseo adjacente. Sintomatologia dolorosa foi descrita em um caso, sendo outro caso assintomático; um caso mediu 3,5cm e a duração média dos sinais e sintomas foi de 5 meses. Estes dados clínicos do LNK/Tn são também discriminados em outros estudos (Yin *et al.*, 2000; Tsang *et al.*, 2000; Gaal *et al.*, 2000) e indicam o caráter neoplásico desta doença. Em se tratando de lesões neoplásicas localizadas no palato, o diagnóstico clínico de LNK/Tn deve ser considerado.

Histologicamente os três casos de LNK/Tn apresentaram crescimento difuso associado aos padrões angiocêntrico, angio-invasivo e angiodestrutivo, com a substituição da lâmina própria e submucosa pelas células linfóides neoplásicas, que eram representadas por uma composição de células linfóides neoplásicas pequenas e grandes. Este representa um

dos espectros citomorfológicos do LNK/Tn, pois as células linfóides neoplásicas podem ainda ser de tamanho médio (Harris *et al.*, 1994; Jaffe *et al.*, 2001). Áreas de necrose por coagulação foram verificadas em um dos casos de LNK/Tn e no estudo de Gaal *et al.* (2000) em 12 (80%) casos.

As células linfóides neoplásicas dos três casos de LNK/Tn apresentaram imunofenotipagem dita “típica”, ou seja, positividade para CD2, CD3 ϵ , e CD56, e imunonegatividade para CD20 e CD79a. Isto demonstra a sua monoclonalidade e origem a partir de células NK ou de linfócitos T citotóxicos (Harris *et al.*, 1994; Jaffe *et al.*, 2001). Muitos casos, como os nossos, são também imunopositivos para CD45RO. Ainda, são imunopositivos para proteínas associadas à grânulos citotóxicos [granzima B, antígeno intracelular restrito de células T- TIA-1 (“T cell-restricted intracellular antigen”) e perforina], CD43, HLA-DR (“Histocompatibility Leukocyte Antigen, DR”), Fas e Fas ligante e receptor de IL-2. Outros anticorpos como CD4, CD5, CD8, TCR β , TCR δ , CD16 e CD57 são usualmente imunonegativos (Harris *et al.*, 1994; Gaal *et al.*, 2000; Tsang *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2000; Jaffe *et al.*, 2001). O CD16 foi imunodetectado nos três casos, e o CD45 em um caso do presente estudo.

A imuno-expressão citoplasmática do CD3 utilizando anticorpo policlonal é detectada em células NK, porque ele detecta o fragmento “epsilon” (ϵ) do CD3 presente nas células NK. Assim, a imunodeteção do CD3 utilizando anticorpo policlonal não é específica para células de linhagem T (Ohno *et al.*, 1995; Jaffe *et al.*, 2001; Hsi & Yegappan, 2001).

O EBV foi detectado em dois casos de LNK/Tn. Outros estudos mostram freqüência variável da presença do EBV no LNK/Tn. A associação do EBV com o LNK/Tn sugere um provável papel deste vírus na sua patogênese (Chan *et al.*, 1994; Gaal *et al.*, 2000, Yin *et al.*, 2000; Tsang *et al.*, 2000; Jaffe *et al.*, 2001).

Gaal *et al.* (2000) designaram de LNK/Tn casos de neoplasias do tecido linfóide que demonstravam CD3ε positivo, CD56 negativo, proteínas associadas à grânulos citotóxicos positivos, EBV positivo e características clínicas similares às aquelas descritas para o LNK/Tn. O diagnóstico de LNK/Tn não deve ser conclusivo na ausência de proteínas associadas à grânulos citotóxicos ou EBV. Jaffe *et al.* (2001) sugerem que estes casos (proteínas associadas à grânulos citotóxicos ou EBV negativos) sejam denominados de linfoma de células T periféricas, não-especificado.

Existem determinadas neoplasias de células linfóides T que não apresentam características clinicopatológicas suficientes para defini-las. Jaffe *et al.* (2001) designam este grupo de neoplasias de “linfoma de células T periféricas” adicionando o termo “não-especificado” (LTn). A origem que se pressupõe para o LTn é de células T periféricas em vários estágios de transformação, sendo que a(s) causa (s) desta neoplasia não é conhecida (Jaffe *et al.*, 20001).

O LTn representa o tipo histológico mais freqüente entre as neoplasias de células linfóides T e NK (50% dos casos). O LTn é mais freqüente em sítios nodais (Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997; Gisselbrecht *et al.*, 1998; Jaffe *et al.*, 2001).

Em nosso estudo o LTn apresentou baixa frequência (1 caso, 2,2%) entre os linfomas de boca, mas foi o segundo mais freqüente (1 caso, 25%) entre as neoplasias de células linfóides T e NK maduras. No estudo de Yin *et al.* (2000) o LTn representou a terceira neoplasia mais freqüente entre os linfomas de boca e o segundo entre as neoplasias de células linfóides T e NK.

O LTn esteve presente em um paciente do sexo masculino, leucoderma e na 8ª década de vida. É descrito que o LTn é encontrado igualmente em pacientes dos sexos masculino ou feminino e com ampla faixa etária (Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997; Jaffe *et al.*, 2001). No estudo de linfoma de boca de Yin *et al.* (2000) dois pacientes eram do sexo masculino e um feminino, com idade média de 68 anos.

O LTn esteve presente no fundo de sulco da maxila e com envolvimento do tecido ósseo adjacente, a mucosa bucal achava-se ulcerada e de coloração vermelha, a lesão era sintomática e media 6 cm com duração de dez dias. No estudo de Yin *et al.* (2000) os casos de LTn localizavam-se na gengiva superior ou inferior e no palato; e no estudo de Pinto Jr. (1989) localizava-se no palato. Pode-se inferir que o LTn, quando localizado em boca, parece ser mais freqüentemente localizado na maxila. Sinais e sintomas clínicos não foram descritos nos estudos de linfoma de boca que fizeram o diagnóstico de LTn (Pinto Jr., 1989; Yin *et al.* 2000).

O LTn apresentou características morfológicas descritas para este tipo histológico, isto é, padrão difuso de crescimento com substituição da lâmina própria e submucosa por uma composição de células linfóides

neoplásicas pequenas e grandes (Harris *et al.*, 1994; Yin *et al.*, 2000; Jaffe *et al.*, 2001). Foi imunopositivo para CD3, CD45RO, CD45 e imunonegativo para CD20, CD79a, CD2, CD16 e para CD56. Este perfil de imunofenotipagem corrobora com outros estudos e demonstra a monoclonalidade e origem a partir de células linfóides T (Pinto Jr., 1989; Pinkus *et al.*, 1990; Harris *et al.*, 1994; Boulland *et al.*, 199; Yin *et al.*, 2000; Jaffe *et al.*, 2001). Também não foi detectada a presença do EBV, como demonstrado em outros estudos (d'Amore *et al.*, 1996; Yin *et al.*, 2000).

Células dendríticas foliculares e células dendríticas interdigitantes têm relação com as neoplasias de células linfóides B ou T e NK, e a sua presença tem sido pesquisada nestas doenças (Kornstein *et al.*, 1986; Mori *et al.*, 1988; Maeda *et al.*, 1993; Abbas *et al.*, 1997; Tsunoda *et al.*, 1999; Roitt *et al.*, 1999; Bagdi *et al.*, 2001). Com referência aos linfomas de boca, é de conhecimento que no estudo de Pinto Jr. (1989) foi realizada a pesquisa das células dendríticas com a proteína S100 e no estudo de Langford *et al.* (1991) a imuno-histoquímica com o CD21 foi realizada em casos de linfomas de boca associados à infecção HIV com finalidade diagnóstica.

Utilizando-se os anticorpos CD21, CD35 e caldesmona as células dendríticas foliculares foram identificadas nos dois casos de LDGC-B que apresentaram pseudofolículos. Esta representa uma situação onde, em casos de LNH com padrão de crescimento difuso se identificam as células dendríticas foliculares, como também demonstrado por Mori *et al.* (1988) e Maeda *et al.* (1993). Entretanto, vale ressaltar que nestes dois estudos, a

identificação das células dendríticas foliculares foi realizada com o DRC-1, um anticorpo preconizado para uso em material congelado.

Células dendríticas foliculares foram imunodetectadas nos folículos linfóides de um caso de linfoma MALT, como no estudo de Bagdi *et al.* (2001), que as identificaram com os anticorpos CD21, CD23 e CD35.

O caso de LCM demonstrou um padrão de rede desorganizada e expandida de células dendríticas foliculares. Este padrão de imunopressão é considerado uma chave de imunofenotipagem para o auxílio do diagnóstico deste tipo histológico. Este padrão é equivalente àquele verificado na zona do manto dos folículos linfóides não-neoplásicos, sugerindo assim, que o desenvolvimento das células dendríticas foliculares acompanha o crescimento das células linfóides neoplásicas clivadas (centrócitos) (Mori *et al.*, 1988; Harris *et al.*, 1994; Jaffe *et al.*, 2001; Bagdi *et al.*, 2001).

Considerando os nossos resultados e os dos autores acima listados (Mori *et al.*, 1988; Langford *et al.*, 1991; Maeda *et al.*, 1993; Tsunoda *et al.*, 1999; Bagdi *et al.*, 2001) e concordando com Maeda *et al.* (1993), pode-se inferir que nos linfomas de boca, que são predominantemente neoplasias do tecido linfóide com padrão difuso de crescimento, a identificação das células dendríticas foliculares pelos anticorpos CD21 e CD35 está na dependência do micro-ambiente organizado pelas células dos linfomas, ou seja, na dependência da presença de folículos linfóides ou pseudofolículos. Isto vai de encontro à fisiologia e função das células dendríticas foliculares, que é a apresentação de antígenos aos linfócitos B realizada no micro-ambiente dos

folículos linfóides (Imai & Yamakawa, 1996; Imai *et al.*, 1998; Tew *et al.*, 1997; Roitt *et al.*, 1999).

Além disto, durante o processo de apresentação de antígenos, acontece a ativação dos receptores de complemento, o 3d (detectado pelo anticorpo CD21) e o C3b (detectado pelo anticorpo CD35) nas células dendríticas foliculares (Abbas *et al.*, 1997; Roitt *et al.*, 1999). Assim, pode-se inferir que a imunodeteção das células dendríticas foliculares pelos anticorpos CD21 e CD35 se faz quando estas células estão realizando a sua função fisiológica. Justificam-se assim os resultados da imunodeteção das células dendríticas foliculares pelos anticorpos CD21 e CD35 nos casos de linfomas estudados.

A utilização da caldesmona na identificação das células dendríticas foliculares em neoplasias do tecido linfóide tem sido pouco realizada. Um dos raros estudos que a utilizou foi o de Tsunoda *et al.* (1999), que observaram diferenças na imuno-expressão das células dendríticas foliculares de acordo com os graus I, II e III dos folículos linfóides de linfomas foliculares.

Com a caldesmona, foi possível a imunodeteção das células dendríticas foliculares em todos os casos de linfoma de boca. O padrão de imuno-expressão foi a formação de uma rede, localizada por entre as células linfóides neoplásicas de todo o espécime. Considerando estes resultados e a função fisiológica das células dendríticas foliculares, pode-se inferir que quando não presentes em áreas de folículos linfóides ou de pseudofolículos,

as células dendríticas foliculares não estariam desempenhando a sua função de apresentação de antígeno.

Na análise da quantificação da imuno-expressão das células dendríticas foliculares/caldesmona+ (Tabela 5.8), foi verificada uma menor quantidade no LBes, com diferença estatisticamente significativa, quando comparado com o LDGC-B/LDGC-Bp. Até o presente, nenhum outro estudo realizou a quantificação das células dendríticas quando da avaliação nas neoplasias do tecido linfóide (Mori *et al.*, 1988; Langford *et al.*, 1991; Maeda *et al.*, 1993; Tsunoda *et al.*, 1999; Bagdi *et al.*, 2001).

A proteína S100 representa um marcador para células de Langerhans, células dendríticas foliculares e células dendríticas interdigitantes (Imai & Yamakawa, 1996; Imai *et al.*, 1998; Tew *et al.*, 1997). No presente estudo, de acordo com os nossos resultados: 1) não houve imunodeteção de células pelo anticorpo CD1a em todos os casos estudados; 2) o aspecto citomorfológico irregular e dendrítico das células identificadas pela proteína S100 e 3) a não-imunodeteção de uma rede contínua nos folículos linfóides do caso de linfoma MALT, nos pseudofolículos dos dois casos de LDGC-B e nas áreas identificadas pelos anticorpos CD21, CD35 e caldesmona no LCM pela proteína S100; eliminaram a possibilidade de células de Langerhans e células dendríticas foliculares.

No estudo de Kornstein *et al.* (1986) de LNH e LH, as células que foram S100+ receberam a designação de células dendríticas. No estudo de Carbone *et al.* (1986), a imunodeteção das células dendríticas foliculares

pela proteína S100 foi consistentemente observada apenas nos casos de linfoma folicular, onde as células dendríticas foliculares/proteína S100+ formaram uma rede por entre as células dos folículos linfóides presentes nos linfomas foliculares.

No estudo de linfomas de boca de Pinto Jr. (1989) as células S100+ foram designadas de células dendríticas e/ou células dendríticas interdigitantes. No estudo de linfomas foliculares de Tsunoda *et al.* (1999) a imunodeteção das células dendríticas foliculares pela proteína S100 foi observada como um padrão vagamente em forma de rede descontínua, e houve diferenças na imuno-expressão das células dendríticas foliculares/S100+ de acordo com os graus I, II e III dos folículos linfóides dos linfomas foliculares.

As células dendríticas interdigitantes foram localizadas por entre as células linfóides neoplásicas de todo o espécime das 46 neoplasias. Considerando a função fisiológica das células dendríticas interdigitantes, que é a apresentação de antígenos aos linfócitos T (Bjercke *et al.*, 1985; Fonseca *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 1998; Roitt *et al.*, 1999), pode-se inferir que as células dendríticas interdigitantes presentes nos linfomas de boca estariam realizando a sua função fisiológica.

Na análise da quantificação da imuno-expressão das células dendríticas interdigitantes (Tabela 5.8) foi verificada uma menor quantidade destas células nos casos de LBes, com diferença estatisticamente significativa quando comparado com os casos de LDGC-B/LDGC-Bp.

É de conhecimento que o LBes apresenta um alto índice de proliferação celular, que é visualizado na histopatologia pelo alto índice de mitoses e morte celular espontânea, e na imuno-histoquímica pela alta fração (em torno de 100%) de células linfóides neoplásicas positivas para o anticorpo Ki-67 (Jaffe *et al.*, 2001). Considerando esta característica do LBes e os resultados do nosso estudo, pode-se inferir que talvez o alto índice de proliferação celular do LBes não forneça um micro-ambiente adequado para o desenvolvimento completo tanto das células dendríticas foliculares como das células dendríticas interdigitantes. Para dar validade a esta colocação, a realização de um estudo da proliferação celular nas amostras de LDGC-B, LDGC-Bp e LBes utilizadas no presente estudo, poderá ou não mostrar uma relação entre o índice de proliferação celular e a quantidade de células dendríticas foliculares/caldesmona+ e células dendríticas interdigitantes/S100+.

7 CONCLUSÕES

7.1 Os linfomas de boca são predominantemente originados de células linfóides B, sendo o LDGC-B o mais freqüente;

7.2 As características clínicas dos linfomas de boca auxiliam no direcionamento do diagnóstico destas doenças;

7.3 A pesquisa do EBV é importante para o diagnóstico do LDGC-Bp, LB e LNK/Tn;

7.4 A imunodeteção das células dendríticas nos tipos histológicos de linfomas de boca é dependente do micro-ambiente organizado pelas células linfóides neoplásicas;

7.5 A avaliação do gene IgH corrobora na confirmação da monoclonalidade e da origem a partir de células linfóides B, das neoplasias de células linfóides B maduras de boca.

REFERÊNCIAS*

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J.S. **Cellular and molecular Immunology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997. cap. 2-4, p. 116-137.

ABREU, E. S.; FERREIRA, F. V. A.; ROCHA, F. D. F.; MANEZES, D. B.; EVANGELISTA, R. M. S. P.; BACHI, M. M.; BACHI, C. E. Doença de Hodgkin infanto-juvenil no estado do Ceará e sua relação com o vírus de Epstein-Barr: parâmetros clínicos e análise morfológica, imuno-histoquímica e por hibridização *in situ*. **J Bras Patol**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 4, p. 178-184, out./dez. 1997.

ADATIA, A. K. Significance of jaws lesions in Burkitt's lymphoma. **Br Dent J**, London, v. 145, n. 9, p. 263-266, Nov. 1978.

De acordo com ABNT NBR-6023: 2000. Abreviatura de periódicos segundo Bases de Dados MEDLINE.

ANAVI, Y.; KAPLINSKY, C.; CALDERON, S.; ZAIZOV, R. Head, neck, and maxillofacial childhood Burkitt's lymphoma: a retrospective analysis of 31 patients. **J Oral Maxillofac Surg**, Philadelphia, v. 48, n. 7, p.708-713, July 1990.

ANDEWS, R. G.; SINGER, J. W.; BERNSTEIN, I. D. Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115 Kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony forming cells and their precursors. **Blood**, New York, v. 67, n. 3, p. 842-845, Mar. 1986.

ANWAR, N.; KINGMA, D. W.; BLOCH, A. R.; MOURAD, M.; RAFFELD, M.; FRANKLIN, J.; MAGRATH, I.; EL BOLKAINY, N.; JAFFE, E. S. The investigation of Epstein-Barr viral sequences in 41 cases of Burkitt's lymphoma from Egypt: epidemiologic correlations. **Cancer**, New York, v. 76, n. 7, p.1245-1252, Oct. 1995.

AOZASA, K. Hashimoto's thyroiditis as a risk factor of thyroid lymphoma. **Acta Pathol Jpn**, Japan, v. 40, n. 7, p. 459-468, July 1990.

AOZASA, K.; TSUJIMOTO, M.; SAKURAI, M.; HONDA, M.; YAMASHITA, K.; HANADA, M.; SUGIMOTO, A. Non-Hodgkin's lymphoma in Osaka, Japan. **Eur J Cancer Clin Oncol**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 487-492, Apr. 1985.

ARAUJO, I.; FOSS, H. D.; BITTENCOURT, A.; HUMMEL, M.; DEMEL, G.; MENDONCA, N.; HERBST, H.; STEIN, H. Expression of Epstein-Barr virus gene products in Burkitt's lymphoma in northeast Brazil. **Blood**, New York, v. 87, n. 12, p. 5279-5286, June 1996.

ARAÚJO, V. C.; MARTINS, M. T.; SALMER, F. S.; ARAÚJO, N. S. Extranodal follicular dendritic cell sarcoma of the palate. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 87, n. 2, p. 209-214, Feb. 1999.

ARAÚJO, V. C.; SOUSA, S. O.; CARVALHO, Y. R.; DE ARAUJO, N. S. Application of imunohistochemistry to the diagnosis of salivary gland. **Appl Immunohistochem Molecul Morphol**, Hagerstown, v. 8, n. 3, p.195-202, Sept. 2000.

ARMITAGE, J. O.; WEISENBURGER, D. D. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's lymphoma classification project. **J Clin Oncol**, Philadelphia, v. 16, v. 8, p. 2780-2795, Aug. 1998.

BACCHI, C. E.; BAZAN, R.; PADOVANI, E. G.; RABENHORST, S. H.; BACCHI, M. M. Linfoma do sistema nervoso central: associação com o vírus de Epstein-Barr. **J Bras Patol**, Rio de Janeiro , v. 32, n. 3, p. 103-109, Jul./Set. 1996.

BAGDI, E.; KRENACS, L.; KRENACS, T.; MILLER, K.; ISAACSON, P. G.

Follicular dendritic cells in reactive and neoplastic lymphoid tissues: a reevaluation of staining patterns of CD21, CD23, and CD35 antibodies in paraffin sections after wet heat-induced epitope retrieval. **Appl**

Immunohistochem Molecul Morphol, Hagerstown, v. 9, n. 2, p. 117-124, June 2001.

BAIN, B. J. The haematological features of HIV infection. **Br J Haematol**, Oxford, v. 99, n. 1, p. 1-8, Oct. 1997.

BANKS, P. M.; CHAN, J.; CLEARY, M. L.; DELSOL, G.; DE-WOLF-PEETERS, C.; GATTER, K.; GROGAN, T. M.; HARRIS, N. L.; ISAACSON, P. G.; JAFFE, E. S.; MASON, D.; PILERI, S.; RALFKIAER, E.; STEIN, H.; WARNKE, R. A. Mantle cell lymphoma. A proposal for unification of morphologic, immunologic, and molecular data. **Am J Surg Pathol**, New York, v. 16, n. 7, p. 637-640, July 1992.

BENNETT, M. A.; FARRER-BROWN, G.; HENRY, K.; JELITTLE, A. M. Classification of non-Hodgkin's lymphomas. **Lancet**, London, v. 2, n. 23, p. 405-406, Mar. 1974.

BERAL, V.; PETERMAN, T.; BERKELMAN, R.; JAFFE, H. AIDS-associated non-Hodgkin lymphoma. **Lancet**, London, v. 337, n. 8745, p. 805-809, Apr. 1991.

BERARD, C. W. Reticuloendothelial system: an overview of neoplasia. In REBUCK, J. W.; BERARD, C. W.; ABE, M. R. **The reticuloendothelial system**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1975. cap. 3, p. 301-317.

BERARD, C. W.; DORFMAN, R. F. Histopathology of malignant lymphomas. **Clin Haematol**, London, v. 3, p. 39-76, 1974.

BILLROTH, T. Multiple lymphoma: erfolgreiche bechandlung mit arsenik. **Deutsch Med Wschr**, Stuttgard, v. 21, p. 1066-1067, 1871.

BIRBECK, M. S.; BREATHNACH, A. S.; EVERALL, J. D. An electron microscopic study of basal melanocytes and high-level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. **J Invest Dermatol**, Baltimore, v. 37, p. 51-64, July 1961.

BJERCKE, S.; BRAATHEN, G.; GAUDERNACK, G.; THORSBY, E. Relative efficiency of human Langerhans cells and blood derived dendritic cells as antigen-presenting cells. **Acta Derm Venereol**, Stockholm, v. 65, n. 5, p. 374-378, 1985.

BOULLAND, M. L.; KANAVAROS, P.; WECHSLER, J.; CASINARIGHI, O.; GOULARD, P. Cytotoxic protein expression in natural killer cell lymphomas and in alpha beta and gamma delta peripheral T-cell lymphomas. **J Pathol**, Edinburgh, v. 183, n. 4, p. 432-439, Dec. 1997.

BRISCO, M. J.; TAN, L. W.; ORSBORN, A.; MORLEY, A. A. Development of a highly sensitive assay based on the polymerase chain reaction for rare B-lymphocyte clones in polyclonal population. **Br J Haematol**, Oxford, v. 75, n. 2, p. 163-167, June 1990.

BURKHARDT, A. Intraepithelial lymphocytes and Langerhans cells in the oral mucosa-dynamic aspects. **J Dent Assoc S Afr**, Cape Town, v. 47, n. 5, p. 200-203, May 1992.

BURKITT, D. A sarcoma involving the jaws in African children. **Br J Surg**, Bristol, v. 46, p. 218, 1958.

CAMILLERI- BROET, S.; DAVI, F.; FEUILLARD, J.; SEILHEAN, D.; MICHIELS, J. F.; BROUSSET, F.; EPARDEAU, B.; NAVRATIL, E.; MOKHTARI, K.; BOURGEOIS, C.; MARELLE, L.; RAPHAEL, M.; HAUM, J. J. AIDS-related primary brain lymphomas: histopathologic and immunohistochemical study of 51 cases. The French Study Group for HIV-Associated Tumors. **Hum Pathol**, Philadelphia, v. 28, n. 3, p. 367-374, Mar. 1997.

CARBONE, A.; GAIDANO, G.; GLOGHINI, A.; LAROCCA, L. M.; CAPELLO, D.; CANZONIERI, V.; ANTINORI, A.; TIRELLI, U.; FALINI, B.; DALLA-FAVERA, R. Differential expression of BCL-6, CD138/syndecan-1, and Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 identifies distinct

histogenetic subsets of acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphomas. **Blood**, New York, v. 91, n. 3, p. 747-755, Feb. 1998.

CARBONE, A.; GLOGHINI, A.; LAROCCHA, L. M.; CAPELLO, D.;
PIERCONTI, F.; CANZONIERI, V.; TIRELLI, U.; DALLA-FAVERA, R.;
GAIDANO, G. Expression profile of MUM1/IRF4, BCL-6, and
CD138/syndecan-1 defines novel histogenetic subsets of human
immunodeficiency virus-related lymphomas. **Blood**, New York, v. 97, n. 3, p.
744-751, Feb. 2001.

CARBONE, A.; MANCONI, R.; POLETTI, A.; COLOMBATTI, A.; TIRELLI, U.;
VOLPE, R. S-100 protein, fibronectin, and laminin immunostaining in
lymphomas of follicular center cell origin. **Cancer**, New York, v. 58, n. 10, p.
2169-2176, Nov. 1986.

CARBONE, A.; MANCONI, R.; POLETTI, A.; VOLPE, R.; SANTI, L. S-100
protein immunostaining in cells of dendritic morphology within reactive
germinal centers by ABC immunoperoxidase method. **Virchows Arch A
Pathol Anat Histopathol**, Berlin, v. 406, n. 1, p. 27-32. 1985a.

CARBONE, A.; POLETTI, A.; MANCONI, R.; VOLPE, R.; SANTI, L.
Demonstration of S-100 protein distribution in human lymphoid tissues by the
avidin-biotin complex immunostaining method. **Hum Pathol**, Philadelphia, v.
16, n. 11, p. 1157-1164, Nov. 1985b.

CARBONE, A.; TIRELLI, U.; VACCHER, E.; VOLPE, R.; GLOGHINI, A.; BERTOLA, G.; DE RE, V.; ROSSI, C.; BOIOCCHI, M.; MAONFARDINI, S. A clinicopathologic study of lymphoid neoplasias associated with human immunodeficiency virus infection in Italy. **Cancer**, New York, v. 68, n. 4, p. 842-851, Aug. 1991.

CESARMAN, E.; CHANG, Y., MOORE, P. S.; SAID, J. W.; KNOWLES, D. M. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. **N Engl J Med**, Waltham, v. 332, n. 18, p. 1186-1191, May 1995.

CHAN, J. K. C. Advances in immunohistochemical techniques: toward making things simpler, cheaper, more sensitive, and more reproducible. **Adv Anat Pathol**, New York, v. 5, n. 5, p. 314-325, Sept. 1998a.

CHAN, J. K. C. Natural killer cell neoplasms. **Anat Pathol**, Chicago, v. 3, p. 77-145, 1998b.

CHAN, J. K. C.; YIP, T. T.; TSANG, W. Y.; NG, C. S.; LAU, W. H.; POON, Y. F.; WONG, C. C.; MA, V. W. Detection of Epstein-Barr viral RNA in malignant lymphomas of the upper aerodigestive tract. **Am J Surg Pathol**, New York, v. 18, n. 9, p. 938-946, Sept. 1994.

CHEN, C. C.; RAIKOW, R. B.; SONMEZ-ALPAN, E.; SWERDLOW, S. H.
 Classification of small B-cell lymphoid neoplasms using a paraffin section
 immunohistochemical panel. **Appl Immunohistochem Molecul Morphol**,
 Hagerstown, v. 8, n. 1, p. 1-11, Mar. 2000.

CHU, P. G.; ARBER, D. A. CD79: a review. **Appl Immunohistochem
 Molecul Morphol**, Hagerstown, v. 9, n. 2, p. 97-106, June 2001.

CHU, P. G.; CHANG, K. L.; WEISS, L. M.; ARBER, D. A.
 Immunohistochemical detection of CD10 in paraffin sections of hematopoietic
 neoplasms. **Appl Immunohistochem Molecul Morphol**, Hagerstown, v. 8,
 n. 4, p. 257-262, Dec. 2000.

CLEARY, M.L.; CHAO, J; WARNKE, R.; SKLAR, J. Immunoglobulin gene
 rearrangement as a diagnostic criterion of B-cell lymphoma. **Proc Natl Acad
 Sci USA**, Washington, v. 81, n. 2, p. 593-597, Jan. 1984.

CRUCHLEY, A. T.; WILLIAMS, D. M.; NIEDOBITEK, G.; YOUNG, L. S.
 Epstein-Barr virus: biology and disease. **Oral Dis**, London, v. 3, p. S156-
 S163, May 1997. Suplemento 1.

D'AMORE, F.; JOHANSEN, P.; HOUMAND, A.; WEISENBURGER, D. D.;
 MORTENSEN, L. S. Epstein-Barr virus genome in non-Hodgkin's
 lymphomas occurring in immunocompetent patients: highest prevalence in

nonlymphoblastic T-cell lymphoma and correlation with a poor prognosis.

Danish Lymphoma Study Group, LYFO. **Blood**, New York, v. 87, n. 3, p. 1045-1055, Feb. 1996.

DAVI, F.; DELECLUSE, H. J.; GUIET, P.; GABARRE, J.; FAYON, A.; GENTILHOMME, O.; FELMAN, P.; BAYLE, C.; BERGER, F.; AUDOUIN, J.; BRYON, P. A.; DIEBOLD, J.; RAPHAËL, M. Burkitt-like lymphomas in AIDS patients: characterization within a series of 103 human immunodeficiency virus-associated non-Hodgkin's lymphomas. **J Clin Oncol**, Philadelphia, v. 16, n. 12, p. 3788-3795, Dec. 1998.

De GRAAF, J. H.; TAMMINGA, R. Y.; DAM-MEIRING, A.; KAMPS, W. A.; TIMENS, W. The presence of cytokines in Langerhans' cell histiocytosis. **J Pathol**, Edinburgh, v. 180, n. 4, p. 400-406, Dec. 1996.

DELECLUSE, H. J.; ANAGNOSTOPOULOS, I.; DALLENBACH, F.; HUMMEL, M.; MARAFIOTI, T.; SCHENEIDER, U.; HUHNS, D.; SCHIMIDT-WESTHAUSEN, A.; REICHARD, P. A.; GROSS, U.; STEIN, H. Plasmablastic lymphomas of the oral cavity: a new entity associated with the human immunodeficiency virus infection. **Blood**, New York, v. 89, n. 4, p. 1413-1420, Feb. 1997.

DORFMAN, R.F. Classification of non-Hodgkin's lymphoma. **Lancet**, London, v. 1, n. 22, p. 1295-1296, June 1974.

DRESCHFELD, J. Ein Beitrag zur lehre von den lymphosarkomen. **Deutsch Med Wschr**, Stuttgart, v. 17, p. 1175-1177, 1893.

DU, M. Q.; DISS, T. C.; XU, C. F.; WOTHERSPOON, A. C.; ISAACSON, P. G.; PAN, L. X. Ongoing immunoglobulin gene mutation in mantle cell lymphomas. **Br J Haematol**, Oxford, v. 96, n. 1, p. 124-131, Jan. 1997.

DU, M.; DISS, T. C.; XU, C.; PENG, H.; ISAACSON, P. G.; PAN, L. Ongoing mutation in MALT lymphoma immunoglobulin gene that antigen stimulation plays a role in the clonal expansion. **Leukemia**, New York, v. 10, n. 7, p. 1190-1197, July 1996.

EISENBUD, L.; SCIUBBA, J.; MIR, R.; SACHS, S. A. Oral presentations in non-Hodgkin's lymphoma: a review of thirty-one cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 56, n. 2, p. 151-156, Aug. 1983.

EPSTEIN, J. B.; SILVERMAN, S. J. Head and neck malignancies associated with HIV infection. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 73, n. 2, p. 193-200, Feb. 1992.

EPSTEIN, M. A.; ACHONG, B. G.; BARR, Y. M. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphomas. **Lancet**, London, v. 1, p. 702, 1964.

FACER, C. A.; PLAYFAIR, J. H. Malaria, Epstein-Barr virus, and the genesis of lymphomas. **Adv Cancer Res**, New York, v. 53, p. 33-72, 1989.

FINA, L.; MOLGAARD, H. V.; ROBERTSON, D.; BRADLEY, N. J.;
MONAGHAN, P.; DELIA, D.; SUTHERLAND, D. R.; BAKER, M. A.;
CREAVES, M. F. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells.
Blood, New York, v. 75, n. 12, p. 2417-2426, June 1990.

FONSECA, R.; YAMAKAWA, M.; NAKAMURA, S.; VAN HEERDE, P.;
MIETTINEN, M.; SHEK, T. W. H.; JENSEN, O. M.; ROUSSELET, M. C.;
TEFFERI, A. Follicular dendritic cell sarcoma and interdigitating reticulum
cell sarcoma: a review. **Am J Hematol**, New York, v. 56, n. 2, p. 161-167,
Oct. 1998.

FREEMAN, C.; BERG, J. W.; CUTLER, S. J. Occurrence and prognosis of
extranodal lymphomas. **Cancer**, New York, v. 29, n. 01, p. 252-260, Jan.
1972.

FUKUDA, Y.; ISHIDA, T.; FUJIMOTO, M.; UEDA, T.; AOZASA, K. Malignant
lymphoma of the oral cavity: clinicopathologic analysis of 20 cases. **J Oral
Pathol**, Copenhagen, v. 16, n. 1, p. 8-12, Jan. 1987.

GAAL, K.; SUN, N. C. J.; HERNANDEZ, A. M.; ARBER, D. A. Sinosal NK/T-
cell lymphomas in the United States. **Am J Surg Pathol**, New York, v. 24, n.
11, p. 1511-1517, Nov. 2000.

GALL, E. A. Enigmas in lymphoma: reticulum cell sarcoma and mycosis fungoides. **Minn Med**, St. Paul, v. 38, p. 674-681, 1955.

GISSELBRECHT, C.; GAULARD, P.; LEPAGE, E.; COIFFIER, B.; BRIERE, J.; HAIOUN, C.; CAZALS-HATEM, D.; BOSLY, A.; XERRI, L.; TILLY, H.; BERGER, F.; BOUHABDALLAH, R.; DIEBOLD, J. Prognostic significance of T-cell phenotype in aggressive non-Hodgkin's lymphomas. Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte (GELA). **Blood**, New York, v. 92, n. 1, p. 76-82, July 1998.

GOEDERT, J. J. The epidemiology of acquired immunodeficiency syndrome malignancies. **Semin Oncol**, New York, v. 27, n. 4, p. 390-401, Aug. 2000.

GREEN, T. L.; EVERSOLE, L. R. Oral lymphomas in HIV-infected patients: association with Epstein-Barr virus DNA. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 67, n. 4, p. 437-442, Apr. 1989.

HAIMOTO, H.; HOSODA, S.; KATO, K. Differential distribution of immunoreactive S-100 α and S-100 β proteins in normal non-nervous human tissues. **Lab Invest**, Baltimore, v. 57, n. 5, p. 489-498, May 1987.

HAMILTON-DITTOIT, S. J.; PALLESEN, G. Detection of Epstein-Barr virus small RNAs in routine paraffin sections using non-isotopic RNA/RNA in situ hybridization. **Histopathology**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 101-111, Aug. 1994.

HAMILTON-DUTOIT, S. J.; RAPHAEL, M.; AUDOUIN, J.; LISSE, I.; PEDERSEN, C.; OKSENHENDLER, E.; MARELLE, L.; PALLESEN, G. In situ demonstration of Epstein-Barr virus small RNAs (EBER 1) in acquired immunodeficiency syndrome-related lymphomas: correlation with tumor morphology and primary site. **Blood**, New York, v. 82, n. 2, p. 619-624, July 1993.

HANDLES, J. P.; HOWELL, R. E. Extranodal oral lymphoma. Part I. A morphologic and imunoperoxidase study of 34 cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 61, n. 4, p. 362-367, Apr. 1986.

HARRIS, N. L.; JAFFE, E. E.; DIEBOLD, J.; FLANDRIN, G.; MULLER-HERMELINK, H. K.; VARDIMAN, J.; LISTER, T. A.; BLOOMFIELD, C. D. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. **Histopathology**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 69-86, Jan. 2000a.

HARRIS, N. L.; JAFFE, E. E.; DIEBOLD, J.; FLANDRIN, G.; MULLER-HERMELINK, H. K.; VARDIMAN, J.; LISTER, T. A.; BLOOMFIELD, C. D. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. **Mod Pathol**, Baltimore, v. 13, n. 2, p. 193-207, Feb. 2000b.

HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; STEIN, H.; BANKS, P. M.; CHAN, J. K.;
 CLEARY, M. L.; DELSON, G.; WOLF-PEETERS, C.; FALINI, B.; GATTER,
 K. C. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a
 proposal from international Lymphoma Study Group. **Blood**, New York, v.
 84, n. 5, p. 1361-1392, Sept. 1994.

HESSELLING, P.; WOOD, R. E.; NORTJE, C. J.; MOUTON, S. African
 Burkitt's lymphoma in the Cape province of South Africa and in Namibia.
Oral Surg Oral Med Oral Pathol, St. Louis, v. 68, n. 2, p. 162-166, Aug.
 1989.

HODGKIN, T. On some morbid appearances of the absorbent glands and
 spleen. **Trans Med Soc Lond**, London, v. 17, p. 68-114, 1832.

HOWELL, R. E.; HANDLERS, J. P.; ABRAMS, A. M.; MELROSE, R. J.
 Extranodal oral lymphoma. Part II. Relationships between clinical features
 and the Lukes-Collins classification of 34 cases. **Oral Surg Oral Med Oral
 Pathol**, St. Louis, v. 64, n. 51, p. 597-602, Nov. 1987.

HSI, E. D.; YEGAPPAN, S. Lymphoma immunophenotyping: A New era in
 paraffin-section immunohistochemistry. **Adv Anat Pathol**, Chicago, v. 8, n.
 4, p. 218-239, July 2001.

HUI, P. K.; FELLER, A. C.; LENNERT, K. High-grade non-Hodgkin's lymphoma of B-cell type I. **Histopathology**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 127-143, Feb. 1988.

IMAI, Y.; YAMAKAWA, M. Morphology, function and pathology of follicular dendritic cells. **Pathol Int**, Victoria, v. 46, p. 807-833, 1996.

IMAI, Y.; YAMAKAWA, M.; KASAJIMA, T. The lymphocyte-dendritic cell system. **Histol Histopathol**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 469-510, Apr. 1998.

INGHIRAMI, G.; SZABOLCS, J. M.; YEE, H. T.; CORRANDINI, P.; CESARAMAN, E.; KNOWLES, D. M. Detection of immunoglobulin gene rearrangement of B cell non-Hodgkin's lymphomas and leukemias in fresh, unfixed and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by polymerase chain reaction. **Lab Invest**, Baltimore, v. 68, n. 6, p. 746-757, June 1993.

ISAACSON, P. G. Gastrointestinal lymphoma. **Hum Pathol**, Philadelphia, v. 25, n. 10, p. 1020-1029, Oct. 1994.

ISAACSON, P.; WRIGHT, D. H. Extranodal malignant lymphoma arising from mucosa-associated lymphoid tissue. **Cancer**, New York, v. 53, n. 11, p. 2515-2524, June 1984.

ISOLA, J.; DEVRIES, S.; CHU, L.; GHAZVINI, S.; WALMAN, F. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic

hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. **Am J Pathol**, New York, v. 145, n. 6, p. 1301-1308, Dec. 1994.

JAFFE, E. S. Histiocytoses of lymph nodes: biology and differential diagnosis. **Semin Diagn Pathol**, Philadelphia, v. 5, n. 4, p. 376-390, Nov. 1988.

JAFFE, E. S. **Surgical pathology of the lymph nodes and related organs**. 2nd ed. USA: W.B. Saunders, 1995. 659 p.

JAFFE, E. S.; HARRIS, N. L.; STEIN, H.; VARDIMAN, J. W. **World health organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. Lyon: IARC, 2001. 351 p.

JORDAN, R. C. K.; CHONG, L.; DIPIERDOMENICO, S.; SATIRA, F.; MAIN, J. H. P. Oral lymphoma in HIV infection. **Oral Dis**, London, v. 3, p. 5135-5137, May 1997. Suplemento 1.

KASSAN, S. S.; THOMAS, T. L.; MOUTSOPOULOS, H. M.; HOOVER, R.; KIMBERLY, R. P.; BUDMAN, D. R.; COSTA, J.; DECKER, J. L.; CHUSED, T. M. Increased risk of lymphoma in sicca syndrome. **Ann Intern Med**, Philadelphia, v. 89, n. 6, p. 888-892, Dec. 1978.

KORNSTEIN, M. J.; BONNER, H.; GEE, B.; COHEN, R.; BROOKS, J. J.

Leu M1 and S100 in Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphomas. **Am J Clin Pathol**, Baltimore, v. 85, n. 4, p. 433-437, Apr. 1986.

KRENÁCS, L.; TISZALVICZ, L.; KRENÁCS, T.; BOUMSELL, L.

Immunohistochemical detection of CD1A antigen in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections with monoclonal antibody 010. **J Pathol**, Edinburgh, v. 171, n. 2, p. 99-104, Oct. 1993.

KRUNDRAT, H. Ueber lympho-sarkomatosis. **Wein Klin Wochenschr**, Wein, v. 6, n., p. 211-213, 1893.

LANGFORD, A.; DIENEMANN, D.; SCHÜRMAN, D.; POHLE, H. D.; PAULI, G.; STEIN, P. Oral manifestation of AIDS-associated non-Hodgkin's lymphoma. **Int J Oral Maxillofac Surg**, Copenhagen, v. 20, n. 3, p. 136-141, July 1991.

LENNERT, K. Morphology and classification of malignant lymphomas and so-called reticuloses. **Acta Neuropathol**, Berlin, v. 6, n. 1, p. 1-16, 1975a.

LENNERT, K., STEIN, H.; KAISERLING, E. Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata. **Br J Cancer**, London, v. 31, n. 2, p. 29-43, Mar. 1975b.

LENOIR, G.; O'CONOR, G.; OLWENY, C. L. M. **Burkitt's lymphoma: a human cancer model.** Lyon: IARC Scientific, 1985. 190 p.

LEVINE, P. H.; KAMARAJU, L. S.; CONNELLY, R. R.; BERARD, C. W.; DORFMAN, R. F.; MAGRATH, I.; EASTON, J. M. The American Burkitt's Lymphoma Registry: eight years' experience. **Cancer**, New York, v. 49, n. 5, p. 1016-1022, Mar. 1982.

LIU, Y.-J.; JOHNSON, G. D.; GORDON, J.; MacLENNON, C. M. Germinal center in T-cell dependent antibody response. **Immunol Today**, Cambridge, v. 13, n.1, p. 17-21, Jan. 1992.

LUKES, R. J.; BUTLER J.; HICKS, E. B. The pathology and nomenclature of Hodgkin's disease. **Cancer Res**, Baltimore, v. 26, n. 6, p. 1311, June 1966.

LUKES, R. J.; BUTLER, J. J. The pathology and nomenclature of Hodgkin's disease. **Cancer Res**, Baltimore, v. 26, n. 6, p. 1063-1083, June 1966.

LUKES, R. J.; COLLINS, R. D. Immunological characterization of human malignant lymphomas. **Cancer**, New York, v. 34, n. 4, p. 1488-1503, Oct. 1974. Suplemento.

MACKENZIE, J.; GRAY, D.; PINTO-PAES, R.; BARREZUETA, L. F. M.; ARMSTRONG, A. A.; ALEXANDER, F. A.; MCGEOCH, D. J.; JARRET, R. F. Analysis of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1 subtypes in EBV-associated lymphomas from Brazil and the United Kingdom. **J Gen Virol**, London, v. 80, n. 10, p. 2741-2745, Oct. 1999.

MAEDA, K.; MATSUDA, M.; NARABAYASHI, M.; NAGASHIA, R.; DEGAWA, N.; IMAI, Y. Follicular dendritic cells in malignant lymphomas distribution, phenotypes & ultrastructures. **Adv Exp Med Biol**, New York, v. 329, p. 399-404, 1993.

MAGRATH, I. T. African Burkitt's lymphoma: histology, biology, clinical features, and treatment. **Am J Pediatr Hematol Oncol**, New York, v. 13, n. 2, p. 222-246, Summer 1991.

MANN, R. B.; JAFFE, E. S.; BERARD, C. W. Malignant lymphomas: A conceptual understanding of morphologic diversity. **Am J Pathol**, Philadelphia, v. 94, n. 1, p. 105-191, Jan. 1979.

MARTINS, M. T. **Estudo imuno-histoquímico dos componentes celulares e da matriz extracelular do sarcoma de Kaposi de boca em AIDS**. 1998. 99f . Tese (Doutorado em Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MATHE, G.; RAPPAPORT, H.; O'CONOR, G.T. **Histological and cytological typing of the neoplastic diseases of hematopoietic and lymphoid tissue**. Geneva: World Health Organization, 1976. 77p.
(International Histological Classification of Tumors, n.14).

MATSUMURA, F.; YAMASHIRO, S. Caldesmon. **Curr Opin Cell Biol**, London, v. 5, n. 1, p. 70-76, Feb. 1993.

McCARTHY, K. P., SLONE, J. P., WIEDEMANN, L. M. Rapid method for distinguishing clonal and polyclonal B cell populations in surgical biopsy specimens. **J Clin Pathol**, London, v. 43, n. 5, p. 429-432, May 1990.

MESQUITA, R. A., ANZAI, E. K., OLIVEIRA, R. N., NUNES, F. D. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesqui Odontol Bras**, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 314-319, out./dez. 2001.

MINISTERIO DA SAÚDE. DST e AIDS. Boletim epidemiológico - **AIDS**, Brasil, ano 14, n. 2, abr./jun. 2001. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br>>.
Acesso em: 12 dez. 2001.

MORI, N.; OKA, K.; KOJIMA, M. DCR antigen expression in B-cell lymphomas. **Am J Clin Pathol**, Baltimore, v. 89, n. 4, p. 488-492, Apr. 1988.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H.
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain
reaction. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, New York, v. 51, n.1, p. 263-
273, 1986.

NAKAMURA, N.; KUZE, T.; HASHIMOTO, Y.; HOSHI, S.; TOMINAGA, K.;
SASAKI, Y.; SHIRAKAWA, A.; SATO, M.; MAEDA, K.; ABE, M. Analysis of
the immunoglobulin heavy gene of secondary diffuse large B-cell lymphoma
that subsequently developed in four cases with B-cell chronic lymphocytic
leukemia or lymphoplasmacytoid lymphoma (Reichter syndrome). **Pathol**
Int, Victoria, v. 50, n. 8, p. 636-643, Aug. 2000.

NATHWANI, B. N.; KIN, H.; RAPPAPORT, H. Malignant lymphoma,
lymphoblastic. **Cancer**, New York, v. 38, n. 2, p. 964-983, Aug. 1976.

NINOMIYA, T.; NAITO, R.; OKADA, Y.; KOBAYASHI, K.; MORI, M.;
TSUKITANI, K. Immunohistochemical localization of the α and β subunits of
S-100 protein in pleomorphic adenoma of the salivary glands. **Virchows**
Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, Berlin, v. 57, n. 1, p. 63-75, 1989.

NOCINI, P. F.; MUZIO, L. L.; FIOR, A.; STAIBANO, S.; MIGNOGNA, M. D.
Primary non-Hodgkin's lymphoma of the jaws: imunohistochemical and
genetic review of 10 cases. **J Oral Maxillofac Surg**, Philadelphia, v. 58, n.6,
p. 636-644, June 2000.

NON-HODGKIN'S LYMPHOMA CLASSIFICATION PROJECT. A clinical evaluation of the international lymphoma study group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The non-Hodgkin's lymphoma classification project. **Blood**, New York, v. 89, n. 7, p. 3909-3918, Oct. 1997.

NON-HODGKIN'S LYMPHOMA PATHOLOGIC CLASSIFICATION PROJECT. National Cancer Institute sponsored study of classification of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of working formulation for clinical usage. **Cancer**, New York, v. 49, n. 10, p. 2112-2135, May 1982.

NORTON, A. J.; MATHEWS, J; PAPPA, V; SHAMASH, J.; LOVE, S.; ROHATINER, A. Z.; LISTER, T. A. Mantle cell lymphoma: natural history defined in a serially biopsied population over a 20-year period. **Ann Oncol**, Dordrecht, v. 6, n. 3, p. 249-256, Mar. 1995.

O'BRIAIN, D. S.; KENNEDY, M. J.; DALY, P. A.; O'BRIEN, A. A.; TANNER, W. A.; ROGERS, P.; LAWLOR, E. Multiple lymphomatous polyposis of the gastrointestinal tract. A clinico-pathologically distinctive form of non-Hodgkin's lymphoma of B-cell centrocytic type. **Am J Surg Pathol**, New York, v. 13, n. 8, p. 691-699, Aug. 1989.

OHNO, R.; YAMAGUCHI, M.; OKA, K.; MIWA, H.; KITA, K.; SHIRAKAWA, S. Frequent expression of CD3epsilon in CD3 (Leu 4)-negative T-cell lymphomas. **Leukemia**, New Jersey, v. 9, n. 1, p. 44-52, Jan. 1995.

PATTON, L. L.; McMILLAN, C. W.; WEBSTER, W. P. American Burkitt's lymphoma: a 10-year review and case study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 69, n.3, p. 307-316, Mar. 1990.

PHILIP, T.; LENOIR, G. M.; BRYON, P. A.; GERARD-MARCHANT, R.; SOUILLET, G.; PHILIPPE, N.; FREYCON, F.; BRUNAT-MEUTIGNEY, M. Burkitt-type lymphoma in France among non-Hodgkin malignant lymphoma in Caucasian children. **Br J Cancer**, London, v. 45, n. 5, p. 670-678, May 1982.

PILERI, S. A.; RONCADOR, G.; CECCARELLI, C.; PICCIOLI, M.; BRISKOMATIS, A.; SABATTINI, E.; ASCANI, S.; SANTINI, D.; PICCALUGA, P.; LEONE, O.; DAMIANI, S.; ERCOLESSI, C.; SANDRI, F.; PIERI, F.; LEONCINI, L.; FALINI, B. Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods. **J Pathol**, Edinburgh, v. 183, n. 1, p. 116-123, Sept. 1997.

PINKUS, G. S.; O'HARA, C. J.; SAID, J. W. Peripheral/post-thymic T-cell lymphomas: a spectrum of disease. Clinical, pathologic, and immunologic features of 78 cases. **Cancer**, New York, v. 65, n. 4, p. 971-998, Feb. 1990.

PINTO Jr., D. S. **Estudo imuno-histoquímico dos linfomas malignos de boca**. 1989. 75 f. Tese (Mestrado em Semiologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PORTER, S. R.; DIOS, P. D.; KUMAR, N.; STOCK, C.; BARRETT, A. W.; SCULLY, C. Oral plasmablastic lymphoma in previously undiagnosed HIV disease. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 87, n. 6, p. 730-734, June 1999.

PREVOT, S.; HAMILTON-DUTROIT, S.; AUDOUIN, J.; WALTER, P. PALLESEN, G.; DIEBOLD, J. Analysis of African Burkitt's and high-grade B cell non-Burkitt's lymphoma for Epstein-Barr virus genomes using in situ hybridization. **Br J Haematol**, Oxford, v. 80, n. 1, p. 27-32, Jan. 1992.

QIN, Y.; GREINER, A.; TRUNK, M. J.; SCHUMAUSSER, B.; OTT, M. M.; MULLER-HERMELINK, H. K. Somatic hypermutation in low-grade mucosa-associated lymphoid tissue-type B-cell lymphoma. **Blood**, New York, v. 86, n. 9; p. 3528-3534, Nov. 1995.

RAAB-TRAUB, N.; WEBSTER-CYRIAQUE, J. Epstein-Barr virus infection and expression in oral lesions. **Oral Dis**, London, v. 3, p. S164-S170, May 1997. Suplemento 1.

RAMASAMY, I.; BRISCO, M.; MORLEY, M. Improved PCR method for detecting monoclonal immunoglobulin heavy chain rearrangement in B cell neoplasm. **J Clin Pathol**, London, v. 45, n. 9, p. 770-775, Sept. 1992.

RAPHAEL, M. M.; AUDOUIN, J.; LAMINE, M.; DELECLUSE, H.-J.;
 VUILLAUME, M.; LENOIR, G. M.; GISSELBRECHT, C.; LENNERT, K.;
 DIEBOLD, J. Immunophenotypic and genotypic analysis of acquired
 immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphomas. **Am J Clin
 Pathol**, Baltimore, v. 101, n. 6, p. 773-782, June 1994.

RAPPAPORT, H. **Tumors of the hematopoietic system**. In: **Atlas of
 tumor pathology**, Section 3, Fascicle 8. Washington, D. C., USA: Armed
 Force Institute of Pathology, 1966.

RAVETCH, J. V.; SIEBENLIST, U.; KORSMEYER, S.; WALDMANN, T.;
 LEDER, P. Structure of the human immunoglobulin locus: characterization of
 embryonic and rearranged J and D genes. **Cell**, Cambridge, v. 27, n. 3, p.
 583-591, Dec. 1981.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 5^a ed. Tradução Ida
 Cristina Gubert. São Paulo: Manole, 1999. cap. 1-4, p. 1-54.

SANDLUND, J. T.; DOWNING, J. R.; CRIST, W. M. Non-Hodgkin's
 lymphoma in children. **N Engl J Med**, Waltham, v. 334, n. 19, p. 1238-1248,
 May 1996.

SANDLUND, J. T.; FONSECA, T.; LEIMIG, T.; VERISSIMO, L.; RIBEIRO, R.; LIRA, V.; BERARD, C. W.; SIXBEY, J.; CRIST, W. M.; MAO, L.; CHEN, G.; PUI, C.H.; HEIM, M.; PEDROSA, F. Predominance and characteristics of Burkitt lymphoma among children with non-Hodgkin lymphoma in northeastern Brazil. **Leukemia**, New Jersey, v. 11, n. 5, p. 743-746, May 1997.

SHAMOTO, M.; OSADA, A.; SHINZATO, M.; KANEKO, C.; SHIMIZU, M. A comparative study on Langerhans cells in lymph nodes with dermatopathic lymphadenopathy and histiocytosis X cells. **Adv Exp Med Biol**, New York, v. 378, p. 139-141, 1995.

SHAPIRA, J.; PEYLAN-RAMU, N. Burkitt's lymphoma. Review. **Oral Oncol**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 15-23, Jan. 1998.

SHI, S.-R.; COTE, R. J.; TAYLOR, C. R. Antigen retrieval immunohistochemistry and molecular morphology in the year 2001. **Appl Immunohistochem Molecul Morphol**, Hagerstown, v. 9, n. 2, p. 107-116, June 2001.

SHINZATO, M.; SHAMOTO, M.; HOSOKAWA, S.; KANEKO, C.; OSADA, A.; SHIMIZU, M.; YOSHIDA, A. Differentiation of langerhans cells from interdigitating cells using CD1a and S-100 protein antibodies. **Biotech Histochem**, Baltimore, v. 70, n. 3, p. 114-118, May 1995.

SLOOTWEG, P. J.; WITTKAMPF, A. R. M.; KLUIN, P. M.; WILDE, P. C. M.;

VAN UNNIK, J. A. M. Extranodal non-Hodgkin's lymphoma of the oral tissues. **J Maxillofac Surg**, Stuttgart, v. 13, n. 1, p. 85-92, Feb. 1985.

SNEDECOR, G. M.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. Iowa: Iowa State University, 1967. 570 p.

SOBUE, K.; SELLERS, J. R. Caldesmon, a novel regulatory protein in smooth muscle and nonmuscle actomyosin systems. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 266, n. 19, p.12115-12118, July 1991.

SPINA, D.; LEONCINI, L.; MEGHA, T.; GALLORINI, M.; DISANTO, A.; TOSI, P.; ABINYA, O.; NYONG'O, A.; PILERI, S.; KRAFT, R.; LAISSUE, J. A.; COTTIER, H. Cellular kinetic and phenotypic heterogeneity in and among Burkitt's and Burkitt-like lymphoma. **J Pathol**, Edinburgh, v. 182, n. 3-4, p. 145-150, June 1997.

STEIMMAN, R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. **Annu Rev Immunol**, Palo Alto, v. 9, p. 271-296, 1991.

TAKAHASHI, K.; ASAGOE, K.; ZAISHUN, J.; YANAI, H.; YOSHINO, T.; HAYASHI, K.; AKAGI, T. Heterogeneity of dendritic cells in human superficial lymph node. *In vitro* maturation of immature dendritic cells

into Mature or activated interdigitating reticulum cells. **Am J Pathol**, Philadelphia, v. 153, n. 3, p. 745-755, Sept. 1998.

TAKAHASHI, K.; YAMAGUCHI, H.; ISHIZEKI, J.; NAKAJIMA, T.; NAKAZATO, Y. Immunohistochemical and immunoelectron microscopic localization of S100 protein in the interdigitating reticulum cells of human lymph nodes. **Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol**, Berlin, v. 37, n. 2, p. 125-137, 1981.

TAMARU, J.; HUMMEL, M.; MARAFIOTI, T.; KALVELAGE, B.; LEONCINI, L.; MINACCI, C.; TOSI, P.; WRIGHT, D.; STEIN, H. Burkitt's lymphomas express VH genes with a moderate number of antigen-selected somatic mutation. **Am J Pathol**, Philadelphia, v. 147, n. 5, p. 1398-1407, Nov. 1995.

TAO, Q.; ROBERTSON, K. D.; MANNS, A.; HILDESHEIM, A.; AMBINDER, R. F. Epstein-Barr virus (EBV) in endemic Burkitt's lymphoma: molecular analysis of primary tumor tissues. **Blood**, New York, v. 91, n. 4, p. 1373-1381, Feb. 1998.

TEW, J. G. Follicular dendritic cells and dendritic cell nomenclature. **Adv Exp Med Biol**, New York, v. 329, p. 467-468, 1993.

TEW, J. G.; WU, J.; QIN, D.; HELM, S.; BURTON, G. F.; SZAKAL, A. K.

Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. **Immunol Rev**, Copenhagen, v. 156, p. 39-52, Apr. 1997.

THIEBLEMONT, C.; BASTION, Y.; BERGER, F.; RIEUX, C.; SALLES, G.;

DUMONTET, C.; FELMAN, P.; COIFFIER, B. Mucosa-associated lymphoid tissue gastrointestinal and nongastrointestinal lymphoma behavior: analysis of 108 patients. **J Clin Oncol**, Philadelphia, v. 15, n. 4, p. 1624-1630, Apr. 1997.

TONEGAWA, S. Somatic generation of antibody diversity. **Nature**, London, v. 302, n. 14, p. 575-581, Apr. 1983.

TRAINOR, K. J.; BRISCO, M. J.; STORY, C. J.; MORLEY, A. A.

Monoclonality in B-lymphoproliferative disorders detected at the DNA level. **Blood**, New York, v. 75, n. 11, p. 2220-2222, June 1990.

TSANG, W. M.; TONG, A. C. K.; LAM, K. Y.; TIDEMAN, H. Nasal T/NK cell lymphoma: report of 3 cases involving the palate. **J Oral Maxillofac Surg**, Philadelphia, v. 58, n. 11, p. 1323-1327, Nov. 2000.

TSUNODA, T.; YAMAKAWA, M.; TAKAHASHI, T. Differential expression of Ca^{2+} -binding proteins on follicular dendritic cells in non-neoplastic and

neoplastic lymphoid follicles. **Am J Pathol**, Philadelphia, v. 155, n. 3, p. 805-814, Sept. 1999.

TURLEY, H.; JONES, M.; ERBER, W.; MAYNE, K.; WAELE, M.; GATTER, K. VS38: a new monoclonal antibody for detecting plasma cell differentiation in routine sections. **J Clin Pathol**, London, v. 47, n. 5, p. 418-422, May 1994.

TURNER, R. R.; WOOD, G. S.; BECKSTEAD, J. H.; COLBY, T. V.; HORNING, S. J.; WARNKE, R. A. Histiocytic malignancies. Morphologic, immunologic, and enzymatic heterogeneity. **Am J Surg Pathol**, Philadelphia, v. 8, n. 7, p. 485-493, Jul 1984.

UEKI, N.; SOBUE, K.; KANDA, K.; HADA, T.; HIGASHINO, K. Expression of high and low molecular weight caldesmon during phenotypic modulation of smooth muscle cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 84, n. 24, p. 9048-9053, Dec. 1987.

VIRCHOW, R. L. K. **Die celluläre pathologie in ihrer begründung auf physiologische und pathologische gewebelehre**. Berlin: Hirschwald, 1858. 190 p.

WALDMANN, T. A. The arrangement of immunoglobulin and T cell receptor genes in human lymphoproliferative disorders. **Adv Immunol**, New York, v. 40, p. 247-321, 1987.

WAN, J. H.; TRAINOR, K. J.; BRISCO, M.; MORLEY, A. A. Monoclonality in B cell lymphoma detected in paraffin wax embedded sections using the polymerase chain reaction. **J Clin Pathol**, London, v. 43, n. 11, p. 888-90, Nov. 1990.

WEIRICH, G., FUNK, A.; HOEPNSER, I.; HEICHER, U.; NOLC, S.; PUTZ, B.; FELLBAUM, C.; HOFER, H. PCR-based assay for the detection of monoclonality in non-Hodgkin's lymphoma: application to formalin-fixed, paraffin-embedded tissue and decalcified bone marrow samples. **J Mol Med**, Berlin, v. 73, n. 5, p. 235-241, May 1995.

WILKS, S. Cases of enlargement of the lymphatic glands and spleen (or, Hodgkin disease), with remarks. **Guys Hosp Rep**, London, v. 11, p. 56-67, 1865.

WONG, D. S., FULLER, L. M.; BUTLER, J. J.; SHULLENBERGER, C. C. Extranodal Non-Hodgkin's lymphomas of the Head and Neck. **Am J Roentgenol**, Springfield, v. 123, n. 3, p. 471-481, Mar. 1975.

WOTHERSPOON, A. C.; ORTIZ-HIDALGO, C.; FALZON, M. R.; ISAACSON, P. G. Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. **Lancet**, London, v. 338, n. 8776, p. 1175-1176, Nov. 1991.

WU, T. C.; MANN, R. B.; EPSTEIN, J. I.; MACMAHON, E.; LEE, W. A.; CHARACHE, P.; HAYWARD, S. D.; KURMAN, R. J.; HAYWARD, G. S.; AMBINDER, R. F. Abundant expression of EBER 1 small nuclear RNA in nasopharyngeal carcinoma. A morphologically distinctive target for detection of Epstein-Baar virus in formalin-fixed paraffin-embedded carcinoma specimens. **Am J Pathol**, Philadelphia, v. 138, n. 6, p. 1461-1469, June 1991.

YAMADA, M.; HUDSON, S.; TOURNAY, O.; BITTENBENDER, S.; SHANE, S.S.; LANGE, B.; TSUJIMOTO, Y.; CATON, A. J.; ROVERA, G. Detection of minimal disease in haematopoietic malignancies of the B-cell lineage by using third complementary-determining region (CDR-III)-specific probes. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 86, n. 13, p. 5123-5127, July 1989.

YANO, T.; SANDER, C. A.; CLARK, H. M.; DOLEZAL, M. V.; JAFFE, E. S.; RAFFELD, M. Clustered mutation in the second exon of the MYC gene in sporadic Burkitt's lymphoma. **Oncogene**, Basingstoke, v. 8, n. 10, p. 2741-2748, Oct. 1993.

YIN, H.; JIA, L.; OKADA, N.; TAKAGI, M. Comparative study of clinicopathological features of extranodal oral non-Hodgkin's lymphoma (NHL) and maxillofacial nodal NHL. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 5, n. 1, p. 15-23, July 2000.

ZIEGLER, J. L.; BECKSTEAD, J. A.; VOLBERDING, P. A.; ABRAMS, D. I.; LEVINE, A. M.; LUKES, R. J.; GILL, P. S.; BURKES, R.L.; MEYER, P. R.; METROKA, C. E. Non-Hodgkin's lymphoma in 90 homosexual men. Relation to generalized lymphadenopathy and the acquired immunodeficiency syndrome. **N Engl J Med**, Waltham, v. 311, n. 9, p. 565-570, Aug. 1984.

ZIEGLER, J. L.; BLUMING, A. Z.; MORROW, R. H.; FASS, L.; CARBONE, P. P. Central nervous system involvement in Burkitt's lymphoma. **Blood**, New York, v. 36, n. 6, p. 718-728, Dec. 1970.

SUMMARY

ORAL LYMPHOMAS: RECLASSIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE DENDRITIC CELL

The aim of this study was to evaluate and reclassify oral lymphomas in accordance with WHO-2001. Forty-six oral lymphomas were included in the study. Clinical data, hematoxylin and eosin patterns were considered. The tumors were then submitted to immunohistochemical for immunophenotype and characterize the dendritic cell, to "in situ" hybridization for Epstein-Barr virus (EBV) and to polymerase chain reaction for confirmation of the monoclonality in the B cell lymphoid neoplasm. The oral lymphomas were more frequent in white males. Mature B cell lymphoid neoplasm was the commonest lesion in these patients (91.3%). The age of the patients varied in the different histological types. The oral lymphomas were mainly found in oral soft tissue, except the Burkitt's lymphoma, that was localized more frequently in the mandible. CD20/CD79a and CD45RO/CD3 antibodies were typically expressed in all cases of the mature B cell lymphoid neoplasm and mature T cell and NK cell lymphoid neoplasm, respectively. Epstein-Barr virus was present in diffuse large B cell lymphoma, plasmablastic subtype, in the Burkitt's lymphoma and in the extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type.

Fourteen cases (87.5%) of oral mature B cell lymphoid neoplasm presented immunoglobulin heavy chain gene (IgH) with monoclonal band. Follicular dendritic cells positive for CD21 and CD35 antibodies were expressed in the pseudofollicular and follicular centers of two cases of the diffuse large B cell lymphoma and in one case of MALT lymphoma, respectively. This immunohistological stain also was present in the mantle cell lymphoma. Follicular dendritic cells positive for caldesmon antibody and interdigitating dendritic cells positive for S100 protein antibody were present in all oral lymphomas. Burkitt's lymphoma was less positive for caldesmon/follicular dendritic cells and for S100 protein/interdigitating dendritic cells than diffuse large B cell lymphoma and diffuse large B cell lymphoma, plasmablastic subtype. Morphologic pattern in association with clinical data, immunohistochemical profile, detection of EBV and confirmation of monoclonality are key informations for the diagnosis of oral lymphomas. The microenvironment organized by lymphomas is important to development of dendritic cells.

Autorização para Reprodução

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial da presente obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte e comunicada, ao autor, a referência em que consta a citação.

Ricardo Alves de Mesquita

Faculdade de Odontologia da Universidade de Minas Gerais

Disciplina de Patologia e Semiologia Bucal

São Paulo, 21 de fevereiro de 2002