Ívison Xavier Duarte

**Linfoma folicular em pacientes até 40 anos:
características anátomo-clínicas e moleculares**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Bacchi

**SÃO PAULO
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Duarte, Íverson Xavier

Linfoma folicular em pacientes até 40 anos : características anátomo-clínicas e
moleculares / Íverson Xavier Duarte. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Patologia.

Orientador: Carlos Eduardo Bacchi.

Descritores: 1.Linfoma folicular/patologia 2.Adulto jovem 3.Sobrevida
4.Imunofenotipagem 5.Prognóstico

USP/FM/DBD-325/13

Dedicatória

Aos meus pais, Ronaldo e Déa, começo de tudo.

*A Pollyanna pelo apoio incondicional,
pelas tristezas compartilhadas,
pelos sonhos realizados.*

A Alice, Saul e Clara, razão de tudo.

Agradecimentos

Existem pessoas a quem respeitamos pelo conhecimento, outras a quem admiramos pelas atitudes. Ao professor Dr. Carlos Eduardo Bacchi, meu respeito e admiração.

À Dra. Sheila Wludarski, responsável pelo projeto inicial que deu origem à esta tese, por gentilmente ter permitido que eu desse seguimento ao estudo.

À Dra. Yaso Natkuman, pelas ideias fundamentais ao longo da execução do projeto, insumos e auxílio, especialmente na fase de escrita do artigo.

À Dra. Maura Bacchi, pelo apoio e confiança.

À Dra. Gabriela Gualco, pelas numerosas sugestões e contribuições ao longo da execução deste projeto.

Aos Drs. Eduardo Queiroga e Lisandro Lopes, especialmente, pela ajuda na interpretação dos exames de FISH.

Aos colegas do Laboratório Bacchi/Consultoria em Patologia, além dos já citados, Bruna Estrozi, Cristiane Cançado, Donizete Scudeler, Marcelo Moraes e Rafael Moura, pela convivência durante todos esses anos.

Aos técnicos dos laboratórios de histologia e imuno-histoquímica do Laboratório Bacchi/Consultoria em Patologia pela realização dos procedimentos essenciais à concretização desse trabalho.

Aos professores Dra. Cláudia Zerbini, Dra. Thais Mauad e Dr. Carlos Chiattoni, pela contribuição científica no exame de qualificação.

Aos pacientes e médicos que concordaram em participar deste trabalho, fornecendo material para que esta tese pudesse ser realizada.

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Linfoma folicular: aspectos gerais.....	3
1.2 Linfoma folicular em pacientes jovens.....	12
1.3 Linfoma folicular pediátrico.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
3 MÉTODOS.....	19
3.1 Seleção de casos e delineamento do estudo.....	21
3.2 Levantamento de informações clínicas.....	22
3.3 Avaliação morfológica.....	23
3.4 Construção da micromatriz tecidual (TMA).....	24
3.5 Imuno-histoquímica	25
3.6 FISH	28
3.7 Análise estatística.....	32
3.8 Agrupamento hierárquico	33
4 RESULTADOS.....	35
4.1 Epidemiologia	37
4.2 Sítios de acometimento	41
4.3 Aspectos clínicos.....	42
4.3.1 Anemia	42
4.3.2 Nível de DHL	43
4.3.3 Infiltração de medula óssea.....	45
4.3.4 Estadiamento de Ann Arbor	46
4.3.5 FLIPI.....	48
4.4 Aspectos morfológicos.....	52

4.4.1 Gerais.....	52
4.4.2 Persistência da zona do manto	53
4.4.3 Presença de áreas difusas	55
4.4.4 Padrão de “céu estrelado”	57
4.4.5 Presença de fibrose.....	59
4.5 Distribuição qualitativa das variáveis imuno-histoquímicas e relação com sobrevida.	61
4.5.1 Imuno-expressão de CD10.....	61
4.5.2 Imuno-expressão de BCL6.....	62
4.5.3 Imuno-expressão de BCL2.....	64
4.5.4 Imuno-expressão de MUM1/IRF4	65
4.5.5 Imuno-expressão de CD23.....	67
4.5.6 Trama de células foliculares dendríticas	70
4.5.7 Clonalidade	72
4.6 Distribuição semi-quantitativa de variáveis imuno-histoquímicas	73
4.6.1 Imunoexpressão de MDM2	73
4.6.2 Imunoexpressão de Ki-67.....	75
4.7 FISH	77
4.7.1 Rearranjo do gene <i>BCL2</i>	77
4.7.2 Rearranjo do gene <i>BCL6</i>	79
4.8 Correlação entre variáveis.....	84
4.8.1 Imunoexpressão de CD10 e MUM1/IRF4.....	84
4.8.2 Rearranjos dos genes <i>BCL2</i> e <i>BCL6</i>	85
4.9 Agrupamento hierárquico	89
5 DISCUSSÃO.....	91
6 CONCLUSÕES.....	103
7 REFERÊNCIAS	107
APÊNDICES	119

Lista de abreviaturas e siglas

AFIP: Instituto de Patologia das Forças Armadas

CFD: células foliculares dendríticas

CG: centros germinativos

CGA: campo de grande aumento

DHL: desidrogenase láctica

EUA: Estados Unidos da América

FISH: hibridização “in situ” por fluorescência

FLIPI: Índice prognóstico internacional do linfoma folicular

LDGCB: linfoma difuso de grandes células B

LF: linfoma folicular

LNH: linfoma não Hodgkin

OMS: Organização Mundial da Saúde

SIDA: síndrome da imunodeficiência adquirida

SOE: sem outra especificação

TMA: micromatriz tecidual

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Especificações dos antígenos primários, fonte e recuperação antigênica	27
Tabela 2 – Médias de sobrevida para faixa etária.....	38
Tabela 3 – Distribuição dos 208 casos de LF <40 anos de acordo com as regiões geográficas do Brasil.....	39
Tabela 4 – Médias de sobrevida para diferentes Regiões do Brasil.....	40
Tabela 5 – Distribuição dos casos segundo anemia	42
Tabela 6 – Médias de sobrevida para anemia.....	43
Tabela 7 – Distribuição dos casos segundo o nível do DHL	44
Tabela 8 – Médias de sobrevida em função do DHL.....	44
Tabela 9 – Distribuição dos casos segundo infiltração de medula óssea	45
Tabela 10 – Médias de sobrevida para infiltração de medula óssea	46
Tabela 11 – Distribuição dos casos segundo estadiamento de Ann Arbor...	47
Tabela 12 – Médias de sobrevida para os diferentes estádios	48
Tabela 13 – Distribuição dos casos segundo FLIPI	48
Tabela 14 – Médias de sobrevida para categorias de risco do FLIPI.....	49
Tabela 15 – Consolidado das informações clínicas de 208 casos de LF em pacientes adultos jovens (<40 anos)	50
Tabela 16 – Médias de sobrevida para o grau histológico (OMS)	53
Tabela 17 – Distribuição dos casos segundo a persistência da zona do manto.....	54
Tabela 18 – Médias de sobrevida para zona do manto.....	55
Tabela 19 – Distribuição dos casos segundo áreas difusas.....	56
Tabela 20 – Médias de sobrevida para área difusa.....	57
Tabela 21 – Distribuição dos casos segundo “céu estrelado”	57
Tabela 22 – Médias de sobrevida para “céu estrelado”	58
Tabela 23 – Distribuição dos casos segundo fibrose	59
Tabela 24 – Médias de sobrevida para fibrose.....	60
Tabela 25 – Distribuição dos casos segundo expressão de CD10	61

Tabela 26 – Médias de sobrevida para expressão CD10.....	62
Tabela 27 – Distribuição dos casos segundo expressão de BCL6.....	63
Tabela 28 – Médias de sobrevida segundo expressão de BCL6	64
Tabela 29 - Distribuição dos casos segundo expressão de BCL2	65
Tabela 30 – Distribuição dos casos segundo expressão de MUM1/IRF4	65
Tabela 31 – Médias de sobrevida para expressão de MUM1/IRF4.....	67
Tabela 32 – Distribuição dos casos segundo expressão de CD23	68
Tabela 33 – Médias de sobrevida para expressão de CD23.....	69
Tabela 34 – Distribuição dos casos segundo trama de CFD	70
Tabela 35 – Médias de sobrevida segundo trama de CFD	71
Tabela 36 – Distribuição dos casos segundo clonalidade.....	72
Tabela 37 – Médias de sobrevida para clonalidade	73
Tabela 38 – Distribuição dos casos segundo imunoexpressão de MDM2 ...	74
Tabela 39 – Médias de sobrevida para MDM2≥20%.....	75
Tabela 40 – Distribuição dos casos segundo Ki-67.....	76
Tabela 41 – Médias de sobrevida para expressão de Ki-67≥50%	77
Tabela 42 – Distribuição dos casos segundo rearranjo do gene <i>BCL2</i>	78
Tabela 43 – Médias de sobrevida para rearranjo do gene <i>BCL2</i>	79
Tabela 44 – Distribuição dos casos segundo rearranjo do gene <i>BCL6</i>	80
Tabela 45 – Médias de sobrevida para rearranjo do <i>BCL6</i>	81
Tabela 46 – Consolidado de dados morfológicos, imunofenotípicos e moleculares de 208 casos de LF em pacientes jovens	82
Tabela 47 – Distribuição dos casos segundo a relação da expressão de CD10 e MUM1	84
Tabela 48 – Médias de sobrevida segundo a expressão de CD10 e MUM1	85
Tabela 49 – Distribuição dos casos segundo a relação dos rearranjos dos genes <i>BCL2</i> e <i>BCL6</i>	86
Tabela 50 – Médias de sobrevida segundo os rearranjos de <i>BCL2</i> e <i>BCL6</i>	87
Tabela 51 – Correlação entre os rearranjos de <i>BCL2</i> e <i>BCL6</i> com variáveis clínicas, morfológicas e imunofenotípicas.....	88

Lista de Figuras

Figura 1 – Diferenças histológicas e imuno-histoquímicas entre hiperplasia linfoide e linfoma folicular. (A-C): folículo linfoide em linfonodo reativo. (D-F): linfoma folicular (Leich, <i>et al.</i> 2011)	4
Figura 2 – Exemplos de LF por grau. A) LF grau 1 (Hematoxilina e eosina, 400x). B) LF grau 2 (Hematoxilina e eosina, 400x). C) LF grau 3A (Hematoxilina e eosina, 400x). D) LF grau 3B (Hematoxilina e eosina, 400x)	5
Figura 3 – Expressão imuno-histoquímica em LF: A) CD20 (em padrão membrana); B) BCL6 (padrão nuclear); C) CD10 (padrão membrana) e D) BCL2 (padrão citoplasmático)	7
Figura 4 – Painel A: esquema da ontogenia do linfócito B. Painel B: esquema da patogenia do LF (Natkunam 2007)	9
Figura 5 – Modelo de duas vias para o LF (de Jong 2005)	11
Figura 6 – Mapas demonstrando a distribuição de casos de linfoma no Laboratório Bacchi por Estado. No painel A, todos os casos de linfoma não Hodgkin entre 2004 e 2011 (16.594 casos). No painel B, os 208 casos de LF em pacientes ≤ 40 anos de idade entre 1997 e 2011	21
Figura 7 – Imagem da tela do programa Filemaker Pro 12, utilizado para arquivamento dos dados coletados	23
Figura 8 – A) Fotografia do <i>array</i> de tecido utilizado na construção dos blocos de TMA. B) Exemplo de bloco de parafina “receptor” (bloco de TMA)	25
Figura 9 – Mapa de TMA, utilizado para a orientação da inclusão dos casos nos blocos de TMA e, posteriormente, a identificação dos casos para a interpretação dos resultados obtidos	25
Figura 10 – A) Esquema da LSI [®] BCL2 Dual Colour Break Apart Rearrangement Probe, Cód. 30-231029 (Vysis, Downers Grove, IL), com o ponto de quebra na região 18q21. B) Esquema da LSI [®] BCL6 Dual Colour, Break Apart Rearrangement Probe, Cód. 32-191016	

(Vysis, Downers Grove, IL), com ponto de quebra na região 3q27 (adaptado de http://www.abbottmolecular.com).....	30
Figura 11 – Fotografia da tela do programa Metafer 4, utilizado para quantificação dos sinais fluorescentes na técnica de FISH	31
Figura 12 – Fotomicrografias de casos avaliados com a sonda LSI® BCL2 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe. A: célula negativa apresentando sinais verdes e laranja unidos. B: células positivas apresentando um sinal verde e um sinal laranja separados e fusão de sinal verde com sinal laranja, indicando a presença de rearranjo do gene <i>BCL2</i>	32
Figura 13 – Distribuição dos 208 casos de LF por idade e sexo	37
Figura 14 – Sobrevida geral nos casos de LF por faixa etária (n=126)	38
Figura 15 – Distribuição no Brasil dos 208 casos de LF em pacientes jovens, por cidade	39
Figura 16 – Sobrevida geral nos casos de LF por região geográfica (n=126)	40
Figura 17 – Sobrevida geral nos casos de LF por sítio de acometimento (n=126)	41
Figura 18 – Sobrevida geral nos casos de LF por anemia (n=75)	43
Figura 19 – Sobrevida geral nos casos de LF por DHL (n=73).....	44
Figura 20 – Sobrevida geral nos casos de LF por infiltração de medula óssea (n=78)	46
Figura 21 – Sobrevida geral nos casos de LF por estadiamento (n=88)	47
Figura 22 – Sobrevida geral nos casos de LF por grau de risco do FLIPI (n=73)	49
Figura 23 – Distribuição dos 208 casos de LF de acordo com o grau histológico (OMS)	52
Figura 24 – Sobrevida geral nos casos de LF por grau histológico (OMS) (n=126)	53
Figura 25 – Exemplos de casos de LF com persistência da zona do manto. Casos 86 (esquerda) e 164	54
Figura 26 – Sobrevida geral nos casos de LF por zona do manto (n=121) ..	55

Figura 27 – Sobrevida geral nos casos de LF por áreas difusas (n=121)....	56
Figura 28 – Exemplo de padrão de céu estrelado 3+ (caso 85)	58
Figura 29 – Sobrevida geral nos casos de LF por padrão de “céu estrelado” (n=121)	58
Figura 30 – Exemplos de casos de LF com fibrose 3+. Casos 48 (esquerda) e168 (direita).....	60
Figura 31 – Sobrevida geral nos casos de LF por fibrose (n=121)	60
Figura 32 – Sobrevida geral nos casos de LF por expressão de CD10.....	62
Figura 33 – Sobrevida geral nos casos de LF por expressão de BCL6	64
Figura 34 – Exemplo de expressão de MUM1/IRF4 em caso de LF (caso 130)	66
Figura 35 – Sobrevida geral nos casos de LF por expressão de MUM1/IRF4	67
Figura 36 – Exemplo de expressão de CD23 nas células neoplásicas em caso de LF (caso 149)	68
Figura 37 – Sobrevida geral nos casos de LF por expressão de CD23.....	69
Figura 38 – Exemplo de trama de CFD preservada avaliada através da imunoexpressão de CD23 (caso 86)	70
Figura 39 – Sobrevida geral nos casos de LF por estado da trama de CFD	71
Figura 40 – Sobrevida geral nos casos de LF por clonalidade	73
Figura 41 – Sobrevida geral nos casos de LF por expressão de MDM2≥20%	75
Figura 42 – Sobrevida geral nos casos de LF por expressão de Ki-67≥50%	77
Figura 43 – Sobrevida geral nos casos de LF por rearranjo do gene <i>BCL2</i>	79
Figura 44 – Sobrevida geral nos casos de LF por rearranjo do gene <i>BCL6</i>	80
Figura 45 – Sobrevida geral nos casos de LF de acordo com a relação entre expressão de CD10 e MUM1	85
Figura 46 – Sobrevida geral nos casos de LF de acordo com a relação entre rearranjos dos genes <i>BCL2</i> e <i>BCL6</i>	87
Figura 47 – Agrupamento hierárquico baseado em variáveis clínicas e patológicas de 94 casos de LF em adultos jovens. Os casos puderam ser divididos em grupos A e B	90

RESUMO

Duarte IX. Linfoma folicular em pacientes até 40 anos: características anátomo-clínicas e moleculares [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

O linfoma folicular é entidade clinicamente heterogênea, com carência de marcadores prognósticos que estratifiquem grupos de risco para otimização do manejo. É relativamente raro em pacientes abaixo de 40 anos. Os aspectos clínicos e patológicos desse tipo de linfoma, nessa faixa etária, assim como o comportamento biológico, são pouco conhecidos. No presente estudo, uma série de 208 pacientes entre 19-40 anos de idade foi, retrospectivamente, avaliada quanto aos achados anatomoclínicos e moleculares. Essas variáveis foram, então, correlacionadas com seguimento e sobrevida. A mediana de idade na apresentação foi de 35 anos, com leve predomínio no sexo feminino (56%). A maioria dos casos se manifestou como doença nodal (87%). Concomitância de linfoma folicular com linfoma difuso de grandes células B foi encontrada em 7 (3%) pacientes. Estudos imuno-histoquímicos revelaram expressão de CD10 (91%), BCL6 (97%), BCL2 (95%), MUM1/IRF4 (17%) e CD23 (25%). Rearranjos envolvendo os genes *BCL2* e *BCL6* foram encontrados em 74% e 20%, respectivamente. A sobrevida média geral estimada dos pacientes, em que foi possível o seguimento, foi de 13 anos. Presença de anemia, elevação da desidrogenase láctica, acometimento de medula óssea, índice prognóstico internacional do linfoma folicular na faixa de alto risco, padrão de “céu estrelado”, Ki-67 $\geq$ 50% e ausência do rearranjo do gene *BCL2* e presença do *BCL6* relacionaram-se diretamente com pior sobrevida geral. O estadiamento de Ann Arbor III/IV e MDM2 $\geq$ 20% têm fortes indícios desta associação negativa com sobrevida geral. A combinação *BCL2*+ e *BCL6*–correlacionou-se com maior sobrevida média. O grau histológico determinou redução gradual da sobrevida, com semelhanças nas curvas de sobrevida

entre os graus 1, 2 e 3A. Não houve diferença significativa para as curvas de sobrevida relacionando faixa etária, persistência da zona do manto, presença de áreas difusas, fibrose, expressão de CD10, BCL6 ou CD23, padrão de trama de células foliculares dendríticas ou clonalidade para cadeia leve de imunoglobulina. Esses achados revelaram que o linfoma folicular em adultos jovens apresenta similaridades com o linfoma folicular que ocorre em adultos mais velhos, incluindo a frequência de apresentação nos diversos sítios anatômicos, grau histológico e fatores prognósticos adversos.

Descritores: 1.Linfoma folicular/patologia 2.Adulto jovem 3.Sobrevida 4.Imunofenotipagem 5.Prognóstico

SUMMARY

Duarte IX. Follicular lymphoma in patients younger than 40 years: a clinicopathological and molecular study [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013.

Follicular lymphoma is a clinically heterogeneous group of disease and therefore with a need of characterization of prognostic markers to stratify risk groups and to optimize clinical management. It is relatively rare in patients younger than 40 years, and the clinicopathologic characteristics and biological behavior in this age group are poorly understood. In the current study, samples from a cohort of 208 patients between 19-40 years of age were evaluated retrospectively with respect to clinical, histologic and molecular characteristics. These findings were then correlated with the follow up and the clinical outcome. The median age at presentation was 35 years with a slight female preponderance (56%). Most of the cases presented with nodal disease (87%). Concomitant follicular lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma was observed in 7 (3%) patients. Immunohistological studies showed the expression in the following frequency: CD10 (91%), BCL6 (97%), BCL2 (95%), MUM1/IRF4 (12%), MDM2 (17%) and CD23 (25%). *BCL2* and *BCL6* rearrangements were present in 74%, and 20%, respectively. The estimated overall survival of patients was 13 years (mean). The presence of anemia, elevated lactose dehydrogenase, bone marrow involvement, high-risk follicular lymphoma international prognostic index, "starry sky" appearance, proliferative index $\geq 50\%$, absence of *BCL2* rearrangement and presence of *BCL6* rearrangement correlated with adverse overall outcome. Ann Arbor stage III/IV and MDM2 $\geq 20\%$ correlated with high trend toward worse overall survival. The combination *BCL2*+ and *BCL6*– was associated with better overall survival. No impact on overall survival was observed related to age, persistence of mantle zone, presence of diffuse areas, fibrosis, expression.

of CD10, BCL6 or CD23, follicular dendritic cells meshwork or clonality. These findings revealed that follicular lymphoma in young adults demonstrate similarities with that of older adults, including the frequency of presentation at various anatomic sites, grade, and adverse prognostic factors.

Descriptors: 1. Follicular lymphoma 2. Young adults 3. Survival

1 INTRODUÇÃO

1.1 Linfoma folicular: aspectos gerais

O linfoma folicular (LF) é neoplasia de células centrofoliculares B (células centrofoliculares clivadas/centrócitos e células centrofoliculares não clivadas/centroblastos) e apresenta, pelo menos em parte, padrão nodular de crescimento.

O LF compreende perto de 22% dos linfomas não Hodgkin (LNH) do mundo. A vasta maioria dos casos ocorre após a quinta década de vida, com mediana de idade de 59 anos, sendo raro antes dos 40 anos. É relatada incidência ligeiramente superior entre mulheres (1,7:1) (Harris, *et al.* 2008).

Em geral, o LF acomete linfonodos, mas pode se manifestar também no baço, medula óssea, sangue periférico e anel de Waldeyer. O envolvimento de sítios extranodais, tais como trato gastrintestinal, partes moles e pele pode ocorrer, mas geralmente o faz em contexto de doença disseminada. Quando o acometimento de sítios específicos (como pele e trato gastrintestinal) ocorre de forma isolada, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a classificação como entidades distintas. A medula óssea encontra-se infiltrada em cerca de 40% dos casos. Mesmo quando os pacientes apresentam envolvimento disseminado, a doença é geralmente assintomática, exceto pela presença de linfadenomegalias (Klapper 2011).

Os linfomas foliculares revelam padrão predominantemente nodular, podendo-se observar concomitância com áreas difusas. Os folículos neoplásicos são imprecisamente delimitados, demonstrando, frequentemente, ausência ou atenuação da zona do manto, perda da

polarização tipicamente encontrada nos centros germinativos (CG) e, na maioria dos casos, ausência de macrófagos de corpos tingíveis (Figura 1).

Figura 1 – Diferenças histológicas e imuno-histoquímicas entre hiperplasia linfoide e linfoma folicular. (A-C): folículo linfoide em linfonodo reativo. (D-F): linfoma folicular (Leich, *et al.* 2011)

Em geral, os linfomas foliculares são constituídos por duas populações celulares. A primeira, de tamanho pequeno a intermediário, núcleo angulado, alongado ou clivado, nucléolo inconspícuo, cromatina densa e citoplasma escasso. Essas células são denominadas centrócitos ou células centrofoliculares clivadas. O outro tipo celular é caracterizado por células grandes, com núcleo redondo ou oval e por vezes indentado, cromatina vesicular e nucléolos periféricos, sendo denominadas centroblastos ou células centrofoliculares não clivadas.

De acordo com a OMS, os linfomas foliculares são graduados de acordo com a quantidade de centroblastos em dez campos de 400x,

contados em diferentes folículos (Harris, *et al.* 2008) – grau 1: 0-5 centroblastos (Figura 2A); grau 2: de seis a 15 centroblastos (Figura 2B); grau 3A: > 15 centroblastos com centrócitos (Figura 2C); grau 3B: > 15 centroblastos sem centrócitos (Figura 2D).

Figura 2 – Exemplos de LF por grau. A) LF grau 1 (Hematoxilina e eosina, 400x). B) LF grau 2 (Hematoxilina e eosina, 400x). C) LF grau 3A (Hematoxilina e eosina, 400x). D) LF grau 3B (Hematoxilina e eosina, 400x)

Os linfomas foliculares de graus 1 e 2 demonstram curso clínico mais indolente e, em geral, são incuráveis; já os de grau 3B, apesar de apresentarem curso clínico mais agressivo, têm grande potencial de cura quando submetidos à terapia adequada (Wahlin, *et al.* 2012). Alguns estudos da literatura têm sugerido que o grau de nodularidade dos linfomas

foliculares tem impacto na sobrevida, principalmente em relação aos linfomas foliculares grau 3 – grau de nodularidade proporcional a curso clínico mais favorável (Ezdinli, *et al.* 1987); porém, outros estudos apresentam resultados discordantes (Warnke, *et al.* 1977). Em 25-35% dos pacientes com LF, observa-se “progressão” para linfoma de grandes células B, geralmente difuso. Este fato está associado a curso clínico rapidamente progressivo e morte devido à refratariedade ao tratamento (Conconi, *et al.* 2012).

Com relação ao imunofenótipo, os linfomas foliculares expressam antígenos de células B (CD20 e CD79, Figura 3A), BCL6 (Cattoretti, *et al.* 1995) (Figura 3B), CD10 (Dogan, *et al.* 2000) (Figura 3C) e HGAL (Younes, *et al.* 2010, Goteri, *et al.* 2011). A proteína BCL2 (Figura 3D) é expressa na maioria dos casos, aproximadamente 100% nos linfomas grau 1 e 75% nos linfomas grau 3 (Wood, *et al.* 1994).

A expressão de ciclina-D1 é sempre negativa nos linfomas foliculares, ao contrário do linfoma de células do manto, que é um dos principais diagnósticos diferenciais considerados, principalmente na sua forma nodular.

Figura 3 – Expressão imuno-histoquímica em LF: A) CD20 (em padrão membrana); B) BCL6 (padrão nuclear); C) CD10 (padrão membrana) e D) BCL2 (padrão citoplasmático)

Do ponto de vista molecular, a $t(14;18)$ é considerada como a alteração inicial do LF. É resultante da translocação do gene *BCL2* no cromossomo 18 que codifica a proteína BCL2, com o locus IGH@ do gene de cadeia pesada de imunoglobulina. Proteínas desta família têm atividade proapoptótica e atividade reguladora do ciclo celular que inibe a transição de G0 para G1 por meio de suprarregulação do p27. Isto explica o baixo índice de proliferação celular do LF comparado aos centros germinativos (CG) normais. Em condições fisiológicas, as células B dos CG de indivíduos saudáveis entram em apoptose, exceto quando são selecionadas por algum

antígeno específico para converterem-se em plasmócitos ou células B de memória (Figura 4A). Entretanto, as células do LF que expressam BCL2 não entram em apoptose durante o rearranjo gênico das imunoglobulinas e são mais propensas a acumular alterações cromossômicas secundárias (Figura 4B). A evidência atual indica que a t(14;18) é necessária, mas não suficiente, à transformação para o estado maligno (de Jong 2005, Klapper 2011, Leich, *et al.* 2011). Limpens *et al.* (1991) demonstraram a presença de células B esporádicas, portando a t(14;18) na ausência de LF clinicamente manifesto. Em estudos posteriores, células B com t(14;18) em frequências de 1 para 10^4 a 10^6 foram descritas em amostras de medula óssea, baço, amígdalas e sangue periférico (Stamatopoulos, *et al.* 2000, Godon, *et al.* 2003).

Em aproximadamente 10% dos casos de LF, a proteína BCL2 não pode ser demonstrada por imuno-histoquímica, levantando a possibilidade de mecanismos alternativos para proteção contra apoptose. O papel da ativação do *BCL6* como via alternativa de sobrevivência à célula tumoral é debatido. O rearranjo do gene *BCL6* pode ser encontrado em 5 a 15% dos casos de LF e alguns linfomas foliculares podem apresentar rearranjos dos dois genes (*BCL2* e *BCL6*) (Diaz-Alderete, *et al.* 2008).

Não há evidência clínica direta de que dano genético adicional específico em células B “normais” com t(14;18) resulte, necessariamente, em LF. Contudo, a observação de múltiplas alterações genéticas, afetando proto-oncogenes e genes supressores tumorais na progressão do LF, leva à especulação de que um mecanismo desse tipo pode preceder o estabelecimento da doença clínica.

Figura 4 – Painei **A**: esquema da ontogenia do linfócito B; os linfócitos B naíve encontram o antígeno, que leva a proliferação, expansão clonal e recombinação no microambiente do centro germinativo. Os clones resultantes com anticorpos de alta afinidade são selecionados para diferenciarem-se em plasmócitos e células B de memória. Os clones de células B remanescentes são eliminados por apoptose. Painei **B**: esquema da patogenia do LF; recombinações VDJ defeituosas induzem a t(14;18) e a expressão aberrante de BCL2, que leva a uma maior resistência a apoptose. Alterações genéticas adicionais são incorporadas a este linfócitos B e podem levar a transformação para LF (Natkunam 2007)

A maioria dos LF apresenta pelo menos uma alteração cromossômica secundária, com média de seis alterações. As mais comuns incluem ganhos no 1q, 2p, 7, 8, 12q, 18q e X, bem como deleções no 1p, 6q, 10q, 13q e 17p (Horsman, *et al.* 2001, Viardot, *et al.* 2003, Ross, *et al.* 2007). O número de alterações cariotípicas adicionais aumenta com o grau histológico ou transformação, bem como a complexidade cariotípica está relacionada com prognóstico adverso (Yunis, *et al.* 1987).

Estudos de expressão gênica apoiam o papel crucial do contexto imunológico no comportamento clínico do LF, com ênfase no papel das células T e células acessórias – foliculares dendríticas e macrófagos (Dave, *et al.* 2004, Glas, *et al.* 2005). Dave *et al.* (2004) investigaram, por expressão gênica, 191 amostras de pacientes com LF não tratados e identificaram dois perfis imunes relacionados à sobrevida: um com expressão de genes relacionados a macrófagos e células dendríticas, revelando pior prognóstico, e outro com genes relacionados a células T e macrófagos, associado a melhor prognóstico.

Estudos citogenéticos sugerem que o LF pode evoluir por duas vias diferentes, mutuamente excludentes, que induzem microambientes diferentes (Figura 5). A rede de interações entre fatores genômicos e imunológicos define o comportamento clínico do tumor. Uma via de pior prognóstico, possivelmente iniciada pela perda do 6q e posterior ganho do 1p, induz ao aumento de tramo de células foliculares dendríticas com consequente aumento de células tumorais interfoliculares. Transformação para linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) é evento precoce nessa

via. Outros eventos secundários formam a base da via de melhor prognóstico, que se inicia com +der18q e +7/+8. De maneira geral, os LF de bom prognóstico são mais próximos ao tecido linfoide inativo (Hoglund, *et al.* 2004, de Jong 2005).

Figura 5 – Modelo de duas vias para o LF com prognósticos diferentes. Na via de pior prognóstico, há ativação de CFD e linfócitos T do microambiente. A via de melhor prognóstico apresenta um microambiente mais estável (de Jong 2005)

Vários fatores têm sido propostos para o LF. O índice prognóstico internacional do linfoma folicular (FLIPI) combina idade, estadiamento de Ann Arbor, número de sítios nodais, nível de desidrogenase láctica (DHL) e nível de hemoglobina para identificar pacientes com risco baixo (0-1 fator de risco), intermediário (2 fatores de risco) e alto (3-5 fatores de risco), em termos de sobrevida geral. Mais recentemente, o FLIPI2 usa outras variáveis

como beta-2-microglobulina e volume da maior massa tumoral. O grau histológico da OMS também tem valor prognóstico, com os LF de grau 1 ou 2 exibindo comportamento indolente e o grau 3B, agressivo. Ainda está indefinido o comportamento do grau 3A, com estudos recentes mostrando resultados discordantes (Chang, *et al.* 2013). A idade tem sido amplamente relatada como fator prognóstico independente para sobrevida em LF. Isto pode ser interpretado, principalmente, como consequência da idade média elevada e a história natural prolongada da doença. A idade *per se*, entretanto, não torna o LF mais agressivo.

1.2 Linfoma folicular em pacientes jovens

Segundo dados da literatura, o LF acomete preferencialmente pacientes da quinta década de vida em diante, porém tem sido cada vez mais diagnosticado em pacientes mais jovens. Até bem pouco tempo atrás, raros estudos abordaram o LF diagnosticado em adultos jovens (menos que 40 anos de idade). O primeiro estudo voltado especificamente para esse tema é o de Summerfield e colaboradores (Summerfield, *et al.* 2004). Em estudo observacional e baseado na população escocesa, avaliaram-se 46 pacientes adultos jovens diagnosticados com LF ainda era pré-rituximabe, com sobrevida geral de 71% em dez anos. Jaglowski e colaboradores (2009) publicaram ampla revisão sobre linfomas em adolescentes e adultos jovens (15-39 anos), com base no registro populacional estadunidense “SEER9”. Eles relataram frequência de LF de 17% nessa faixa etária, com a maioria

dos casos com idades entre 35 e 39 anos. Mais recentemente, Louissaint e colaboradores (2012) ressaltaram a presença de um LF “tipo pediátrico”, com ausência de rearranjo do *BCL2* e alto índice de proliferação celular, dentro da população de adultos jovens. Por outro lado, o LF dito clássico, com presença da *t(14;18)*, é tido como virtualmente inexistente em pacientes abaixo dos 18 anos de idade (Liu, *et al.* 2012, Louissaint, *et al.* 2012). Em consonância com o crescente interesse em torno do LF em adultos jovens, várias lacunas precisam ser preenchidas, em especial no que se refere a comportamento biológico, resposta terapêutica e perfil molecular.

1.3 Linfoma folicular pediátrico

O LF é bastante raro abaixo de 18 anos de idade. Quando ocorre, ele apresenta aspectos clínicos, morfológicos, imuno-histoquímicos e genéticos distintos do LF que acomete a população adulta. O diagnóstico diferencial entre hiperplasia linfoide e LF pediátrico é desafiador; contudo, a análise criteriosa identifica aspectos histológicos e imunofenotípicos aberrantes que identificam as lesões como linfomas. O caso típico de LF pediátrico é doença localizada, afetando tonsilas e linfonodos cervicais, mas há relatos em outros sítios que incluem testículos (Frizzera, *et al.* 1979, Winberg, *et al.* 1981, Wright, *et al.* 1981, Lu, *et al.* 2001, Lersbach, *et al.* 2002, Pileri, *et al.* 2002, Oschlies, *et al.* 2010, Liu, *et al.* 2012, Louissaint, *et al.* 2012). Os folículos no LF pediátrico são geralmente grandes, expandidos e confluentes, às vezes em um padrão “floral”. Ao contrário do que ocorre nos folículos hiperplásicos,

a arquitetura do tecido está distorcida e a compartimentalização nos folículos malignos é perdida. A contagem de centroblastos é geralmente alta nesses casos e a maioria é graduada como LF 3A ou 3B. Em cerca de um terço dos casos de LF pediátrico, um componente simultâneo de LDGCB já pode ser encontrado ao diagnóstico. Contudo, mesmo na presença de componente de LDGCB, o LF pediátrico geralmente responde bem ao tratamento, com sobrevida de mais de 90%, o que difere do comportamento progressivo e, muitas vezes, agressivo, do LF que ocorre em adultos (Attarbaschi, *et al.* 2013). Soma-se aos achados morfológicos do LF pediátrico a expressão de BCL2 na maioria dos casos, embora descrita como de forma heterogênea. Esses linfomas apresentam maior frequência de rearranjo envolvendo o gene *BCL6* e quase nunca o gene *BCL2* antes dos 18 anos de idade. Tais achados indicam que o LF pediátrico é uma variante distinta – não somente do ponto de vista clinicopatológico, mas também do biológico, marcadamente pelo alto grau histológico, ausência de rearranjo envolvendo o gene *BCL2* e apresentação como doença localizada.

2 OBJETIVOS

- Geral: Avaliar as características anátomo-clínicas e moleculares em 208 casos de linfomas foliculares em pacientes adultos com idade inferior a 40 anos.
- Específicos:
 - Caracterização clínica: idade, sexo e apresentação clínica incluindo localização anatômica, estadiamento, tratamento e sobrevida.
 - Caracterização histológica: grau histológico e alterações concomitantes (presença ou não de zona do manto, fibrose, presença ou não de macrófagos de corpos tingíveis, proporção de áreas difusas)
 - Caracterização imunofenotípica: avaliação de vários marcadores linfoides incluindo antígenos B e T, cadeias leves de imunoglobulina, proliferação celular, marcadores centrofoliculares (CD10 e BCL6), BCL2, MUM1/IRF4, MDM2 e CD23.
 - Caracterização molecular: avaliação de rearranjos envolvendo os genes *BCL2* e *BCL6*, pelo método de FISH.

3 MÉTODOS

3.1 Seleção de casos e delineamento do estudo

Este estudo está baseado numa revisão de 2617 casos consecutivos de LF diagnosticados entre junho de 1997 e dezembro de 2011 no Laboratório Bacchi/Consultoria em Patologia, laboratório de referência em anatomia patológica com sede em Botucatu-SP. A amostragem dos casos de linfomas foliculares é de ampla abrangência nacional, pois são oriundos de todas as regiões geográficas do Brasil (Figura 6). Desses 2617 casos de LF, 208 eram de pacientes entre 19 e 40 anos de idade no momento do diagnóstico.

Figura 6 – Mapas demonstrando a distribuição de casos de linfoma no Laboratório Bacchi por Estado. No painel A, todos os casos de linfoma não Hodgkin entre 2004 e 2011 (16.594 casos). No painel B, os 208 casos de LF em pacientes ≤ 40 anos de idade entre 1997 e 2011

O presente estudo teve seu Protocolo de Pesquisa (110/10) aprovado pela Comissão de Ética para análise de Projetos de Pesquisa (CEP-FMUSP) em 19 de maio de 2010 (vide Apêndice).

3.2 Levantamento de informações clínicas

Informações como sexo, idade dos pacientes no momento do diagnóstico, localização anatômica da neoplasia e cidade/Estado/região geográfica de procedência foram obtidas por meio dos formulários de requisição de exame anatomopatológico e imuno-histoquímico. Outras informações relevantes para o estudo, como estadiamento clínico, dados de imagem, exames laboratoriais, como níveis de desidrogenase láctica (DHL) e hemoglobina (com valores de referência), acometimento ou não de medula óssea, status de infecção pelo HIV, além de dados de tratamento e evolução dos pacientes, foram obtidas por meio de formulário específico (vide Apêndice) enviado aos médicos assistentes e serviços que referenciaram os pacientes. Posteriormente, foi realizado contato telefônico e/ou correspondência eletrônica com os médicos assistentes para esclarecer eventuais dúvidas. Para a determinação da região geográfica, consideramos a residência do paciente à época do diagnóstico ou, na impossibilidade de obter essa informação, consideramos a localização do serviço responsável pelo envio do caso. Todas as informações coletadas alimentaram um banco de dados criado pelo programa FileMaker Pro 12 (Apple, Inc; Santa Clara, CA, EUA; Figura 7).

**CONSULTORIA EM PATOLOGIA
PROJETO: LINFOMA FOLICULAR EM <40 ANOS**

CB 5702/04 41

Nome: [redacted] 38 anos DN: [redacted] BLOCO OK CAIXA 3.7 TMA 2

Guaratinguetá SP Data do diagnóstico 11/05/2004

Dr. João Orlando Bouzan Guimarães

LOCAL: Linfadenopatia inguinal SINTOMAS B: ESTADIAMENTO: [redacted]

HLV: [redacted] GT: [redacted] Ritux: [redacted] RT: [redacted]

LDH: [redacted] Hb: 12 FLPI: [redacted] SOBREVIVIA (anos): 30.2 RESPOSTA TERAP.: [redacted]

MO POSITIVA TMO: [redacted] RECIDIVA: [redacted] APÓS TEMPO: [redacted] ÓBITO: [redacted]

15/07/2007

LINFOMA: Linfoma folicular

ZONA DO MANTO: [redacted] ÁREAS DIFUSAS: [redacted] FDC Meshwork: [redacted] CÉU ESTRELADO: [redacted] FIBROSE: [redacted]

CD19: POSITIVO BCL2: POSITIVO BCL6: POSITIVO FRACO MDX2: [redacted] CD20: NEGATIVO

CD47-SP1: [redacted] MUM 1: [redacted] HIAL: [redacted] BCL2 FISH: POSITIVO BCL6 FISH: POSITIVO

kappa: NEGATIVO lambda: POSITIVO

Último contato: 15/07/2007

OBSERVAÇÕES: Paciente em 01/2007 Derame pleural com linfoma em 05/2007

OBSERVAÇÕES: Aguardando e-mail do Dr. Ozorio (12) 31283800 zeniro.gaviao@terra.com.br

PATOLOGISTA: DUDKEB

Sítios

Idade média: 32,25

Número de casos com sobrevivência: 4

Sobrevivência média: 5,81

Figura 7 – Imagem da tela do programa Filemaker Pro 12, utilizado para arquivamento dos dados coletados

3.3 Avaliação morfológica

As lâminas histológicas de 3 µm de espessura, disponíveis nos arquivos do Laboratório Bacchi, obtidas com micrótomo histológico e coradas em hematoxilina-eosina foram reavaliadas para confirmação do diagnóstico de LF. Novas lâminas de H&E foram confeccionadas de acordo com a necessidade. A subclassificação foi realizada segundo os critérios da OMS (Harris, *et al.* 2008), caso a caso. Algumas variáveis morfológicas foram sistematicamente coletadas: a) presença ou ausência de zonas do manto; b) semiquantificação do número de macrófagos associados ao tumor, com aparência de “céu estrelado” (0, sem macrófagos; 1+, 1-5 macrófagos por campo de grande aumento (CGA); 2+, 6-15 macrófagos/CGA; 3+, >15 /CGA); c) estimativa da fibrose (0, 1+, 2+ e 3+ em 3+); e d) presença ou ausência de áreas difusas.

3.4 Construção da micromatriz tecidual (TMA)

Os blocos de parafina de 164 dos 208 casos estavam disponíveis e foram usados para a construção dos blocos de parafina de micromatriz tecidual (*tissue microarray* – TMA). No total, construíram-se 6 TMAs utilizando um *arrayer* de tecido biológico produzido pela Beecher Instruments (Sun Prairie, EUA; Figura 8A). Essa técnica permite a inclusão de grande número de casos em um mesmo bloco de parafina, representados por cilindros de tecidos (Figura 8B). De cada caso foi representado um cilindro a partir dos blocos de parafina “doadores” (área dos blocos originais representativa da neoplasia), com diâmetro de 2 mm. A retirada dos cilindros do bloco de parafina “doador” e sua inclusão no bloco de parafina “receptor” (bloco de TMA) são realizadas com a ajuda de agulhas especiais. Os cilindros ou amostras de todos os casos incluídos no estudo foram distribuídos num total de seis blocos receptores, com 28 a 29 casos cada, numerados de 1 a 6, obedecendo-se a um mapa de TMA (Figura 9). Esse mapa registra a disposição dos casos nos blocos, permitindo a identificação deles para a interpretação dos resultados.

Figura 8 – A) Fotografia do *array* de tecido utilizado na construção dos blocos de TMA. B) Exemplo de bloco de parafina “receptor” (bloco de TMA)

Linha (x) ▶ ▼ Coluna (y)	A (1,00)	B (2,00)	C (3,00)	D (4,00)	E (5,00)	F (6,00)
01 (1,00)	Figado	4352/04	5702/04	15566/04	16660/04	1229/05
02 (2,00)	1929/05	2252/05	2632/05	3571/05	3590/05	4074/05
03 (3,00)	4823/05	5120/05	7594/05	7790/05	9504/05	14847/05
04 (4,00)	15677/05	16073/05	16306/05	16984/05	18926/05	19578/05
05 (5,00)	19618/05	170/06	688/06	1824/06	2397/06	2766/06

Figura 9 – Mapa de TMA, utilizado para a orientação da inclusão dos casos nos blocos de TMA e, posteriormente, a identificação dos casos para a interpretação dos resultados obtidos

3.5 Imuno-histoquímica

Para a realização do estudo imuno-histoquímico foram obtidos, de cada um dos blocos de TMA, cortes histológicos seriados com espessura de 3 μ m, utilizando-se micrótomo histológico. Foi avaliada a expressão imuno-histoquímica de CD20, CD3, CD10, CD23, BCL6, BCL2, do antígeno de proliferação celular Ki-67, MUM1/IRF4, MDM2 e de cadeias leves de imunoglobulina kappa e lambda.

Os cortes histológicos foram dispostos em lâminas de vidro previamente tratadas com o adesivo poli-D-lisina (Sigma, St. Louis, EUA, Cód. P7886) e mantidos a 60 °C em estufa por 4 horas. A seguir, foi realizada a desparafinação com banhos sucessivos de xilol, passagem em álcool etílico absoluto e lavagem com solução salina tamponada (PBS), com bloqueio da atividade endógena com solução de H₂O₂ a 3%. Os métodos de recuperação de epítomos utilizados variaram de acordo com o antígeno em investigação: pelo calor em panela de pressão (antígeno de proliferação celular Ki-67), forno de micro-ondas caseiro (CD20, CD23 e BCL2), vaporizador (CD3, CD10 e MUM1/IRF4) ou por método enzimático (tripsina 0,1% para proteína BCL6). Para os marcadores CD20, CD3, CD10, CD23, antígeno Ki-67, BCL2 e MUM1/IRF4, as lâminas foram incubadas em solução de citrato 0,01 M (pH 6,0). Após a recuperação dos epítomos, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários em período noturno de aproximadamente 12-18 horas a 4 °C na diluição apropriada. Após nova lavagem em PBS, foram incubadas por 60 minutos com os respectivos anticorpos secundários. Seguiu-se a utilização dos sistemas de detecção conforme instruções do fabricante (Novolink Polímero, Novocastra, Newcastle upon Tyne, Reino Unido, Cód. 7161, para CD10, antígeno de proliferação celular Ki-67, MUM1/IRF4 e BCL6; ABC Elite, Vector, Burlingame, EUA, Cód. PK-6100, para CD20, CD3, CD23 e BCL2). A finalização foi feita com tratamento por solução de 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, EUA, Cód. D5637 1 mg/mL + Tris-HCl 1 M pH 7,4) acrescida de H₂O₂ (concentração final 0,2%),

contracoloração com hematoxilina de Mayer e montagem com resina histológica Permount® (Fischer Scientific, Pittsburgh, EUA, Cód. SP15-500). Os detalhes sobre estes antígenos/anticorpos secundários, diluição e fabricantes estão especificados na Tabela 1.

Tabela 1 – Especificações dos antígenos primários, fonte e recuperação antigênica

Antígeno	Clone	Diluição	Fabricante	Recuperação antigênica
CD23	SP23	1:200	Neomarkers	M.POL
CD20	L26	1:1200	DAKO	MM.ABC
CD10	56C6	1:200	Novocastra	S.POL
CD3	565	1:800	Novocastra	MM.ABC
BCL2	124	1:2000	DAKO	MM.ABC
BCL6	564	1:2400	Novocastra	S.POL
Ki-67	MIB-1	1:4800	DAKO	S.POL
Kappa	A8B5	1:200	DAKO	MM.ABC
Lambda	N10/2	1:400	Neomarkers	S.POL
MDM2	IF2	1:2400	Zymed	S.POL
MUM1/IRF4	MUM1P	1:1200	DAKO	S.POL

DAKO (Carpinteria, CA, EUA); Neomarkers/Lab Vision (Fremont, CA, EUA); Novocastra (Newcastle, Reino Unido); Zymed (San Francisco, CA, EUA). MM.ABC: micro-ondas, rato, complexo avidina-biotina; S.POL: vapor, polímero; M.POL: micro-ondas, polímero

Os resultados foram avaliados em microscópio óptico comum. Para os seguintes marcadores foi considerada qualquer positividade (células neoplásicas com imunocoloração acastanhada na localização antigênica esperada para o anticorpo utilizado): CD3, CD10, CD20, CD23, BCL2, BCL6, cadeias leves de imunoglobulina kappa e lambda e MUM1/IRF4. A avaliação do índice de proliferação celular pelo antígeno

Ki-67 foi determinada pela semiquantificação em porcentagem (%) de núcleos imunocorados de células neoplásicas, variando de 0 a 100%, e definindo como ponto de corte 50%. Para a expressão de MDM2, o ponto de corte adotado foi 20% de positividade nas células neoplásicas. O CD23 foi usado ainda para avaliar a trama de células foliculares dendríticas e seu padrão imuno-histoquímico foi classificado como preservado, roto ou ausente.

3.6 FISH (hibridização in situ por fluorescência)

A técnica de FISH foi empregada para a detecção de rearranjos envolvendo o gene *BCL2* no cromossomo 18 e rearranjos envolvendo o gene *BCL6* no cromossomo 3. Para esse fim, cortes de 3 µm de espessura, obtidos por micrótomo histológico, a partir de blocos de TMA, foram dispostos em lâminas de vidro e submetidos, nessa ordem, a desparafinação em xilol, hidratação em álcool etílico absoluto, tratamento ácido em 0,2 N HCl, lavagem em água, pré-tratamento com tiocionato de sódio 8,1%, lavagem em água e solução de cloreto de sódio 3 M + citrato de sódio 0,3 M (pH 5,3), digestão enzimática em pepsina 0,8% e lavagem em água e solução de cloreto de sódio 3 M + citrato de sódio 0,3 M (pH 5,3). A seguir, adicionou-se o sistema de detecção para a pesquisa do rearranjo de interesse (*BCL2* ou *BCL6*) de forma a cobrir toda a superfície do corte histológico de TMA representado na lâmina, com colocação posterior da lamínula.

As lâminas foram, então, submetidas ao processo de desnaturação e hibridização pelo calor por período noturno de aproximadamente 12-18 horas após a incubação com a sonda. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em solução de cloreto de sódio 3 M + citrato de sódio 0,3 M (pH 5,3) e as lamínulas retiradas. A seguir, as lâminas foram lavadas em solução pós-hibridização pré-aquecida, constituída por cloreto de sódio 3 M + citrato de sódio 0,3 M (pH 5,3) e NP-40 0,3% (Cód. 30-804820, Vysis, Abbott Molecular, Des Plaines, EUA), contracoradas com DAPI em “Fluorguard Anfitade” (Cód. F201/F202 e Cód. F001, Insitus, Albuquerque, EUA) e montadas com lamínula.

Para a pesquisa do rearranjo do gene *BCL2*, foi empregado o sistema de detecção LSI[®] BCL2 Dual Colour Break Apart Rearrangement Probe, Cód. 30-231029 (Vysis, Downers Grove, IL; Figura 10A). Para a pesquisa do rearranjo do gene *BCL6*, foi empregado o sistema de detecção LSI[®] BCL6 Dual Colour, Break Apart Rearrangement Probe, Cód. 32-191016 (Vysis, Downers Grove, IL; Figura 10B). Esses sistemas avaliam quebras envolvendo a região de interesse por meio de duas sondas separadas (5' SpectrumOrange[™] e 3' SpectrumGreen[™]).

A**Região 3q27** **B**

Figura 10 – A) Esquema da LSI[®] BCL2 Dual Colour Break Apart Rearrangement Probe, Cód. 30-231029 (Vysis, Downers Grove, IL), com o ponto de quebra na região 18q21. B) Esquema da LSI[®] BCL6 Dual Colour, Break Apart Rearrangement Probe, Cód. 32-191016 (Vysis, Downers Grove, IL), com ponto de quebra na região 3q27 (adaptado de <http://www.abbottmolecular.com>)

A análise morfométrica quantitativa foi realizada em microscópio de fluorescência Zeiss Axio Imager M1 (Carl Zeiss AG, Alemanha) com filtros apropriados para o espectro dos sinais observados (Chroma Technology GmbH, Alemanha), acoplado a computador PC (Dell Optiplex, EUA) com

os programas Isis e Metafer 4 (Metasystems, Altussheim, Alemanha) (Figura 11).

Figura 11 – Fotografia da tela do programa Metafer 4, utilizado para quantificação dos sinais fluorescentes na técnica de FISH

Uma célula normal, sem quaisquer dos rearranjos pesquisados, revela dois sinais verdes e dois sinais laranja fusionados (Figura 12A). Por sua vez, uma célula com ponto de quebra no gene *BCL2* ou no gene *BCL6* caracteriza-se por apresentar um sinal verde separado de um sinal laranja e um sinal verde e um laranja unidos (Figura 12B).

O sistema Metasystems tem a habilidade de analisar a distância entre esses sinais. Uma célula que apresenta separação entre o sinal verde e o laranja com distância maior do que 10 pixels é considerada positiva. A porcentagem de células positivas foi calculada e comparada com o grupo controle. Como controles negativos para os rearranjos em questão foram utilizadas tonsilas palatinas. Assim, um caso foi considerado

positivo quando a percentagem de células positivas calculada foi superior ao ponto de corte, estabelecido em três desvios-padrões acima da média do grupo controle negativo. A média do grupo controle negativo para o *BCL2* foi de $0,65 \pm 0,38\%$ e para o *BCL6* foi de $0,75 \pm 0,48\%$. Portanto, o ponto de corte estabelecido para o *BCL2* foi 1,8% e para o *BCL6*, 2,2%.

Figura 12 – Fotomicrografias de casos avaliados com a sonda LSI[®] BCL2 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe. A: célula negativa apresentando sinais verdes e laranja unidos. B: células positivas apresentando um sinal verde e um sinal laranja separados e fusão de sinal verde com sinal laranja, indicando a presença de rearranjo do gene *BCL2*

3.7 Análise estatística

Para todas as variáveis pesquisadas foram levantadas as distribuições de frequência. A sobrevida geral foi calculada a partir da data do diagnóstico até a data do óbito ou do último contato. Foram elaboradas tábuas de vida para todas as variáveis pesquisadas e com base nelas foi aplicada a técnica de Kaplan & Meier para avaliação da influência das variáveis pesquisadas na sobrevida geral dos pacientes. A estatística de Breslow foi empregada para os testes comparativos das curvas de sobrevida obtidas para os níveis das variáveis. Tempos médios de

sobrevida foram estimados, sempre que possível, com base nessa técnica. Intervalos de confiança para os tempos médios de sobrevida foram obtidos com coeficiente de confiança de 95%. Para estimar a razão de probabilidades (*odds ratio*), empregamos a técnica de regressão logística. O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5%, sendo que, para todos os testes, o nível descritivo da estatística observada foi calculado (p) (Kaplan, *et al.* 1958, Cox 1972).

3.8 Agrupamento hierárquico

Foi feita a análise classificatória hierarquizada de forma a agrupar os casos a partir de sucessivas fusões de subgrupos, criados com base nas semelhanças de variáveis clínicas e patológicas. Para isso foi usado o programa Cluster 3.0 (de Hoon, *et al.* 2004). Os resultados foram representados graficamente por meio da construção de um dendrograma, utilizando-se o programa Java TreeView (Saldanha 2004).

4 RESULTADOS

4.1 Epidemiologia

A população amostral do presente estudo foi de 208 pacientes diagnosticados como LF entre 1997 e 2011, com idades entre 19 e 40 anos. A mediana de idade foi de 35 anos. Cinquenta por cento dos casos encontravam-se na faixa etária entre 36 e 40 anos. Cento e dezesseis pacientes eram do sexo feminino (56%) e 92 do sexo masculino. A Figura 13 ilustra a distribuição dos casos por idade e sexo.

Figura 13 – Distribuição dos 208 casos de LF por idade e sexo

Não foi evidenciada diferença significativa para as curvas de sobrevida em função da faixa etária dos pacientes (Figura 14). A maioria dos pacientes com menos de 30 anos ficou censurada (perda de seguimento

clínico) após a sobrevida de 10 anos. Na Tabela 2 estão apresentadas as médias de sobrevida observadas por faixa etária. Foram excluídos deste cálculo de sobrevida, e no de todas as categorias seguintes, os casos de LF cutâneos.

Figura 14 –Sobrevida geral nos casos de LF por faixa etária (n=126)

Tabela 2 – Médias de sobrevida para faixa etária

Faixa etária	Estimativa (anos)	Desvio	Intervalo de Confiança 95%	
			Limite Inferior	Limite Superior
Até 30 anos	10,3	0,6	9,1	11,4
31 a 40 anos	12,9	0,9	11,1	14,8
Geral	13,4	0,8	11,8	14,9

Todas as regiões geográficas estão representadas nesta série de

casos (Figura 15). A maioria dos pacientes objeto deste estudo foi proveniente das regiões Sudeste (93 casos) e Sul (61 casos). A região Nordeste contribuiu com 38 casos, a Centro-Oeste com 9 casos e a Norte com 7 casos (Tabela 3).

Figura 15 – Distribuição no Brasil dos 208 casos de LF em pacientes jovens, por cidade

Tabela 3 – Distribuição dos 208 casos de LF <40 anos de acordo com as regiões geográficas do Brasil

<i>Região geográfica</i>	<i>Casos de LF ≤40 anos</i>	<i>Casos de linfomas não-Hodgkin*</i>	<i>População geral por região**</i>
SUDESTE	44,7%	44%	42,1%
SUL	29,3%	23%	14,4%
NORDESTE	18,3%	20%	27,8%
CENTRO-OESTE	4,3%	5%	7,4%
NORTE	3,4%	8%	8,3%

* Dados do Laboratório Bacchi, a partir de 16274 casos de linfomas não-Hodgkin diagnosticados entre 2004 e 2011, não revisados. **Dados do Censo (IBGE 2010)

Não foi possível apontar diferenças na estimativa de sobrevida dos pacientes das regiões Norte e Nordeste, pois a maioria deixou de ser acompanhada (dado censurado) após a sobrevida de 5 anos (Figura 16). As médias de sobrevida para as diferentes regiões geográficas estão apresentadas na Tabela 4.

Figura 16 – Sobrevida geral nos casos de LF por região geográfica (n=126)

Tabela 4 – Médias de sobrevida para diferentes Regiões do Brasil

Região geográfica	Estimativa (anos)	Desvio	Intervalo de Confiança 95%	
			Limite Inferior	Limite Superior
Norte-Nordeste	9,6	0,7	8,3	10,8
Centro-Oeste	5,7	0,9	3,9	7,4
Sul-Sudeste	13,1	0,9	11,3	14,8
Geral	13,4	0,8	11,8	14,9

4.2 Sítios de acometimento

Dos 208 casos desta série, 20 casos foram de apresentação extranodal (9,6%) e 180 casos foram de apresentação nodal (87%). O sítio anatômico nodal mais comum foi linfonodo cervical (30%) seguido de linfonodo inguinal (19%). A tonsila foi a localização extranodal mais frequente. Oito casos (3,8%) apresentaram acometimento cutâneo exclusivo. Não foi identificada influência significativa do sítio anatômico nas curvas de sobrevida; entretanto, deve-se notar que o número de observações para alguns sítios foi pequeno e os dados foram censurados (Figura 17).

Figura 17 – Sobrevida geral nos casos de LF por sítio de acometimento (n=126)

4.3 Aspectos clínicos

4.3.1 Anemia

A Tabela 5 apresenta a distribuição segundo a condição de anemia (Hemoglobina ≤ 12 g/dL). Houve forte impacto do nível de hemoglobina sobre a sobrevida geral (Figura 18): os casos com anemia apresentaram redução da expectativa de sobrevida de 13,4 para 5,8 anos ($p < 0,05$). As médias de sobrevida calculadas para esta variável estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 5 – Distribuição dos casos segundo anemia

<i>Hb</i> ≤ 12 g/dL	<i>Frequência</i>	<i>%</i>
Total com informação	75	
NÃO	64	85
SIM	11	15
Não disponíveis	133

Figura 18 – Sobrevida geral nos casos de LF por anemia (n=75)

Tabela 6 – Médias de sobrevida para anemia

<i>Hb</i> ≤ 12 g/dL	<i>Estimativa</i> (anos)	<i>Desvio</i>	<i>Intervalo de Confiança 95%</i>	
			Limite Inferior	Limite Superior
NÃO	13,4	0,3	12,8	14,1
SIM	5,8	1,4	3,1	8,6
Geral	12,6	0,5	11,6	13,6

4.3.2 Nível de DHL

Na Tabela 7 é apresentada a distribuição dos casos segundo o nível do DHL. Houve forte impacto do nível de DHL sobre a sobrevida geral (Figura 19). O DHL elevado correlacionou-se com redução na expectativa de

sobrevida de 13,1 para 7,4 anos ($p < 0,05$; Tabela 8).

Tabela 7 – Distribuição dos casos segundo o nível do DHL

<i>Nível de DHL</i>	<i>Frequência</i>	<i>%</i>
Total com informação	73	
Normal	65	89
Elevado	8	11
Não disponíveis	135	

Sobrevida por nível de DHL

Figura 19 –Sobrevida geral nos casos de LF por DHL (n=73)

Tabela 8 – Médias de sobrevida em função do DHL

<i>DHL</i>	<i>Estimativa (anos)</i>	<i>Desvio</i>	<i>Intervalo de Confiança 95%</i>	
			Limite Inferior	Limite Superior
Normal	13,1	0,5	12,1	14,1
Elevado	7,4	1,6	4,2	10,1
Geral	12,6	0,5	11,6	13,6

4.3.3 Infiltração de medula óssea

Na Tabela 9 é apresentada a distribuição dos casos segundo a infiltração de medula óssea. A exemplo das duas variáveis anteriores, também houve forte impacto da presença de infiltração de medula óssea sobre a sobrevida geral (Figura 20). O grupo que apresentou acometimento de medula óssea correlacionou-se com expectativa de sobrevida de 8,3 anos ante 13,6 anos para o grupo sem evidência de infiltração ($p < 0,05$; Tabela 10).

Tabela 9 – Distribuição dos casos segundo infiltração de medula óssea

<i>Medula Óssea</i>	<i>Frequência</i>	<i>%</i>
Total com informação	78	
Não infiltrada	53	68
Infiltrada	25	32
Não disponíveis	130

Figura 20 – Sobrevida geral nos casos de LF por infiltração de medula óssea (n=78)

Tabela 10 – Médias de sobrevida para infiltração de medula óssea

Infiltração de MO	Estimativa (anos)	Desvio	Intervalo de Confiança 95%	
			Limite Inferior	Limite Superior
NÃO	13,6	0,3	13,1	14,2
SIM	8,3	1,1	6,2	10,4
Geral	12,1	0,7	10,7	13,4

4.3.4 Estadiamento de Ann Arbor

A maioria dos casos apresentou estágio avançado Ann Arbor, III ou IV (64%; Tabela 11).

Tabela 11 – Distribuição dos casos segundo estadiamento de Ann Arbor

<i>Estadiamento de Ann Arbor</i>	<i>Frequência</i>	<i>%</i>
Total com informação	88	
I	19	21
II	13	15
III	21	24
IV	35	40
Não disponíveis	120

Figura 21 – Sobrevida geral nos casos de LF por estadiamento (n=88)

Não foi possível evidenciar a diferença nas curvas de sobrevida, por estágio, em face da pequena quantidade de pacientes com acompanhamento (Figura 21), mas há indícios de redução da sobrevida para o estágio IV. Na Tabela 12 apresentamos as médias de sobrevida observadas. Para efeito de comparação dos grupos, os estádios I e II foram

agrupados.

Tabela 12 – Médias de sobrevida para os diferentes estádios

<i>Estadiamento</i>	<i>Estimativa (anos)</i>	<i>Desvio</i>	<i>Intervalo de Confiança 95%</i>	
			<i>Limite Inferior</i>	<i>Limite Superior</i>
I+II	11,2	0,4	10,4	11,9
III	12,0	1,3	9,6	14,5
IV	8,8	1,0	6,9	10,8
Geral	11,7	0,7	10,2	12,9

4.3.5 FLIPI

Na Tabela 13 é apresentada a distribuição dos casos segundo os grupos de risco baixo (0-1), intermediário (2) e alto (3-5), calculados a partir do FLIPI. A maioria dos casos se enquadrou na categoria de baixo risco do FLIPI (44%). Os casos com FLIPI de alto risco apresentaram curva de sobrevida diferenciada em relação aos riscos baixo e intermediário agrupados (Figura 22). A sobrevida média foi de 12,2 anos para o grupo com FLIPI<3 contra 6,3 anos para o grupo com FLIPI≥3 (Tabela 14).

Tabela 13 – Distribuição dos casos segundo FLIPI

<i>FLIPI</i>	<i>Frequência</i>	<i>%</i>
Total com informação	73	
Baixo	44	60
Intermediário	21	29
Alto	8	11
Não disponíveis	135

Figura 22 – Sobrevida geral nos casos de LF por grau de risco do FLIPI (n=73)

Tabela 14 – Médias de sobrevida para categorias de risco do FLIPI

FLIPI	Estimativa (anos)	Desvio	Intervalo de Confiança 95%	
			Limite Inferior	Limite Superior
Baixo/Intermediário	12,2	0,7	10,8	13,6
Alto	6,3	1,9	2,7	10,1
Geral	11,8	0,7	10,5	13,1

Na Tabela 15 é apresentado um consolidado das informações clínicas previamente expostas, além de dados quanto os tratamento adotado, dos casos em que foi possível obtê-los.

Tabela 15 – Consolidado das informações clínicas de 208 casos de LF em pacientes adultos jovens (<40 anos)

	LF cutâneo	LF extranodal	LF nodal	LF nodal + LDGCB	Total
TOTAL [% (casos)]	4(8)	10(20)	83(173)	3(7)	208
IDADE [anos]					
Mediana	37	35	35	36	35
Faixa	28-40	23-40	19-40	22-39	19-40
M:F	5:3	9:11	75:98	3:4	92:116
SÍTIOS ANATÔMICOS					
		Tonsila (5)	Abdominal (9)	Cervical (3)	-
		Duodeno (2)	Axilar (18)	Axilar (1)	-
		Estômago (1)	Cervical (63)	Retroperitoneal (1)	-
		Gl. salivar (3)	Supraclavicular (7)	Mesentérico (1)	-
		Justa-ureteral (1)	Inguinal (40)	Não especificado (1)	-
		Mama (1)	Mediastinal (1)		-
		Osso (2)	Mesentérico (6)		-
		Peritônio (1)	Retroperitoneal (7)		-
		Pulmão (2)	Não especif. (22)		-
		Tireoide (2)			-
DADOS CLÍNICOS [% (+)]					
Não disponíveis	37(3)	40(8)	40(70)	14(1)	39(82)
Completos	37(3)	45(9)	38(66)	62(5)	40(83)
Somente sobrevida	26(2)	15(3)	22(37)	14(1)	21(43)
ESTÁDIO [% (+/testados)]					
I	100(3/3)	55(5/9)	14(10/71)	20(1/5)	21(19/88)
II	0	0	17(12/71)	20(1/5)	15(13/88)
III	0	0	28(20/71)	20(1/5)	24(21/88)
IV	0	45(4/9)	41(29/71)	40(2/5)	40(35/88)

	LF cutâneo	LF extranodal	LF nodal	LF nodal + LDGCB	Total
SINTOMAS B	33(1/3)	22(2/9)	39(27/70)	60(3/5)	38(33/87)
DHL ELEVADO	0(0/3)	12(1/8)	12(7/58)	0/4	11(8/73)
ANEMIA (Hb <12g/dL)	33(1/3)	0(0/8)	17(10/60)	0/4	15(11/75)
ACOMETIMENTO DE MO	0(0/3)	11(1/9)	39(24/62)	0/4	32(25/78)
FLIPI					
Baixo risco (0-1)	100(3/3)	100(8/8)	53(31/58)	50(2/4)	60(44/73)
Intermediário (2)	0	0	33(19/58)	50(2/4)	29(21/73)
Alto risco (3-4)	0	0	14(8/58)	0	11(8/73)
PROTOCOLOS DE TRATAMENTO					
Quimioterapia	2	7	63	5	77
CHOP+rituximabe	1	5	36	3	45
CVP+rituximabe	-	-	2	-	2
CHOP	-	2	18	2	22
CVP	1	-	1	-	2
Fludarabina	-	-	3	-	3
MINE	-	-	1	-	1
ProMACE-CytaBOM	-	-	2	-	2
Expectante	-	-	2	-	2
Radioterapia	3	4	18	1	26
Associada à quimioterapia	2	3	17	1	23
Isolada	1	1	1	-	3

CHOP (Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina e Prednisolona); CVP (Ciclofosfamida, Vincristina e Prednisolona); MINE (mesna, ifosfamida, mitoxantrone e etoposide); ProMACE (prednisona/metotrexate/doxorubicina/ciclofosfamida/etoposide); CytaBOM (citarabina/bleomicina/vincristina/metotrexate)

4.4 Aspectos morfológicos

4.4.1 Gerais

Histologicamente, todos os 208 casos apresentaram, ao menos focalmente, padrão nodular de crescimento. De acordo com o grau histológico adotado pela OMS, 43% dos casos foram grau 1, 32% foram grau 2, 18% foram grau 3A e 7% foram grau 3B (Figura 23). Apesar de todos os espécimes terem sido obtidos no diagnóstico inicial, antes da instituição de qualquer tratamento, o achado simultâneo de linfoma difuso de grandes células B ocorreu em 7 casos.

Figura 23 – Distribuição dos 208 casos de LF de acordo com o grau histológico (OMS)

Na Figura 24 são apresentadas as curvas de sobrevida de acordo com o grau histológico da OMS. As curvas para os graus 1 e 2 se mostraram superponíveis e foram, então, agrupadas (1/2). Não houve diferença estatística entre os graus 1, 2 e 3A quanto à sobrevida. Contudo, houve uma

redução gradual da expectativa média de sobrevida de 13,7 anos para os graus 1/2, para 7,8 anos para o grau 3A e 2,6 anos para o grau 3B (Tabela 16).

Figura 24 – Sobrevida geral nos casos de LF por grau histológico (OMS) (n=126)

Tabela 16 – Médias de sobrevida para o grau histológico (OMS)

Grau histológico	Estimativa (anos)	Desvio	Intervalo de Confiança 95%	
			Limite Inferior	Limite Superior
1/2	13,7	0,8	12,1	15,4
3A	7,8	0,8	6,2	9,4
3B	2,6	0,4	1,7	3,5
Geral	13,4	0,8	11,8	14,9

4.4.2 Persistência da zona do manto

A maioria dos casos de LF não cutâneos apresentou o padrão típico de ausência ou atenuação da zona do manto. Contudo, 32 casos (16%; Tabela 17) apresentaram um padrão peculiar de persistência da zona do manto (Figura 25).

Tabela 17 – Distribuição dos casos segundo a persistência da zona do manto

<i>Persistência da zona do manto</i>	<i>Frequência</i>	<i>%</i>
Total com informação	200	
NÃO	168	84
SIM	32	16
Não aplicável	8

Figura 25 – Exemplos de casos de LF com persistência da zona do manto. Casos 86 (esquerda) e 164

A curva de sobrevida não foi influenciada pela persistência ou não da zona do manto (Figura 26). Na Tabela 18 estão apresentadas as médias de sobrevida calculadas para esta variável.

Figura 26 –Sobrevida geral nos casos de LF por zona do manto (n=121)

Tabela 18 – Médias de sobrevida para zona do manto

<i>Persistência da Zona do Manto</i>	<i>Estimativa (anos)</i>	<i>Desvio</i>	<i>Intervalo de Confiança 95%</i>	
			Limite Inferior	Limite Superior
NÃO	11,4	0,7	10,1	12,9
SIM	13,8	1,4	11,0	16,6
Geral	13,4	0,8	11,8	14,9

4.4.3 Presença de áreas difusas

A presença de áreas com padrão difuso, sem critérios para o diagnóstico de LDGCB, foi encontrada em 25 casos (12,5%; Tabela 19). A presença ou ausência de áreas difusas não resultou em curvas de sobrevida

diversas (Figura 27). A partir da sobrevida 5,0 anos, não mais tivemos pacientes do grupo com presença de áreas difusas (dado censurado). Na Tabela 20 estão apresentadas as médias de sobrevida calculadas para esta variável.

Tabela 19 – Distribuição dos casos segundo áreas difusas

<i>Áreas difusas</i>	<i>Frequência</i>	<i>%</i>
Total com informação	200	
NÃO	175	87,5
SIM	25	12,5
Não aplicável	8

Figura 27 – Sobrevida geral nos casos de LF por áreas difusas (n=121)

Tabela 20 – Médias de sobrevida para área difusa

<i>Áreas difusas</i>	<i>Estimativa (anos)</i>	<i>Desvio</i>	<i>Intervalo de Confiança 95%</i>	
			<i>Limite Inferior</i>	<i>Limite Superior</i>
NÃO	13,5	0,8	11,9	15,1
SIM	4,5	0,4	3,7	5,3
Geral	13,4	0,8	11,8	14,9

4.4.4 Padrão de “céu estrelado”

Em 24 casos foi encontrado pelo menos um macrófago por CGA (Tabela 21) e, em 11 destes casos (5%), havia seis ou mais macrófagos por CGA (graus 2+ e 3+; Figura 28). Em relação à sobrevida geral, foi observado pior sobrevida para o grupo que apresentou seis ou mais macrófagos por CGA em relação aos demais casos (Figura 29). Na Tabela 22 são apresentadas as médias de sobrevida calculadas. A redução na expectativa de sobrevida foi de 13,9 anos para 7,6 anos para o grupo com graus mais elevados de “céu estrelado”.

Tabela 21 – Distribuição dos casos segundo “céu estrelado”

<i>“Céu estrelado”</i>	<i>Frequência</i>	<i>%</i>
Total com informação	200	
Não	176	89
1+	13	6
2+	9	4
3+	2	1
Não aplicável	8

Figura 28 – Exemplo de padrão de céu estrelado 3+ (caso 85)

Figura 29 – Sobrevida geral nos casos de LF por padrão de “céu estrelado” (n=121)

Tabela 22 – Médias de sobrevida para “céu estrelado”

“Céu estrelado”	Estimativa (anos)	Desvio	Intervalo de Confiança 95%	
			Limite Inferior	Limite Superior
Não e 1+	13,9	0,7	12,6	15,4
2+ e 3+	7,6	2,0	3,6	11,6
Geral	13,4	0,8	11,8	14,9

4.4.5 Presença de fibrose

De 200 casos de LF não cutâneos, 35 apresentaram algum grau de fibrose (Tabela 23). Estes casos foram graduados, de forma estimada, desde casos com fibrose sutil intrafolicular (1+), passando por casos que já apresentavam algum grau de fibrose interfolicular (2+), até aqueles com fibrose intensa intra e interfolicular (3+; Figura 30). Na Figura 31 são demonstradas as curvas de sobrevida relacionadas ao grau de fibrose. Não foi observado comportamento diferenciado nas curvas de sobrevida em função da fibrose. Na Tabela 24 apresentamos as médias de sobrevida calculadas.

Tabela 23 – Distribuição dos casos segundo fibrose

<i>Fibrose</i>	<i>Frequência</i>	<i>%</i>
Total com informação	200	
Sem fibrose	165	83
1+	16	8
2+	14	7
3+	5	2
Não aplicável	8

Figura 30 – Exemplos de casos de LF com fibrose 3+. Casos 48 (esquerda) e e168 (direita)

Figura 31 – Sobrevida geral nos casos de LF por fibrose (n=121)

Tabela 24 – Médias de sobrevida para fibrose

Fibrose	Estimativa (anos)	Desvio	Intervalo de Confiança 95%	
			Limite Inferior	Limite Superior
Não e 1+	13,2	0,9	11,5	14,9
2+ e 3+	9,7	0,9	7,8	11,5
Geral	13,4	0,8	11,8	14,9

4.5 Distribuição qualitativa das variáveis imuno-histoquímicas e relação com sobrevida.

4.5.1 Imuno-expressão de CD10

A expressão de CD10 foi observada em 90% dos casos (Tabela 25).

Tabela 25 – Distribuição dos casos segundo expressão de CD10

<i>CD10</i>	<i>Frequência</i>	<i>%</i>
Total conclusivos	192	
NEGATIVOS	20	10
POSITIVOS	172	90
Não avaliados	16	

Na Figura 32 são demonstradas as curvas de sobrevida de acordo com a expressão para CD10. Não foi evidenciado comportamento diferenciado entre os grupos positivo e negativo. Na Tabela 26 estão as médias de sobrevida calculadas.

Figura 32 – Sobrevida geral nos casos de LF por expressão de CD10 (n=116)

Tabela 26 – Médias de sobrevida para expressão CD10

CD10	Estimativa (anos)	Desvio	Intervalo de Confiança 95%	
			Limite Inferior	Limite Superior
NEGATIVOS	9,1	0,9	7,4	10,8
POSITIVOS	13,7	0,8	12,1	15,3
Geral	13,1	0,9	11,2	14,9

4.5.2 Imuno-expressão de BCL6

Apenas seis casos foram negativos para BCL6, que correspondeu a 3% do total (Tabela 27). Destes seis casos negativos, cinco apresentaram positividade para CD10. O único caso negativo para BCL6 e CD10 (caso

107), era de grau 3B, com arranjo nodular típico. Para este caso em particular, foi feita a pesquisa do anticorpo HGAL (outro marcador de células centrofoliculares), que resultou positiva. Na Figura 33 são apresentadas as curvas de sobrevida para imunoexpressão de BCL6. Não foi possível evidenciar diferença no comportamento das curvas em função do pequeno número de pacientes no grupo negativo para BCL6. Na Tabela 28 apresentamos as médias de sobrevida calculadas.

Tabela 27 – Distribuição dos casos segundo expressão de BCL6

<i>BCL6</i>	<i>Frequência</i>	<i>%</i>
Total conclusivos	188	
NEGATIVOS	6	3
POSITIVOS	182	97
Não avaliados	20

Figura 33 – Sobrevida geral nos casos de LF por expressão de BCL6 (n=112)

Tabela 28 – Médias de sobrevida segundo expressão de BCL6

<i>BCL6</i>	<i>Estimativa (anos)</i>	<i>Desvio</i>	<i>Intervalo de Confiança 95%</i>	
			Limite Inferior	Limite Superior
NEGATIVOS	6,6	1,5	3,7	9,6
POSITIVOS	13,0	1,0	11,1	15,0
Geral	13,0	1,0	11,1	15,0

4.5.3 Imuno-expressão de BCL2

A expressão de BCL2 foi encontrada em 194 de 206 casos (94%). Considerando apenas os casos não cutâneos, a positividade para BCL2 foi observada em 189 de 198 casos testados (95%; Tabela 29).

Tabela 29 - Distribuição dos casos segundo expressão de BCL2

<i>BCL2</i>	<i>Frequência</i>	<i>%</i>
Total conclusivos	198	
NEGATIVOS	9	5
POSITIVOS	189	95

4.5.4 Imuno-expressão de MUM1/IRF4

A expressão de MUM1/IRF4 (Figura 34) foi observada em 11% dos casos (Tabela 30).

Tabela 30 – Distribuição dos casos segundo expressão de MUM1/IRF4

<i>MUM1/IRF4</i>	<i>Frequência</i>	<i>%</i>
Total conclusivos	161	
NEGATIVOS	142	89
POSITIVOS	19	11
Não avaliados	47

Figura 34 – Exemplo de expressão de MUM1/IRF4 em caso de LF (caso 130)

Na Figura 35 são apresentadas as curvas de sobrevida para MUM1/IRF4. Não foi possível evidenciar de forma significativa, mas há indícios fortes que MUM1/IRF4 interfira na sobrevida das pacientes. A quantidade de pacientes positiva foi pequena e censurada até a sobrevida de 10 anos. Na Tabela 31 são indicadas as médias de sobrevida observadas. A estimativa de redução para os pacientes MUM1 positivo é de 12,9 para 8,0 anos.

Figura 35 – Sobrevida geral nos casos de LF por expressão de MUM1/IRF4 (n=102)

Tabela 31 – Médias de sobrevida para expressão de MUM1/IRF4

<i>MUM1/IRF4</i>	<i>Estimativa (anos)</i>	<i>Desvio</i>	<i>Intervalo de Confiança 95%</i>	
			Limite Inferior	Limite Superior
NEGATIVOS	12,9	1,1	10,8	15,0
POSITIVOS	8,0	1,4	5,2	10,8
Geral	12,9	1,0	11,0	14,9

4.5.5 Imuno-expressão de CD23

A expressão de CD23 pelas células neoplásicas (Figura 36) foi observada em 24% dos casos (Tabela 32).

Figura 36 – Exemplo de expressão de CD23 nas células neoplásicas em caso de LF (caso 149)

Tabela 32 – Distribuição dos casos segundo expressão de CD23

<i>CD23</i>	<i>Frequência</i>	<i>%</i>
Total conclusivos	167	
NEGATIVOS	127	76
POSITIVOS	40	24
Não avaliados	41	

Na Figura 37 são demonstradas as curvas de sobrevida para expressão de CD23. Não foi evidenciada influência da expressão do CD23 pelas células neoplásicas nas curvas de sobrevida dos pacientes, uma vez que, após a sobrevida de dez anos, restaram poucos pacientes não censurados no grupo CD23-positivo. Na Tabela 33 estão indicadas as médias de sobrevida observadas.

Figura 37 – Sobrevida geral nos casos de LF por expressão de CD23 (n=100)

Tabela 33 – Médias de sobrevida para expressão de CD23

CD23	Estimativa (anos)	Desvio	Intervalo de confiança 95%	
			Limite Inferior	Limite Superior
NEGATIVOS	13,7	0,8	12,1	15,4
POSITIVOS	9,9	0,8	8,4	11,4
Geral	12,9	1,0	11,0	14,8

4.5.6 Trama de células foliculares dendríticas

A imuno-expressão de 23 também foi usada para avaliar a trama de células foliculares dendríticas (CFD). Os resultados foram classificados como ausente, descontínua ou preservada (Figura 38) e estão expostos na Tabela 34.

Figura 38 – Exemplo de trama de CFD preservada avaliada através da imunoexpressão de CD23 (caso 86)

Tabela 34 – Distribuição dos casos segundo trama de CFD

<i>Trama de CFD</i>	<i>Frequência</i>	<i>%</i>
Total conclusivos	162	
AUSENTE	42	26
DESCONTÍNUA	49	30
PRESERVADA	71	44
Não avaliados	46	

Na Figura 39 são demonstradas as curvas de sobrevida de acordo com estado da trama de CFD. Não foi evidenciada influência do estado da

trama de CFD nas curvas de sobrevida; contudo, após a sobrevida de dez anos, restaram poucos pacientes não censuradas. Na Tabela 35 são apresentadas as médias de sobrevida calculadas.

Figura 39 – Sobrevida geral nos casos de LF por estado da trama de CFD (n=95)

Tabela 35 – Médias de sobrevida segundo trama de CFD

Trama de CFD	Estimativa (anos)	Desvio	Intervalo de Confiança 95%	
			Limite Inferior	Limite Superior
AUSENTE	9,6	0,5	8,7	10,5
DESCONTÍNUA	8,9	0,7	7,5	10,3
PRESERVADA	12,8	1,3	10,2	15,3
Geral	12,9	1,0	11,0	14,8

4.5.7 Clonalidade

A expressão monoclonal para imunoglobulinas de cadeia leve kappa e lambda foi avaliada e os resultados estão expostos na Tabela 36. Os casos negativos para ambas as imunoglobulinas (120 casos) ou positivos para ambas (2 casos) foram considerados negativos para clonalidade. Dos 34 casos com expressão monoclonal, 15 casos foram monoclonais para lambda e 19 casos foram monoclonais para kappa.

Tabela 36 – Distribuição dos casos segundo clonalidade

<i>CLONALIDADE</i>	<i>Frequência</i>	<i>%</i>
Total conclusivos	156	
NEGATIVO	122	78
POSITIVO	34	22
Não avaliados	52	

Na Figura 40 são apresentadas as curvas de sobrevida de acordo com presença ou não de clonalidade. Não foi evidenciada influência da expressão monoclonal de imunoglobulinas nas curvas de sobrevida, pois, após a sobrevida de quatro anos, restaram poucos pacientes não censurados no grupo clonal. Na Tabela 37 apresentamos as médias de sobrevida observadas.

Figura 40 – Sobrevida geral nos casos de LF por clonalidade (n=100)

Tabela 37 – Médias de sobrevida para clonalidade

Clonalidade	Estimativa (anos)	Desvio	Intervalo de Confiança 95%	
			Limite Inferior	Limite Superior
NEGATIVO	12,9	1,1	10,8	15,0
POSITIVO	8,0	1,6	4,9	11,0
Geral	12,9	1,0	11,0	14,9

4.6 Distribuição semi-quantitativa de variáveis imuno-histoquímicas

4.6.1 Imunoexpressão de MDM2

Foi avaliada a expressão de MDM2 de forma semi-quantitativa através

da estimativa do percentual de núcleos positivos. Os resultados estão expostos na Tabela 38. A partir do ponto de corte 20% houve significância estatística entre as curvas de sobrevida ($p=0,025$; Figura 41). Foi constatada redução significativa na expectativa de sobrevida para as pacientes com MDM2 positivo. A redução foi de 13,1 para 7,7 anos. Na Tabela 39 estão indicadas as médias de sobrevida observadas.

Tabela 38 – Distribuição dos casos segundo imunoexpressão de MDM2

<i>MDM2</i>	<i>Frequência</i>
Total conclusivos	156
NEGATIVOS	118
5%	8
10%	4
20%	10
30%	7
40%	3
≥50%	6
Não avaliados	52

Figura 41 – Sobrevida geral nos casos de LF por expressão de MDM2 $\geq$ 20% (n=97)

Tabela 39 – Médias de sobrevida para MDM2 $\geq$ 20%

MDM2	Estimativa (anos)	Desvio	Intervalo de Confiança 95%	
			Limite Inferior	Limite Superior
NEGATIVOS	13,1	1,2	10,7	15,5
POSITIVOS	7,7	1,1	5,6	9,8
Geral	12,9	1,0	11,0	14,9

4.6.2 Imunoexpressão de Ki-67

O índice de proliferação celular dos casos de LF foi estimado através da imunoexpressão de Ki-67. Os casos foram computados de acordo com ponto de corte de 50% para este índice (Tabela 40).

Tabela 40 – Distribuição dos casos segundo Ki-67

<i>Ki-67</i> ≥50%	<i>Frequência</i>	<i>%</i>
Total conclusivos	196	
NÃO	145	74
SIM	51	26
Não avaliados	12	

Na Figura 42 são apresentadas as curvas de sobrevida para Ki-67, com ponto de corte de 50%. Foi constatada redução significativa na expectativa de sobrevida para os pacientes com expressão de Ki-67 $\geq 50\%$. A redução foi de 14,1 para 9,9 anos. Na tabela 40 apresentamos as médias de sobrevida observadas.

Figura 42 – Sobrevida geral nos casos de LF por expressão de Ki-67 $\geq 50\%$ (n=119)

Tabela 41 – Médias de sobrevida para expressão de Ki-67 $\geq 50\%$

Ki67 $\geq 50\%$	Estimativa (anos)	Desvio	Intervalo de Confiança 95%	
			Limite Inferior	Limite Superior
NÃO	14,1	0,7	12,7	15,6
SIM	9,9	1,5	7,0	12,7
Geral	13,3	0,8	11,7	14,9

4.7 FISH

4.7.1 Rearranjo do gene *BCL2*

De 158 casos de LF testados quanto a presença de rearranjo

envolvendo o gene *BCL2*, 112 apresentaram resultado conclusivo. Destes, 83 casos (74%) foram positivos (Tabela 42). Na Figura 43 são demonstradas as curvas de sobrevida para rearranjo do gene *BCL2*. Foi constatada redução significativa na expectativa de sobrevida para os pacientes com ausência de rearranjo envolvendo o gene *BCL2*. A redução foi de 12,9 para 7,9 anos. Na Tabela 43 estão apresentadas as médias de sobrevida calculadas.

Tabela 42 – Distribuição dos casos segundo rearranjo do gene *BCL2*

<i>Rearranjo do BCL2</i>	<i>Frequência</i>	<i>%</i>
Total conclusivos	112	
NEGATIVO	29	26
POSITIVO	83	74
Não avaliados/ inconclusivos	96

Figura 43 – Sobrevida geral nos casos de LF por rearranjo do gene *BCL2* (n=68)

Tabela 43 – Médias de sobrevida para rearranjo do gene *BCL2*

Rearranjo do <i>BCL2</i>	Estimativa (anos)	Desvio	Intervalo de Confiança 95%	
			Limite Inferior	Limite Superior
NEGATIVO	7,9	1,0	5,9	9,9
POSITIVO	12,9	1,4	10,2	15,7
Geral	12,7	1,2	10,4	15,1

4.7.2 Rearranjo do gene *BCL6*

De 158 casos de LF testados quanto a presença de rearranjo envolvendo o gene *BCL6*, 105 apresentaram resultado conclusivo. Destes, 21 casos (20%) foram positivos (Tabela 44).

Tabela 44 – Distribuição dos casos segundo rearranjo do gene *BCL6*

<i>Rearranjo do BCL6</i>	<i>Frequência</i>	<i>%</i>
Total conclusivos	105	
NEGATIVO	84	80
POSITIVO	21	20
Não avaliados	103	

Na Figura 44 são apresentadas as curvas de sobrevida para rearranjo do gene *BCL6*.

Figura 44 – Sobrevida geral nos casos de LF por rearranjo do gene *BCL6* (n=64)

Foi constatada redução significativa na expectativa de sobrevida para as pacientes com presença de rearranjo envolvendo o gene *BCL6*. A redução foi de 13,4 para 6,4 anos. Na Tabela 45 estão indicadas as médias de sobrevida.

Tabela 45 – Médias de sobrevida para rearranjo do *BCL6*

<i>Rearranjo do BCL6</i>	<i>Estimativa (anos)</i>	<i>Desvio</i>	<i>Intervalo de Confiança 95%</i>	
			Limite Inferior	Limite Superior
NEGATIVO	13,4	1,4	10,6	16,2
POSITIVO	6,4	1,1	4,2	8,7
Geral	12,3	1,2	9,9	14,7

Na Tabela 46 é apresentado um consolidado das informações morfológicas, imunofenótípicas e moleculares previamente expostas em relação ao sítio de acometimento e faixa etária dos casos de LF.

Tabela 46 – Consolidado de dados morfológicos, imunofenotípicos e moleculares de 208 casos de LF em pacientes jovens

	LF cutâneos	LF extranodais	LF nodal (faixas etárias)					LF nodal + LDGCB	TOTAL
			≤25	26-30	31-35	36-40	TOTAL		
TOTAL	8	20	11	18	59	85	173	7	208
Grau histológico [%(+)]									
1	0	55(11)	55(6)	39(7)	46(27)	46(39)	46(79)	0	43(90)
2	37(3)	25(5)	18(2)	44(8)	37(22)	29(25)	33(57)	14(1)	32(66)
3a	63(5)	10(2)	9(1)	11(2)	15(9)	20(17)	17(29)	29(2)	18(38)
3b	0	10(2)	18(2)	6(1)	2(1)	5(4)	4(8)	57(4)	7(14)
Achados histológicos [%(+)]									
Fibrose									
1+	-	0	0	17(3)	7(4)	11(9)	9(16)	0	8(16)
2+	-	5(1)	0	11(2)	7(4)	6(5)	6(11)	29(2)	7(14)
3+	-	5(1)	0	6(1)	3(2)	0	2(3)	14(1)	2(5)
Zona do manto		15(3)	0	22(4)	20(12)	14(12)	16(28)	14(1)	16(32)
Áreas difusas		10(2)	18(2)	11(2)	8(5)	8(7)	9(16)	100(7)	12(25)
"Céu estrelado"									
1+	-	0	0	17(3)	7(4)	7(6)	7(13)	0	6(13)
2+	-	5(1)	9(1)	0	2(1)	8(7)	5(8)	0	4(9)
3+	-	0	9(1)	0	0	1(1)	1(2)	0	1(2)

Trama de CFD [%(+/-testados)]

Preservada	14(2/14)	20(2/10)	43(6/14)	44(24/54)	53(34/64)	41(66/162)	33(2/6)	43(70/162)
Descontínua	21(3/14)	40(4/10)	29(4/14)	33(18/54)	30(19/64)	29(45/162)	17(1/6)	30(49/162)
Ausente -	64(9/14)	40(4/10)	29(4/14)	22(12/54)	17(11/64)	19(31/162)	50(3/6)	27(43/162)

Imunofenótipo [%(+/-testados)]

CD10	62(5/8)	89(16/18)	91(10/11)	86(12/14)	95(54/57)	89(70/79)	91(146/161)	71(5/7)	90(172/192)
MUM1	20(1/5)	7(1/15)	40(4/10)	15(2/13)	2(1/50)	11(7/62)	10(14/135)	50(3/6)	11(19/161)
BCL6	100(7/7)	100(17/17)	100(11/11)	100(16/16)	100(55/55)	92(69/75)	96(151/157)	100(7/7)	97(182/188)
BCL2	62(5/8)	94(17/18)	73(8/11)	94(17/18)	98(58/59)	96(82/85)	95(165/173)	100(7/7)	94(194/206)
CD23	0(0/5)	36(5/14)	20(2/10)	21(3/14)	28(15/54)	20(13/64)	28(33/142)	33(2/6)	24(40/167)
MDM2	0(0/5)	13(2/15)	30(3/10)	23(3/13)	10(5/50)	10(6/62)	15(20/135)	67(4/6)	16(26/161)
Ki-67≥50%	29(2/7)	15(3/20)	40(4/10)	11(2/18)	24(14/59)	26(21/82)	24(41/169)	100(7/7)	26(53/203)

Rearranjo gênico [%(+/-conclusivos)]

<i>BCL2</i>	25(1/4)	82(9/11)	50(4/8)	82(9/11)	87(28/32)	70(33/47)	75(74/98)	0(0/3)	72(84/116)
<i>BCL6</i>	33(1/3)	0(0/10)	33(2/6)	12(1/8)	16(5/31)	24(11/46)	21(19/91)	50(2/4)	20(22/108)

4.8 Correlação entre variáveis

4.8.1 Imunoexpressão de CD10 e MUM1/IRF4

Foi feita análise de 156 casos que apresentaram resultado conclusivo para imunoexpressão tanto de CD10 quanto de MUM1/IRF4. Os pacientes foram distribuídos em quatro grupos: positivo para ambos, negativos para ambos e positivo para apenas um deles, conforme exposto na Tabela 47.

Tabela 47 – Distribuição dos casos segundo a relação da expressão de CD10 e MUM1

<i>CD10 x MUM1</i>	<i>Frequência</i>	<i>%</i>
Total conclusivos	156	
+/+	12	8
+/-	126	80
-/+	6	4
-/-	12	8
Não avaliados	52	

Na Figura 45 são apresentadas as curvas de sobrevida de acordo com estes quatro grupos criados a partir da relação entre as expressões de CD10 e MUM1. Não foi evidenciada influência da combinação entre expressão de CD10 e MUM1 nas curvas de sobrevida. O pequeno número de pacientes na maioria dos grupos impossibilitou a inferência. Na Tabela 48 são apresentadas as médias de sobrevida calculadas.

Figura 45 – Sobrevida geral nos casos de LF de acordo com a relação entre expressão de CD10 e MUM1 (n=102)

Tabela 48 – Médias de sobrevida segundo a expressão de CD10 e MUM1

CD10 x MUM1	Estimativa (anos)	Desvio	Intervalo de Confiança 95%	
			Limite Inferior	Limite Superior
+/+	8,5	1,6	5,3	11,7
+/-	13,5	0,9	11,7	15,3
-/+	2,6	0,7	1,2	4,1
-/-	10,0	0,2	9,7	10,4
Geral	13,0	1,0	11,0	14,9

4.8.2 Rearranjos dos genes *BCL2* e *BCL6*

Foi feita uma análise de 94 casos que apresentaram resultado

conclusivo para pesquisa de rearranjo envolvendo tanto o gene *BCL2* quanto o gene *BCL6*. Os pacientes foram distribuídos em quatro grupos: positivo para ambos, negativos para ambos e positivo para apenas um deles, conforme exposto na Tabela 49.

Tabela 49 – Distribuição dos casos segundo a relação dos rearranjos dos genes *BCL2* e *BCL6*

<i>BCL2</i> x <i>BCL6</i>	Frequência	%
Total conclusivos	94	
+/+	9	10
+/-	59	62
-/+	10	11
-/-	16	17
Não avaliados	114	

Na Figura 46 são apresentadas as curvas de sobrevida de acordo com a relação entre os rearranjos dos genes *BCL2* e *BCL6*. Foi evidenciada influência significativa nas curvas de sobrevida para as combinações entre os rearranjos dos genes *BCL2* e *BCL6*. A combinação *BCL2*-positivo e *BCL6*-negativo foi a que levou à maior sobrevida média: 13,7 anos. As demais combinações ficaram entre 6,6 e 7,6 anos (Tabela 50).

Figura 46 – Sobrevida geral nos casos de LF de acordo com a relação entre rearranjos dos genes *BCL2* e *BCL6* (n=56)

Tabela 50 – Médias de sobrevida segundo os rearranjos de *BCL2* e *BCL6*

<i>BCL2</i> x <i>BCL6</i>	Estimativa (anos)	Desvio	Intervalo de Confiança 95%	
			Limite Inferior	Limite Superior
+/+	7,5	1,6	4,4	10,7
+/-	13,7	1,5	10,8	16,7
-/+	6,6	2,0	2,6	10,7
-/-	7,6	0,8	6,1	9,1
Geral	12,9	1,2	10,5	15,3

Na Tabela 51 estão apresentadas diversas variáveis anatomoclínicas para os diversos grupos criados a partir da presença ou ausência de rearranjo envolvendo os genes *BCL2* e *BCL6*.

Tabela 51 – Correlação entre os rearranjos de *BCL2* e *BCL6* com variáveis clínicas, morfológicas e imunofenotípicas

Rearranjo gênico:	<i>BCL2</i>-/ <i>BCL6</i>-	<i>BCL2</i>-/ <i>BCL6</i>+	<i>BCL2</i>+/ <i>BCL6</i>-	<i>BCL2</i>+/ <i>BCL6</i>+
<i>Características clínicas [%(+ / testados)]</i>				
Sexo: masculino	50(9/18)	27(3/11)	41(24/59)	22(2/9)
Idade ≤ 30	22(4/18)	18(2/11)	17(10/59)	22(2/9)
FLIPI ≥ 3	33(1/3)	50(3/6)	35(8/23)	50(2/4)
Sintomas B	50(2/4)	57(4/7)	26(6/23)	50(2/4)
Estádio de Ann Arbor III-IV	50(2/4)	43(3/7)	52(13/25)	100(4/4)
Acometimento de medula óssea	0/3	20(1/5)	22(5/23)	75(3/4)
DHL elevado	0/3	20(1/5)	10(2/20)	50(1/2)
Anemia	25(1/4)	60(3/5)	19(4/21)	0/2
<i>Características morfológicas e</i>				
	n=18	n=11	n=59	n=9
<i>imunofenotípicas [%(+)]</i>				
Fibrose	6(1)	9(1)	8(5)	0
Persistência da zona do manto	0	9(1)	19(11)	22(2)
Aspecto de “céu estrelado”	17(3)	0	2(1)	11(1)
Presença de áreas difusas	50(9)	27(3)	3(2)	0
Grau 3	67(12)	45(5)	17(10)	11(1)
<i>BCL2</i> -positivo (IHQ)	94(17)	91(10)	97(57)	100(9)
<i>BCL6</i> -positivo (IHQ)	100(18)	91(10)	100(59)	100(9)
CD10-positivo	61(11)	36(4)	93(55)	100(9)
MUM1/IRF4-positivo	56(10)	55(6)	2(1)	0
CD23-positivo	17(3)	9(1)	36(21)	33(3)
MDM2 ≥ 20%	39(7)	45(5)	10(6)	0
Ki-67 ≥ 50%	61(11)	45(5)	25(15)	11(1)

4.9 Agrupamento hierárquico

Aplicando a técnica de agrupamento hierárquico de variáveis clínicas, patológicas e moleculares, os casos de LF em adultos jovens foram segregados em dois grupos distintos (Figura 47). Grupo denominado “A” formado por casos de LF com positividade para CD10, BCL6, BCL2, rearranjo do gene *BCL2* e ausência do rearranjo do gene BCL6. Grupo “B”, constituído em sua maioria por casos de alto grau histológico, índice de proliferação celular Ki-67 mais elevado e expressão de MDM2. Os casos do grupo B também apresentaram maiores frequências de áreas difusas, presença de rearranjo do gene *BCL6* e ausência de rearranjo do gene *BCL2*. Não foi observada diferença na sobrevida geral entre estes dois grupos, embora o valor de p (entre 0,05 e 0,1) apoie tendência de pior sobrevida no grupo B.

Figura 47 – Agrupamento hierárquico baseado em variáveis clínicas e patológicas de 94 casos de LF em adultos jovens. Os casos puderam ser divididos em grupos A e B

5 DISCUSSÃO

A literatura carece de estudos que avaliem o comportamento biológico e achados anatomoclínicos do LF em pacientes adultos jovens. No presente estudo, foram avaliadas as características anatomoclínicas e moleculares do LF em grande grupo de adultos jovens, com idades entre 19 e 40 anos.

De uma forma geral, observamos aumento da incidência do LF com a idade, até um pico de incidência em torno de 60 anos. Nos nossos casos, observamos aumento gradativo da incidência nos vários subgrupos etários: < 25 anos, 26-30 anos, 31-35 anos e 36-40 anos. A exemplo do descrito por Jaglowski e colaboradores (2009) estudando pacientes da mesma faixa etária, quase metade (49%) dos nossos casos LF pertenceu ao subgrupo mais velho (36-40 anos). Também encontramos discreto predomínio do sexo feminino entre nossos pacientes (55%), tal como esperado para o LF em adultos.

O LF é tido como doença nodal. Contudo, o acometimento extranodal é descrito, seja de forma exclusiva, seja associado a acometimento nodal. Alguns desses LF extranodais podem diferir nas suas propriedades moleculares e comportamento clínico em relação aos LF nodais (Yamamoto, *et al.* 2010). No caso dos LF de trato gastrointestinal, as medianas de sobrevida com e sem tratamento são semelhantes, muito pelo seu caráter indolente e pelo longo período assintomático durante a história natural da doença. Assim, a decisão de iniciar terapia quimioterápica agressiva em pacientes com esse diagnóstico é crucial. Três de nossos casos eram LF gastrointestinais – dois acometendo o duodeno e outro o estômago – todos com remissão completa após tratamento, sem relato de disseminação para

outros sítios. Apesar de serem poucos pacientes, a partir da observação de manejo clínico, estadiamento e seguimento fora de tratamento, observamos ausência de complicações graves relacionadas à quimioterapia.

De forma geral, o acometimento de medula óssea é relatado entre 15 a 70% dos casos de LF, a depender do grau histológico. Em nossa série, a medula óssea estava infiltrada em 32% dos casos, à época do diagnóstico, e a maior frequência foi observada nos LF de grau 2 (44%).

Lobetti-Bodoni e colaboradores (2011) estudaram 153 pacientes em faixa etária semelhante ao nosso estudo, comparando-os a 850 pacientes com mais de 40 anos e identificaram que os mais jovens têm sobrevida geral e específica relacionada ao LF maiores; contudo, a expectativa de vida, comparada à da população geral, é menor. Eles também mostraram que pacientes jovens têm menor elevação de DHL e menor taxa de acometimento extranodal primário, além de não ter havido diferenças quanto à incidência de segundo tumor e transformação histológica (Lobetti-Bodoni, *et al.* 2011). Parece que a idade menor em si não influencia negativamente em comportamento mais agressivo do tumor, além de haver menos complicações graves relacionadas à exposição a quimioterápicos. Há relatos de maior frequência de envolvimento de medula óssea (57%) na faixa etária mais jovem, comparada aos pacientes maiores de 40 anos, mas não houve diferenças quanto à incidência de segundo tumor e transformação histológica (Lobetti-Bodoni, *et al.* 2011). É possível que a idade menor tenha influência positiva na evolução clínica, com aparente melhor “status performance” ao diagnóstico, menor taxa de óbito relacionado a

complicações e menor impacto da carga tumoral quanto ao comprometimento de funções vitais. Em nossa casuística, tivemos resultados semelhantes quanto à elevação de DHL (14% deles vs. 11% nossos), mas encontramos resultados discordantes quanto à infiltração de medula óssea ao diagnóstico (32% de positividade de LF em medula óssea). Como nossos pacientes apresentaram achados semelhantes de sobrevida, poderíamos indagar o papel da carga tumoral medular nessa faixa etária – haveria importância de menor carga tumoral percentual de infiltração em medula óssea quanto ao comportamento clínico evolutivo menos agressivo, ou a idade (< 40 anos vs. > 40 anos) teria tão maior impacto a ponto de “proteger” os pacientes mais jovens do efeito do maior estadiamento clínico. Também não podemos descartar a possibilidade de subestadiamento de alguns pacientes, mas, em termos estatísticos, infiltração de medula óssea em nossa série reproduziu a mesma relação com sobrevida em comparação com outros estudos publicados.

O LF é tipicamente diagnosticado em estádios avançados, com apenas 26 a 33% dos pacientes em estágio I ou II (Relander, *et al.* 2010). Summerfield e colaboradores (2004), estudando 46 pacientes menores de 40 anos, encontraram que 74% deles eram estádios III e IV de Ann Arbor. No nosso estudo, 64% (56 de 88) apresentaram o mesmo estadiamento ao diagnóstico.

Parâmetros prognósticos críticos têm sido descritos, na tentativa de prever resultados em pacientes com LF, incluindo FLIPI, que divide a entidade em três grupos com probabilidades distintas de sobrevida (Solal-

Celigny, *et al.* 2004). Encontramos significativas diferenças entre os grupos de FLIPI – risco intermediário/baixo (< 3) e alto risco (≥ 3) – em termos de sobrevida geral. Embora, atualmente, seja usado o escore FLIPI 2 (Federico, *et al.* 2009), não pudemos aplicá-lo em nossa casuística pela impossibilidade de acesso a informações clínicas e biológicas fundamentais para o cálculo desse índice, coletadas ao diagnóstico, como tamanho da maior massa tumoral e níveis de beta2-microglobulina sérica.

A importância prognóstica do microambiente em LF também tem sido amplamente investigada (Dave, *et al.* 2004, Solal-Celigny, *et al.* 2010). Farinha e colaboradores (2005) sugeriram que os casos de LF com número alto de macrófagos – 15 ou mais macrófagos CD68+/CGA – foram correlacionados com pior prognóstico (5,0 anos de sobrevida geral) em 12 de 99 casos de LF em oposição a 87 casos com menos de 15 macrófagos CD68+/CGA (16,3 anos). Quanto a isso, identificamos mais de cinco macrófagos/CGA em 5% de nossos casos, subgrupo que apresentou pior taxa de sobrevida geral comparado aos pacientes cuja contagem de macrófagos/CGA foi menor que cinco (7,63 vs. 13,97 anos, respectivamente). Fibrose induzida pelo tumor ocorreu em 10% de nossos casos, sendo um quarto dos casos em linfonodos cervicais. Uma vez que outros linfomas indolentes quase nunca são acompanhados de fibrose, esse achado é útil na análise histopatológica para o estabelecimento do diagnóstico (Klapper 2011). Não identificamos impacto na sobrevida geral de nossos pacientes com tal achado, embora correlação entre fibrose e menor sobrevida geral tenha sido descrita como fator independente do

FLIPI, em estádios avançados de LF em um estudo (Klapper, *et al.* 2007). Áreas difusas foram encontradas em 12% dos nossos casos. Em alguns destes casos, a imunomarcação com CD23 foi útil para confirmar que células tumorais se infiltraram fora dos folículos. Essas áreas são compostas principalmente de centrócitos e alguns poucos centroblastos e não apresentaram impacto na sobrevida geral. É importante reforçar que áreas difusas, formadas predominantemente por grandes células transformadas, determinaram o diagnóstico de LDGCB.

Transformação de LF em linfoma agressivo, usualmente LDGCB, ocorre em cerca de 3% dos casos por ano (Montoto, *et al.* 2007). Conconi e colaboradores (2012) mostraram transformação histológica de 26% em 14 anos, em série de 281 casos tratados na Suíça. Nós observamos concomitância de LDGCB e LF em sete pacientes ao diagnóstico, sendo quatro deles de grau 3B, dois de grau 3A e um de grau 2. Até o momento, não documentamos transformação histológica no grupo remanescente de casos.

Quanto ao grau histológico, não encontramos grandes diferenças entre os pacientes com LF graus 1, 2 e 3A em termos de sobrevida geral, ao contrário dos casos de grau 3B, que mostraram forte diminuição estatisticamente significativa de sobrevida geral. Isso está em acordo com estudo recente de Wahlin e colaboradores (2012) que avaliaram coorte de 505 com LF, com idades entre 25 e 89 anos, e mostraram que o grau 3A comporta-se de forma mais indolente, a exemplo dos de graus 1 e 2 (Horn, *et al.* 2011). Jaglowski e colaboradores (2009), em revisão de LF em

adolescentes e adultos jovens, demonstraram que frequência de LF de baixo grau aumenta com a idade devido à tendência geral de características mais agressivas do linfoma nos jovens. Nos pacientes, entre 15 e 24 anos, graus 1 a 3 ocorrem com aproximadamente igual frequência, enquanto que nos de 35-39 anos os de grau 1 representam cerca de 55% dos diagnósticos, seguidos pelos de graus 2 (30%) e 3 (18%). Identificamos uma pequena variação nessas proporções e foi mais alta (54%) em pacientes do subgrupo mais jovem (≤ 25 anos), diminuindo (41%) nos seguintes (26-30 anos) e aumentando novamente nos mais velhos – 31-35 anos (44%) e 36-40 anos (46%). Essa diferença já tinha sido observada em séries anteriores e provavelmente indica que nossos casos não são do tipo pediátrico de LF.

As células do LF expressam tipicamente marcadores linfoides B de centro germinativo (CD10, BCL6 e HGAL) e negatividade para MUM1/IRF4, marcador de células B pós-CG (Dogan, *et al.* 2000, Karube, *et al.* 2007, Harris, *et al.* 2008, Piccaluga, *et al.* 2009, Younes, *et al.* 2010). A proteína BCL2 é expressa na maioria dos LF, incluindo casos sem a translocação t(14;18). Variações nesse perfil imunofenotípico têm sido descritas, algumas, inclusive, como tendo valor prognóstico. Os LF de alto grau que não apresentam t(14, 18) mais frequentemente têm se associado com rearranjo 3q27/BCL6 e mostram negatividade para CD10 e positividade para MUM1/IRF4 (Jardin, *et al.* 2002, Horsman, *et al.* 2003, Guo, *et al.* 2007). Observamos expressão de MUM1/IRF4 em 9% de nossos casos (18+/156). Desses, 37% foram negativos para CD10, 89%

apresentaram perda de rearranjo envolvendo o gene *BCL2* e 35% revelaram presença de rearranjo envolvendo o gene *BCL6*. Diferente de Louissaint e colaboradores (2012), que encontraram negatividade para o rearranjo *BCL2*/alto índice de proliferação (*BCL2*-N/AIP) no estágio I entre 58 pacientes adultos jovens (≥ 18 anos) com LF. Em nossa série, apenas um terço dos pacientes estavam nesse estágio. Liu e colaboradores (2012) encontraram expressão de MUM1/IRF4 em todos os casos de LF pediátrico envolvendo anel de Waldeyer. Tivemos cinco casos envolvendo tonsila, nenhum dos quais com expressão de MUM1/IRF4. Somente um caso com acometimento extranodal (tireoide) mostrou positividade para MUM1/IRF4.

A expressão de CD23 também tem sido observada nas células neoplásicas do LF (Thorns, *et al.* 2007, Olteanu, *et al.* 2011). Thorns et al. (2007) também relatam uma aumento da frequência de expressão de CD23 entre LF que ocorrem em localização inguinal e entre aqueles de grau histológico 1. Olteanu et al. (2011) também relatam predomínio inguinal nos casos positivo, mas, por outro lado, encontraram maior frequência de positividade para CD23 entre os LF de grau 3, além de melhor sobrevida nos casos positivos. Nos nossos casos, observamos positividade para CD23 nas células neoplásicas em 24% dos casos (39+/163), sem qualquer impacto na evolução com variados níveis de expressão de CD23. Também houve uma frequência um pouco maior nos de grau 1 (30%), em comparação com os de grau 2 (20%) e grau 3A (23%), mas sem significância estatística. Não observamos predileção pela

localização inguinal, mas uma distribuição uniforme entre os vários sítios nodais. Expressão fraca para CD23 foi observada em apenas dois casos extranodais.

A oncoproteína MDM2 é um inibidor celular do p53 que está frequentemente desregulado em neoplasias humanas. Ambos os marcadores tem sido associados a pior evolução em linfomas B, de forma independente (Pagnano, *et al.* 2001, Moller, *et al.* 2002). Nos nossos casos, encontramos impacto relevante na sobrevida geral em casos de LF com expressão de MDM2 acima de 20% das células neoplásicas. Camacho e colaboradores encontraram pior sobrevida já com níveis de expressão abaixo de 5% (Camacho, *et al.* 2011). Essa diferença nos pontos de corte pode ser atribuída à uma provável menor sensibilidade no método semi-quantitativo empregado por nós em comparação ao programa analisador de imagens empregado por Camacho e colaboradores. Também foi testada a expressão de p53 na nossa série, mas não encontramos casos positivos.

Do ponto de vista molecular, 70 a 95% dos LF têm mostrado a t(14;18) (Vaandrager, *et al.* 2000, Montoto, *et al.* 2003). Em nosso estudo, rearranjos envolvendo o gene *BCL2* foram identificados em 84 casos (72%; n = 116). O rearranjo do gene *BCL6*, inicialmente pensado tendo associação específica com LDGCB, é observado em 6,4 a 14,3% dos LF ao diagnóstico e pode sugerir subsequente transformação para alto grau (Akasaka, *et al.* 2003). Jardin e colaboradores (2002) estudaram 15 casos com rearranjo do gene *BCL6* (3q27) e ausência da t(14;18). Esses casos

apresentaram aspectos morfológicos distintos em relação ao LF clássico, tal como arquitetura nodal mais proeminente e folículos maiores. Foi sugerido que rearranjos envolvendo o gene *BCL6* poderiam estar relacionados a evolução clínica adversa (Guo, *et al.* 2007, Diaz-Alderete, *et al.* 2008). Em nossos pacientes, observamos o rearranjo do gene *BCL6* em 22 casos (20%; n = 108) com pior sobrevida geral nesse grupo: 6,4 anos contra 13,2 anos no grupo sem esse rearranjo. Diaz-Alderete e colaboradores (2008) estudaram casos de LF com relação à presença dos rearranjos nos genes *BCL2* e *BCL6*, por FISH, e detectaram positividade em 64% (101+/158) e 14% (22+/156) dos casos, respectivamente. Eles também distribuíram esses casos em quatro grupos: *BCL2*-/ *BCL6*- (32%), *BCL2*+/ *BCL6*- (56%), *BCL2*-/ *BCL6*+ (5%) e *BCL2*+/ *BCL6*+ (9%). Em nossa série, as frequências destes grupos foram semelhantes: 19, 61, 11 e 9%, respectivamente. Em termos de graus histológicos, a frequência do rearranjo do gene *BCL2* foi maior no grau 1 (93%), seguido do grau 2 (75%), grau 3A (50%) e grau 3B (11%). Distribuição invertida foi detectada quanto à frequência do rearranjo do gene *BCL6*: 21, 20, 9 e 50%, respectivamente.

A acentuada variação geográfica na incidência de translocações do *BCL2* no LF sugere que vias moleculares alternativas podem resultar em variantes do LF morfológicamente idênticas, mas distintas do ponto de vista genético. Isso está bem documentado na população asiática, onde não só incidência relativamente baixa de LF é detectada (4-12%), como também incidência relativamente baixa da t(14;18) dentre os casos de LF

(Biagi, *et al.* 2002, Chang, *et al.* 2013). No presente estudo, foi encontrada importante variação na frequência de rearranjo do gene *BCL2* entre as regiões geográficas do Brasil, com maior incidência nos casos do Sul-Sudeste em comparação com os casos do Norte-Nordeste. Contudo, o menor número de casos provenientes dessas últimas regiões restringiu a análise das curvas de sobrevida, pois a maioria dos casos deixou de ser acompanhada (dado censurado) após a sobrevida de 5,0 anos.

É importante destacar que este estudo não é baseado em casos com tratamento padronizado uniformemente e inclui pacientes tratados sob diferentes protocolos, não podendo refletir sobre o tratamento do LF em nosso meio.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- As seguintes variáveis apresentaram associação significativa com o status de vida: FLIPI, nível de hemoglobina, DHL, acometimento de medula óssea, padrão de “céu estrelado”, Ki-67 $\geq$ 50%, ausência do rearranjo do gene *BCL6* e presença do *BCL2*;
- As variáveis que apresentaram forte indício de associação com pior sobrevida geral foram: estadiamento de Ann Arbor IV e MDM2 $\geq$ 20%;
- Redução gradual na sobrevida foi observada em função do grau histológico (OMS, 2008);
- Não foi evidenciada diferença significativa para as curvas de sobrevida nas seguintes variáveis: faixa etária dos pacientes, persistência ou não da zona do manto, presença de áreas difusas, presença de fibrose, expressão de CD10, expressão de CD23, tipo de trama de células foliculares dendríticas ou clonalidade para cadeia leve de imunoglobulina;
- Foi evidenciada influência significativa nas curvas de sobrevida para as combinações dos rearranjos dos genes *BCL2* e *BCL6*. A combinação *BCL2*⁺ e *BCL6*⁻ foi a que levou à maior sobrevida média.

7 REFERÊNCIAS

- Akasaka T, Lossos IS, Levy R. BCL6 gene translocation in follicular lymphoma: a harbinger of eventual transformation to diffuse aggressive lymphoma. *Blood*. 2003;102:1443-1448.
- Attarbaschi A, Beishuizen A, Mann G, et al. Children and adolescents with follicular lymphoma have an excellent prognosis with either limited chemotherapy or with a "watch and wait" strategy after complete resection. *Ann Hematol*. 2013.
- Biagi JJ, Seymour JF. Insights into the molecular pathogenesis of follicular lymphoma arising from analysis of geographic variation. *Blood*. 2002;99:4265-4275.
- Camacho FI, Bellas C, Corbacho C, et al. Improved demonstration of immunohistochemical prognostic markers for survival in follicular lymphoma cells. *Mod Pathol*. 2011;24:698-707.
- Cattoretti G, Chang CC, Cechova K, et al. BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood*. 1995;86:45-53.
- Chang ST, Lu YH, Lu CL, et al. Follicular lymphoma in Taiwan: a low frequency of t(14;18), with grade 3A tumours more closely related to grade 3B than to low-grade tumours. *Histopathology*. 2013;63:1-12.
- Conconi A, Ponzio C, Lobetti-Bodoni C, et al. Incidence, risk factors and outcome of histological transformation in follicular lymphoma. *Br J Haematol*. 2012;157:188-196.

De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).
Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.
Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP. Elaborado por
Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S.
Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e
Documentação; 2011.
Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

- Cox DR. Regression models and life-tables. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)*. 1972;187-220.
- Dave SS, Wright G, Tan B, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med*. 2004;351:2159-2169.
- de Hoon MJ, Imoto S, Nolan J, et al. Open source clustering software. *Bioinformatics*. 2004;20:1453-1454.
- de Jong D. Molecular pathogenesis of follicular lymphoma: a cross talk of genetic and immunologic factors. *J Clin Oncol*. 2005;23:6358-6363.
- Diaz-Alderete A, Doval A, Camacho F, et al. Frequency of BCL2 and BCL6 translocations in follicular lymphoma: relation with histological and clinical features. *Leukemia lymphoma*. 2008;49:95-101.
- Dogan A, Bagdi E, Munson P, et al. CD10 and BCL-6 expression in paraffin sections of normal lymphoid tissue and B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2000;24:846-852.
- Ezzdinli EZ, Costello WG, Kucuk O, et al. Effect of the degree of nodularity on the survival of patients with nodular lymphomas. *J Clin Oncol*. 1987;5:413-418.
- Farinha P, Masoudi H, Skinnider BF, et al. Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma (FL). *Blood*. 2005;106:2169-2174.
- Federico M, Bellei M, Marcheselli L, et al. Follicular lymphoma international prognostic index 2: a new prognostic index for follicular lymphoma

- developed by the international follicular lymphoma prognostic factor project. *J Clin Oncol*. 2009;27:4555-4562.
- Frizzera G, Murphy SB. Follicular (nodular) lymphoma in childhood: a rare clinical-pathological entity. Report of eight cases from four cancer centers. *Cancer*. 1979;44:2218-2235.
- Glas AM, Kersten MJ, Delahaye LJ, et al. Gene expression profiling in follicular lymphoma to assess clinical aggressiveness and to guide the choice of treatment. *Blood*. 2005;105:301-307.
- Godon A, Moreau A, Talmant P, et al. Is t(14;18)(q32;q21) a constant finding in follicular lymphoma? An interphase FISH study on 63 patients. *Leukemia*. 2003;17:255-259.
- Goteri G, Lucarini G, Zizzi A, et al. Comparison of germinal center markers CD10, BCL6 and human germinal center-associated lymphoma (HGAL) in follicular lymphomas. *Diagn Pathol*. 2011;6:97.
- Guo Y, Karube K, Kawano R, et al. Bcl2-negative follicular lymphomas frequently have Bcl6 translocation and/or Bcl6 or p53 expression. *Pathol int*. 2007;57:148-152.
- Harris NL, Swerdlow SH, Jaffe ES, et al. Follicular lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, eds. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC; 2008:220-226.
- Hoglund M, Sehn L, Connors JM, et al. Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic pathways of clonal evolution in follicular lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004;39:195-204.

- Horn H, Schmelter C, Leich E, et al. Follicular lymphoma grade 3B is a distinct neoplasm according to cytogenetic and immunohistochemical profiles. *Haematologica*. 2011;96:1327-1334.
- Horsman DE, Connors JM, Pantzar T, et al. Analysis of secondary chromosomal alterations in 165 cases of follicular lymphoma with t(14;18). *Genes Chromosomes Cancer*. 2001;30:375-382.
- Horsman DE, Okamoto I, Ludkovski O, et al. Follicular lymphoma lacking the t(14;18)(q32;q21): identification of two disease subtypes. *Br J Haematol*. 2003;120:424-433.
- IBGE. Censo 2010 [Site de Internet]. 2010. Available at: <http://www.ibge.gov.br/>. Accessed 03/03/2013.
- Jaglowski SM, Linden E, Termuhlen AM, et al. Lymphoma in adolescents and young adults. *Semin Oncol*. 2009;36:381-418.
- Jardin F, Gaulard P, Buchonnet G, et al. Follicular lymphoma without t(14;18) and with BCL-6 rearrangement: a lymphoma subtype with distinct pathological, molecular and clinical characteristics. *Leukemia*. 2002;16:2309-2317.
- Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*. 1958:457-481.
- Karube K, Guo Y, Suzumiya J, et al. CD10-MUM1+ follicular lymphoma lacks BCL2 gene translocation and shows characteristic biologic and clinical features. *Blood*. 2007;109:3076-3079.
- Klapper W. Pathobiology and diagnosis of follicular lymphoma. *Semin Diagn Pathol*. 2011;28:146-160.

- Klapper W, Hoster E, Rolver L, et al. Tumor sclerosis but not cell proliferation or malignancy grade is a prognostic marker in advanced-stage follicular lymphoma: the German Low Grade Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol*. 2007;25:3330-3336.
- Leich E, Ott G, Rosenwald A. Pathology, pathogenesis and molecular genetics of follicular NHL. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011;24:95-109.
- Limpens J, de Jong D, van Krieken JH, et al. Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. *Oncogene*. 1991;6:2271-2276.
- Liu Q, Salaverria I, Pittaluga S, et al. Follicular Lymphomas in Children and Young Adults: A Comparison of the Pediatric Variant With Usual Follicular Lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2012.
- Lobetti-Bodoni C, Rancoita PM, Montoto S, et al. The Importance of Age in Prognosis of Follicular Lymphoma: Clinical Features and Life Expectancy of Patients Younger Than 40 years. *Proceedings of the 53rd American Society of Hematology Annual Meeting*. San Diego: Blood; 2011:118;1593.
- Lorsbach RB, Shay-Seymore D, Moore J, et al. Clinicopathologic analysis of follicular lymphoma occurring in children. *Blood*. 2002;99:1959-1964.
- Louissaint A, Jr., Ackerman AM, Dias-Santagata D, et al. Pediatric-type nodal follicular lymphoma: an indolent clonal proliferation in children and adults with high proliferation index and no BCL2 rearrangement. *Blood*. 2012;120:2395-2404.

- Lu D, Medeiros LJ, Eskenazi AE, et al. Primary follicular large cell lymphoma of the testis in a child. *Arch Pathol Lab Med*. 2001;125:551-554.
- Moller MB, Nielsen O, Pedersen NT. Frequent alteration of MDM2 and p53 in the molecular progression of recurring non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology*. 2002;41:322-330.
- Montoto S, Davies AJ, Matthews J, et al. Risk and clinical implications of transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2007;25:2426-2433.
- Montoto S, Lopez-Guillermo A, Colomer D, et al. Incidence and clinical significance of bcl-2/IgH rearrangements in follicular lymphoma. *Leukemia lymphoma*. 2003;44:71-76.
- Natkunam Y. The biology of the germinal center. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007:210-215.
- Olteanu H, Fenske TS, Harrington AM, et al. CD23 expression in follicular lymphoma: clinicopathologic correlations. *Am J Clin Pathol*. 2011;135:46-53.
- Oschlies I, Salaverria I, Mahn F, et al. Pediatric follicular lymphoma--a clinico-pathological study of a population-based series of patients treated within the Non-Hodgkin's Lymphoma--Berlin-Frankfurt-Munster (NHL-BFM) multicenter trials. *Haematologica*. 2010;95:253-259.
- Pagnano KB, Vassallo J, Lorand-Metze I, et al. p53, Mdm2, and c-Myc overexpression is associated with a poor prognosis in aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Hematol*. 2001;67:84-92.

- Piccaluga PP, Sapienza MR, Agostinelli C, et al. Biology and treatment of follicular lymphoma. *Expert review of hematology*. 2009;2:533-547.
- Pileri SA, Sabattini E, Rosito P, et al. Primary follicular lymphoma of the testis in childhood: an entity with peculiar clinical and molecular characteristics. *J Clin Pathol*. 2002;55:684-688.
- Relander T, Johnson NA, Farinha P, et al. Prognostic factors in follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2010;28:2902-2913.
- Ross CW, Ouillet PD, Saddler CM, et al. Comprehensive analysis of copy number and allele status identifies multiple chromosome defects underlying follicular lymphoma pathogenesis. *Clin Cancer Res*. 2007;13:4777-4785.
- Saldanha AJ. Java Treeview--extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics*. 2004;20:3246-3248.
- Solal-Celigny P, Cahu X, Cartron G. Follicular lymphoma prognostic factors in the modern era: what is clinically meaningful? *Int J Hematol*. 2010;92:246-254.
- Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P, et al. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood*. 2004;104:1258-1265.
- Stamatopoulos K, Kosmas C, Belessi C, et al. Molecular insights into the immunopathogenesis of follicular lymphoma. *Immunol Today*. 2000;21:298-305.
- Summerfield GP, Wood KM, Taylor PR, et al. Survival in young patients (less than 40 years) with follicular lymphoma: a population based study by the

- Scotland and Newcastle Lymphoma Group. *Leukemia lymphoma*. 2004;45:1149-1157.
- Thorns C, Kalies K, Fischer U, et al. Significant high expression of CD23 in follicular lymphoma of the inguinal region. *Histopathology*. 2007;50:716-719.
- Vaandrager JW, Schuuring E, Raap T, et al. Interphase FISH detection of BCL2 rearrangement in follicular lymphoma using breakpoint-flanking probes. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000;27:85-94.
- Viardot A, Barth TF, Moller P, et al. Cytogenetic evolution of follicular lymphoma. *Semin Cancer Biol*. 2003;13:183-190.
- Wahlin BE, Yri OE, Kimby E, et al. Clinical significance of the WHO grades of follicular lymphoma in a population-based cohort of 505 patients with long follow-up times. *Br J Haematol*. 2012;156:225-233.
- Warnke RA, Kim H, Fuks Z, et al. The coexistence of nodular and diffuse patterns in nodular non-Hodgkin's lymphomas: significance and clinicopathologic correlation. *Cancer*. 1977;40:1229-1233.
- Winberg CD, Nathwani BN, Bearman RM, et al. Follicular (nodular) lymphoma during the first two decades of life: a clinicopathologic study of 12 patients. *Cancer*. 1981;48:2223-2235.
- Wood BL, Bacchi M, Bacchi CE, et al. Immunocytochemical differentiation of reactive hyperplasia from follicular lymphoma using monoclonal antibodies to cell surface and proliferation-related markers. *Applied Immunohistochemistry* 1994;2:48-53.

- Wright DH, Isaacson P. Follicular center cell lymphoma of childhood: a report of three cases and a discussion of its relationship to Burkitt's lymphoma. *Cancer*. 1981;47:915-925.
- Yamamoto S, Nakase H, Yamashita K, et al. Gastrointestinal follicular lymphoma: review of the literature. *J Gastroenterol*. 2010;45:370-388.
- Younes SF, Beck AH, Lossos IS, et al. Immunoarchitectural patterns in follicular lymphoma: efficacy of HGAL and LMO2 in the detection of the interfollicular and diffuse components. *Am J Surg Pathol*. 2010;34:1266-1276.
- Yunis JJ, Frizzera G, Oken MM, et al. Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma. A possible model for cancer. *N Engl J Med*. 1987;316:79-84.

APÊNDICES

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 19.05.10, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº **110/10** intitulado: "CARACTERIZAÇÃO ANÁTOMO-CLÍNICA DO LINFOMA FOLICULAR EM PACIENTES ATÉ 40 ANOS" apresentado pelo Departamento de Patologia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa .

Pesquisador (a) Responsável: Carlos Eduardo Bacchi

Pesquisador (a) Executante: Íverson Xavier Duarte

CEP-FMUSP, 19 de maio de 2010

Prof. Dr. Eduardo Massad
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Modelo da carta enviada aos médicos assistentes e serviços que referenciaram os pacientes, solicitando as informações clínicas:

Estamos desenvolvendo um estudo sobre linfoma folicular em pacientes muito jovens (<40 anos). Gostaríamos, portanto, do seu apoio na obtenção de dados clínicos do paciente abaixo:

Paciente:
Sua referência:

CLÍNICA (À época do diagnóstico):
Sintomas B? () sim () não
Se sim, qual(is)? _____
Estadiamento: _____
LDH: _____ (valor de referência: _____)
Hb: _____
RX ou TC de tórax? () sim () não
USG ou TC de abdomen? () sim () não
Medula óssea comprometida? () sim () não () não avaliada
HIV? () sim () não
Outra imunossupressão? () sim () não. Se sim, qual? _____

TRATAMENTO:
Quimioterapia? () sim () não
Número de ciclos: _____
Esquemas usados: _____
Remissão (duração): _____
Tranplante? () sim () não
Radioterapia? () sim () não
Recidiva? () sim () não. Se sim, após quanto tempo? _____
Evoluiu para o óbito? () sim () não. Se sim, quando? _____

Agradecemos desde já sua colaboração e apreciáramos enormemente se enviasse, caso possível, as informações clínicas acima. Estas informações podem ser repassadas pelo fax (14) 3112-5920 ou pelo e-mail ivison@conspat.com.br.

Cordialmente,

Dr. Carlos E. Bacchi
Dr. Íverson X. Duarte

Follicular lymphoma in young adults: a clinicopathological and molecular study of 200 patients

Íverson X Duarte^{1,2}, Pollyanna Domeny-Duarte¹, Sheila CL Wludarski¹, Yasodha Natkunam³ and Carlos E Bacchi^{1,2}

¹Laboratório Bacchi/Consultoria em Patologia, Botucatu, Brazil; ²Department of Pathology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil and ³Department of Pathology, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA

Follicular lymphoma is clinically heterogenous, and therefore necessitates the identification of prognostic markers to stratify risk groups and optimize clinical management. It is relatively rare in patients younger than 40 years, and the clinicopathologic characteristics and biological behavior in this age group are poorly understood. In the current study, samples from a cohort of 200 patients between 19 and 40 years were evaluated retrospectively with respect to clinical, histologic, and genetic features. These were then correlated with clinical outcome. The median age at presentation was 35 years with a slight female preponderance (56%). Most of the cases are presented with nodal disease (90%). Concomitant follicular lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma were observed in 7 (4%) patients. Immunohistologic studies showed the expression of CD10 (91%), BCL6 (97%), BCL2 (95%), MUM1/IRF4 (12%), MDM2 (17%), and CD23 (25%). *BCL2* rearrangement was present in 74%, and *BCL6* in 20%. The estimated overall survival of patients was 13 years (mean). The presence of anemia, elevated lactate dehydrogenase, bone marrow involvement, and high-risk follicular lymphoma international prognostic index correlated with adverse overall survival. Our findings revealed that follicular lymphoma in young adults demonstrate similarities with that of older adults, including the frequency of presentation at various anatomic sites, grade, and adverse prognostic factors.

Modern Pathology advance online publication, 19 April 2013; doi:10.1038/modpathol.2013.50

Keywords: follicular lymphoma; immunohistochemistry; indolent lymphoma; non-Hodgkin lymphoma; survival; young adults

Follicular lymphoma is characterized by a nodular growth pattern and the t(14;18) translocation, which results in the overexpression of the anti-apoptotic protein, BCL2.^{1,2} It is the commonest form of indolent B-cell lymphoma, and is clinically manifested with multiple relapses and remissions. The median age at diagnosis is about 60 years and there is a slight female predominance.³ Despite recent improvements in survival, follicular lymphoma remains an incurable disease, with a median overall survival of ~14 years.⁴ This clinical outcome is significantly worse than that in a matched cohort of the general population, especially in younger age groups. Although a subset of patients

remain alive for decades without treatment,⁵ ~15% of them succumb to the disease within 2 years of initial diagnosis, whereas others develop progressive disease or transform to a higher-grade lymphoma.⁶ Even among patients who demonstrate an indolent disease course, many show an advanced stage at diagnosis (III or IV) with the involvement of multiple lymph node sites, as well as the bone marrow at presentation.⁷

Follicular lymphoma is rare under the age of 18 years and accounts for 1–2.5% of lymphomas occurring in that age group. It is typically localized, demonstrates specific clinical, morphologic, immunohistochemical, and genetic features, and confers a more favorable clinical outcome than its adult counterpart.^{8,9} In contrast, the biologic behavior of follicular lymphoma in young adults, defined as 18–40 years of age, has not been well-studied. Follicular lymphoma in this age group represents 15–20% of all lymphoma diagnoses.¹⁰ A population-based study of 46 young adults reported improved

Correspondence: Dr CE Bacchi, MD, PhD, Laboratório Bacchi/Consultoria em Patologia, Rua Major Leônidas Cardoso 739, Botucatu 18602-010, Brazil.

E-mail: bacchi@conspat.com.br

Received 10 December 2012; revised 27 January 2013; accepted 27 January 2013; published online 19 April 2013

overall survival compared with adult follicular lymphoma; however, that study was conducted in the pre-rituximab era.¹¹

Recent advances in therapeutic modalities such as the proteasome inhibitor bortezomib, bendamustine, and the fully humanized anti-CD20 antibody,^{4,12} in addition to hematopoietic stem cell transplantation, have shown improved efficacy in the treatment of lymphomas. Additionally, most studies show that about 20% of patients never relapse or die from the disease, for example, one study in the pre-rituximab era showed no recurrence of disease in a cohort of patients who were followed for 20 years.⁵ These studies have illustrated that the biological behavior of follicular lymphoma is markedly heterogeneous. Consequently, more precise information on prognostication as well as identification of predictive markers of response is necessary to achieve the goal of individualized risk-adapted therapy. We therefore sought to investigate a series of 200 patients between the ages of 19 and 40 years, who were diagnosed with follicular lymphoma, to better understand its clinicopathological, immunophenotypic, and molecular features.

Materials and methods

Case Selection

All cases were obtained from the files of a single institution, *Consultoria em Patologia*, a large reference anatomic pathology laboratory located in São Paulo State, Brazil. This study was based on a review of 2600 cases previously diagnosed as follicular lymphoma between the years 1997 and 2011. Inclusion criteria were as follows: (1) fulfilled histologic and immunophenotypic criteria for the diagnosis of follicular lymphoma; (2) age between 19 and 40 years; and (3) non cutaneous involvement. Two hundred patients fulfilled these criteria. Adequate follow-up and/or survival information was available in 121 patients. Clinical information was recorded for each patient and included age, gender, date of initial diagnosis, symptoms and signs at presentation, clinical and/or pathological stage, and pertinent data related to treatment. As virtually all cases were received in consultation from outside institutions, clinical data were obtained from the primary physicians at the referring institutions. Patients were staged according to the Ann Arbor system, and the Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) was calculated. Systemic symptoms were regarded as present when the patient had unexplained fever, night sweats, or weight loss of >10% of initial body weight. Treatment information included type of therapy (radiation therapy, chemotherapy, combined therapy, or no therapy), response to therapy (complete remission, partial remission, or no remission); the duration of the initial response, the

patient's survival status (dead or alive, with or without evidence of lymphoma), and the survival time was assessed in months. This study had the approval of the Ethics Committee of the University of São Paulo (protocol 110/10, 05.19.2010).

Tissue Microarray Construction

Paraffin blocks of 159 cases were available and used for tissue microarray construction with the aid of a tissue arrayer (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA). One tumor core of 2.0 mm taken from the original paraffin blocks represented each case. Serial sections of 3 µm were cut from the tissue array blocks, and used for immunohistochemical and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analyses. In the remaining cases, the original slides with whole histological sections were available and used for analysis.

Histologic Evaluation

The histologic sections of all cases were stained by hematoxylin and eosin, and were reviewed, with all the diagnoses confirmed and graded by two of the authors (CEB and IXD) according to the criteria described by the 2008-WHO classification of hematopoietic diseases.⁷ Particular morphologic features were evaluated, such as: (a) presence or absence of mantle zones; (b) semi-quantification of the number of tumor-associated macrophages imparting a starry-sky appearance (0, no macrophage; 1+, 1–5 macrophages per high-power field (HPF); 2+, 6–15 macrophages/HPF; 3+, >15 macrophages/HPF); (c) estimation of fibrosis (0, 1+, 2+, and 3+ in 3+); and (d) presence or absence of diffuse areas.

Immunohistologic Studies

Immunohistologic studies were performed on cut sections of the tissue microarray paraffin blocks using the Novolink polymer (Novocastra, Newcastle Upon Tyne, UK), as the detection system and an epitope-retrieval method was applied as needed for each specific antibody; diaminobenzidine (DAB) was the chromogen. Information on antibodies used and their dilutions are summarized in Table 1. In the evaluation of the following immunohistochemistry markers, the results were considered as either positive or negative in the tumor cells: CD3, CD10, CD20, CD23, BCL2, BCL6, kappa and lambda immunoglobulin light chains, and MUM1/IRF4. The Ki-67 proliferative index was evaluated using the monoclonal MIB-1 antibody and assigned a percentage value that was calculated by scoring 500 tumor cell nuclei: the cases were divided into groups of <50 and ≥50% staining according to Ki-67 immunostaining. For MDM2 expression, the cutoff used was <20 and ≥20% of positive

Table 1 Specifications of primary antibodies, source, epitope retrieval, and criteria for the cutoff

Antigen	Clone	Dilution	Source	Epitope retrieval	Cutoff
CD23	SP23	1:200	Neomarkers	M.POL	Any
CD20	L26	1:1200	DAKO	MM.ABC	Any
CD10	56C6	1:200	Novocastra	S.POL	Any
CD3	565	1:800	Novocastra	MM.ABC	Any
BCL2	124	1:2000	DAKO	MM.ABC	Any
BCL6	564	1:2400	Novocastra	S.POL	Any
Ki-67	MIB-1	1:4800	DAKO	S.POL	≥50%
kappa	A8B5	1:200	DAKO	MM.ABC	Any
lambda	N10/2	1:400	Neomarkers	S.POL	Any
MDM2	IF2	1:2400	Zymed	S.POL	≥20%
MUM1/IRF4	MUM1P	1:1200	DAKO	S.POL	Any

Abbreviations: FL, MM.ABC: microwave, mouse avidin biotin complex; M.POL: microwave, polymer; S.POL: steamer, polymer. DAKO (Carpinteria, CA, USA); Neomarkers/Lab Vision (Fremont, CA, USA); Novocastra (Newcastle, UK); Zymed (San Francisco, CA, USA).

neoplastic cells. Additionally, CD23 was also used to visualize the follicular dendritic cells meshwork, and its immunostaining pattern was classified as 'preserved', 'disrupted', or 'absent'.

FISH

FISH analysis was performed using a 3- μ m-thick TMA section, according to the standard procedures. LSI BCL2 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe (Vysis, Downers Grove, IL, USA) was used to detect BCL2 rearrangement. LSI BCL6 Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (Vysis) was used to detect different translocations involving the BCL6 gene. DAPI (Vysis) was used for nuclear counterstaining. The slides were evaluated using spectrum orange- and spectrum green filters (Chroma Technology GmbH, Fuerstentfeldbruck, Germany) on a Zeiss Axio Imager M1 fluorescence microscope (Carl Zeiss AG, Germany) using the assistance of Metafer 4 Imaging Software (Metasystems, Altlussheim, Germany). A positive case was defined when the mean number of positive tiles detected was 3 s.d.'s above the mean of a negative control (reactive lymphoid tissue). The threshold established was 1.8% for BCL2 and 2.2% for BCL6 (the mean of the negative control group was 0.65 ± 0.38 and $0.75 \pm 0.48\%$, respectively).

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using the software IBM SPSS Statistics version 19. For all the variables evaluated, frequency distributions were defined. Life tables were produced for all variables. The Kaplan–Meier technique was applied based on these life tables to evaluate the influence of variables on the survival time. The Breslow statistic was used

Follicular lymphoma in young adults

IX Duarte *et al*

3

for comparative tests of survival curves. Average survival times were estimated whenever possible on the basis of this technique. Confidence intervals for average survival times were obtained with 95% confidence coefficient. To estimate the statistical odds ratio, we employed the logistic regression technique. The significance level for all tests was fixed at 0.05, and for all tests, the descriptive level (p) was calculated to observed statistics. Overall survival was calculated from the date of diagnosis to that of death or last follow-up.^{13,14}

Hierarchical Clustering

Unsupervised hierarchical clustering of the cases based on clinicopathologic variables was performed using Cluster 3.0¹⁵ and visualized using Java TreeView.¹⁶

Results

Clinical Features

Age and anatomic location. Of the 2600 patients of all ages who were diagnosed at our institution as having follicular lymphoma in a 14-year period (1997–2011), 200 (8%) patients were in the age group between 19 and 40 years. Eighty-seven patients were men (44%) and 113 women (56%). The median age was 35 years. Twenty cases (10%) presented with extranodal and 180 (90%) with nodal disease. The most common nodal anatomic site was the cervical lymph nodes (30%), followed by the inguinal lymph nodes (19%). The tonsil was the most frequent extranodal location. There was no statistical difference with respect to survival in relation to anatomic site of involvement by follicular lymphoma (Figure 1a).

Follow-up and survival. Information on survival was complete in 121 cases. One hundred and three patients were alive, and 18 were dead. One patient died of an unrelated cause. The estimation of overall survival in all patients was 13.4 ± 0.8 years. There was no difference in overall survival between patients ≤ 30 years compared with 31–40 years. However, life expectancy was reduced significantly to 5.8 ± 1.4 years in subjects with hemoglobin < 12 g/dl ($n = 72$; $P < 0.05$; Figure 1b). Elevated serum lactate dehydrogenase and bone marrow involvement also negatively had an impact on survival, which was diminished to 7.4 ± 1.6 ($n = 70$; $P < 0.05$) and 8.3 ± 1.1 years ($n = 75$; $P < 0.05$), respectively (Figures 1c and d). In the evaluation of these three variables in terms of life status, it was observed that the odds ratio was 24.0, 11.8, and 18.4 ($P < 0.05$), respectively. Poor risk FLIPI (≥ 3) was associated with reduced survival of 6.3 ± 1.8 years ($n = 73$; $P < 0.05$; Figure 1e) with an odds ratio of 11. The Ann Arbor stage did not have a

Figure 1 (a) Kaplan–Meier overall survival curve in the set of 126 patients selected according to anatomic site. (b) Kaplan–Meier overall survival curve in the set of 72 patients selected according to hemoglobin concentration. (c) Kaplan–Meier overall survival curve in the set of 70 patients selected according to lactate dehydrogenase. (d) Kaplan–Meier overall survival curve in the set of 75 patients selected according to bone marrow involvement. (e) Kaplan–Meier overall survival curve in the set of 78 patients selected according to FLIPI. (f) Kaplan–Meier overall survival curve in the set of 121 patients selected according to histological grading.

significant impact on life status, although the *P*-value supports a strong trend towards decreased survival for patients with stage IV disease.

Detailed information on treatment was obtained in 79 cases. Most patients were treated on a cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone-based chemotherapy regimen (CHOP); 46 patients also received rituximab. Involved-field irradiation was used in 23 patients (Table 2); in 2 of these patients, radiotherapy was the only treatment modality used. Two patients were followed without any treatment. Forty-nine patients achieved

complete clinical remission (62%), and 30 developed recurrence (38%).

Histological and immunohistochemistry findings. Histologically, all 200 cases had a predominant nodular growth pattern (Figure 2a). In 37 cases (19%), there were closely packed neoplastic follicles, and in 45 cases (23%), an extensive interfollicular neoplastic infiltrate was present. Most of the cases had the typical attenuated or lack of mantle zones, but 32 cases (16%) had at least focally well-formed mantle zones. Diffuse areas,

Follicular lymphoma in young adults

IX Duarte *et al*

5

Table 2 Clinical information and anatomical site distribution on 200 cases of follicular lymphoma in young patients

	<i>Extranodal FL</i>	<i>Nodal FL</i>	<i>Nodal FL+ DLBCL</i>	<i>Total</i>
Total (%(cases))	10(20)	83(173)	4(7)	200
<i>Age (years)</i>				
Median	35	35	35	35
Range	23–40	19–40	22–39	19–40
<i>M:F</i>	9:11	75:98	3:4	87:113
<i>Anatomic sites</i>	Tonsil (5)	Abdominal (9)	Cervical (3)	—
	Duodenum (2)	Axillary (18)	Axillary (1)	—
	Stomach (1)	Cervical (63)	Retroperitoneal (1)	—
	Salivary gland (3)	Supraclavicular (7)	Mesenteric (1)	—
	Justa-ureteral (1)	Inguinal (40)	Not specified (1)	—
	Breast (1)	Mediastinal (1)		—
	Bone (2)	Mesenteric (6)		—
	Peritoneum (1)	Retroperitoneal (7)		—
	Lung (2)	Not specified (22)		—
	Thyroid (2)			—
<i>Clinical data (%(+))</i>				
None	40(8)	40(70)	14(1)	40(79)
Complete	45(9)	38(66)	62(5)	40(80)
Only survival data	15(3)	22(37)	14(1)	20(41)
<i>Stage (%(+ /tested))</i>				
I	55(5/9)	14(10/71)	20(1/5)	19(16/85)
II	0	17(12/71)	20(1/5)	15(13/85)
III	0	28(20/71)	20(1/5)	25(21/85)
IV	45(4/9)	41(29/71)	40(2/5)	41(35/85)
B symptoms	22(2/9)	39(27/70)	60(3/5)	38(32/84)
Elevated LDH level	12(1/8)	12(7/58)	0/4	11(8/70)
Anemia (HB <12 g/dl)	0(0/8)	17(10/60)	0/4	14(10/72)
Bone marrow involvement	11(1/9)	39(24/62)	0/4	33(25/75)
<i>FLIPI score</i>				
Low risk (0–1)	100(8/8)	53(31/58)	50(2/4)	59(41/70)
Intermediate (2)	0	33(19/58)	50(2/4)	30(21/70)
Poor risk (3–4)	0	14(8/58)	0	11(8/70)
<i>Chemotherapy</i>				
CHOP + rituximab	7	63	5	75
CVP + rituximab	5	36	3	44
CHOP	—	2	—	2
CVP	2	18	2	22
Fludarabin	—	1	—	1
MINE	—	3	—	3
ProMACE-CytaBOM	—	1	—	1
ProMACE-CytaBOM	—	2	—	2
<i>Watch and wait</i>	—	2	—	2
<i>Radiation therapy</i>	4	18	1	23
Plus chemotherapy	3	17	1	21
Radiation alone	1	1	—	2

Abbreviations: CHOP (Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine and Prednisolone); CVP (Cyclophosphamide, Vincristine and Prednisolone); CytaBOM (cytarabine/bleomycin/vincristine/methotrexate) DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma; FL: follicular lymphoma; FLIPI: follicular lymphoma international prognostic index; Hb: hemoglobin; LDH: lactate dehydrogenase; MINE (mesna, ifosfamide, mitoxantrone, and etoposide); ProMACE (prednisone/methotrexate/doxorubicin/cyclophosphamide/etoposide).

defined as sheets of neoplastic cells in the absence of a nodular pattern, as assessed by CD23 immunostaining, were present in 25 (12%) of the nodal follicular lymphoma. One case corresponded to the 'floral' variant of follicular lymphoma. Prominent fibrosis, follicular and/or interfollicular, was a feature seen in 17 cases (9%; Figure 2b). In all cases, neoplastic follicles were composed of a variable proportion of centrocytes and centroblasts.

Grading according to WHO criteria was distributed as follows: grade 1 ($n = 90$; 45%); grade 2 ($n = 63$; 32%); grade 3A ($n = 33$; 16%); and grade 3B ($n = 14$; 7%). Only grade 3B was related to worse overall survival (Figure 1f). Although all specimens were obtained at initial diagnosis before the institution of any treatment, a simultaneous diffuse large B-cell lymphoma component was noted in 7 cases (4%). In 5 cases, there were eosinophilic cytoplasmic

Figure 2 (a) Follicular lymphoma (Hematoxylin and Eosin). (b) follicular lymphoma with score 3 + fibrosis (Hematoxylin and Eosin). (c) CD23 expression in neoplastic cells. (d) MUM1/IRF4-positive case. (e) and (f) FISH for *BCL2* and *BCL6* rearrangements, respectively.

inclusions resulting from abnormal intracellular accumulation of immunoglobulin that were PAS-positive: two of these cases displayed monotypic expression for immunoglobulin light chain kappa or lambda by immunohistochemistry. In one case, these inclusions were so prominent that the lymphoma cells revealed 'signet ring' appearance.

A subset of the follicular lymphoma cases revealed admixed tingible-body macrophages, imparting a 'starry-sky' appearance to the neoplasm. These tumor-associated macrophages were found in 23 cases. In 10 (5%) cases, there were more than five

macrophages/HPF, which correlated with worse overall survival. The life expectancy was reduced significantly from 14 ± 0.7 to 7.6 ± 2.0 years in these cases ($P < 0.05$; Figure 3a). There was no statistically significant relationship between survival and the presence of diffuse areas, well-formed mantle zones, or fibrosis. Bone marrow involvement was observed in 33% of the cases (25 out of 75 cases).

A summary of the immunophenotyping results are shown in Table 3. In all cases, the neoplastic cells were positive for CD20 with no expression of CD3, confirming a B-cell phenotype. One hundred

Figure 3 (a) Kaplan–Meier overall survival curve in the set of 121 patients selected according to starry-sky appearance. (b) Kaplan–Meier overall survival curve in the set of 102 patients selected according to MDM2. (c) Kaplan–Meier overall survival curve in the set of 119 patients selected according to Ki-67 index. (d) Kaplan–Meier overall survival curve in the set of 68 patients selected according to *BCL2* rearrangement. (e) Kaplan–Meier overall survival curve in the set of 64 patients selected according to *BCL6* rearrangement. (f) Kaplan–Meier overall survival curve in the set of 56 patients selected according to *BCL2/BCL6* rearrangement.

Table 3 Pathologic information on 200 cases of follicular lymphoma in young patients according to anatomic locations and age subgroups

	Extranodal FL	Nodal FL (age groups)					Nodal FL+ DLBCL	Total
		≤ 25	26–30	31–35	36–40	Total		
Total	20	11	18	59	85	173	7	200
<i>Grade (%(+))</i>								
1	55 (11)	55 (6)	39 (7)	46 (27)	46 (39)	46 (79)	0	45 (90)
2	25 (5)	18 (2)	44 (8)	37 (22)	29 (25)	33 (57)	14 (1)	32 (63)
3a	10 (2)	9 (1)	11 (2)	15 (9)	20 (17)	17 (29)	29 (2)	16 (33)
3b	10 (2)	18 (2)	6 (1)	2 (1)	5 (4)	4 (8)	57 (4)	7 (14)
<i>Histological findings (%(+))</i>								
<i>Fibrosis</i>								
1+	0	0	17 (3)	7 (4)	11 (9)	9 (16)	0	8 (16)
2+	5 (1)	0	11 (2)	7 (4)	6 (5)	6 (11)	29 (2)	7 (14)
3+	5 (1)	0	6 (1)	3 (2)	0	2 (3)	14 (1)	2 (5)
Mantle zone	15 (3)	0	22 (4)	20 (12)	14 (12)	16 (28)	14 (1)	16 (32)
Diffuse areas	10 (2)	18 (2)	11 (2)	8 (5)	8 (7)	9 (16)	100 (7)	12 (25)
<i>TAM</i>								
1+	0	0	17 (3)	7 (4)	7 (6)	7 (13)	0	6 (13)
2+	5 (1)	9 (1)	0	2 (1)	8 (7)	5 (8)	0	4 (9)
3+	0	9 (1)	0	0	1 (1)	1 (2)	0	1 (2)
<i>FDC meshwork (%(+ /tested))</i>								
Preserved	14 (2/14)	20 (2/10)	43 (6/14)	44 (24/54)	53 (34/64)	41 (66/162)	33 (2/6)	43 (70/162)
Disrupted	21 (3/14)	40 (4/10)	29 (4/14)	33 (18/54)	30 (19/64)	29 (45/162)	17 (1/6)	30 (49/162)
Absent	64 (9/14)	40 (4/10)	29 (4/14)	22 (12/54)	17 (11/64)	19 (31/162)	50 (3/6)	27 (43/162)
<i>Immunophenotype (%(+ /tested))</i>								
CD10	89 (16/18)	91 (10/11)	86 (12/14)	95 (54/57)	89 (70/79)	91 (146/161)	71 (5/7)	91 (167/184)
MUM1	7 (1/15)	40 (4/10)	15 (2/13)	2 (1/50)	11 (7/62)	10 (14/135)	50 (3/6)	12 (18/156)
BCL6	100 (17/17)	100 (11/11)	100 (16/16)	100 (55/55)	92 (69/75)	96 (151/157)	100 (7/7)	97 (175/181)
BCL2	94 (17/18)	73 (8/11)	94 (17/18)	98 (58/59)	96 (82/85)	95 (165/173)	100 (7/7)	95 (189/198)
CD23	36 (5/14)	20 (2/10)	21 (3/14)	28 (15/54)	20 (13/64)	28 (33/142)	33 (2/6)	25 (40/162)
MDM2 (≥ 20%)	13 (2/15)	30 (3/10)	23 (3/13)	10 (5/50)	10 (6/62)	15 (20/135)	67 (4/6)	17 (26/156)
Ki-67 (≥ 50%)	15 (3/20)	40 (4/10)	11 (2/18)	24 (14/59)	26 (21/82)	24 (41/169)	100 (7/7)	26 (51/196)
<i>FISH rearrangement (%(+ /conclusive))</i>								
<i>BCL2</i>	82 (9/11)	50 (4/8)	82 (9/11)	87 (28/32)	70 (33/47)	75 (74/98)	0 (0/3)	74 (83/112)
<i>BCL6</i>	0 (0/10)	33 (2/6)	12 (1/8)	16 (5/31)	24 (11/46)	21 (19/91)	50 (2/4)	20 (21/105)

Abbreviations: DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma; FDC: follicular dendritic cells; FISH: fluorescence *in situ* hybridization; FL: follicular lymphoma; TAM: tumor-associated macrophages.

and eighty-nine cases were positive for BCL2 ($n=198$; 95%); 167 expressed CD10 ($n=184$; 91%); and 175 cases were positive for BCL6 ($n=181$; 97%). Eighteen cases were positive for MUM1/IRF4 ($n=156$; 12%). CD23 was positive in tumor cells in 40 cases ($n=162$; 25%; Figure 2c). In 35 cases, it was possible to demonstrate monoclonal immunoglobulin kappa or lambda light chain expression.

Overall survival was worse in the 26 cases of follicular lymphoma ($n=156$; 17%), where > 20% of cells were positive for MDM2 (13.1 ± 1.2 – 7.7 ± 1.1 years; $P<0.05$; Figure 3b). MUM1/IRF4-positive cases (Figure 2d) also showed a trend towards decreased overall survival, but the small number of cases did not permit statistical confirmation of this association. No difference in outcome was noted with different levels of expression of BCL2, BCL6, and CD10, expression of CD23, or the amount of

follicular dendritic cells present in the neoplastic nodules as assessed by CD23 immunostains. A Ki-67 index $\geq 50\%$ had a negative impact on survival when compared with Ki-67 index $< 50\%$ (14.1 ± 0.7 – 9.9 ± 1.4 years; $P<0.05$; Figure 3c).

Fluorescence in situ hybridization. Interphase FISH for *BCL2* and *BCL6* was performed in 158 cases. *BCL2* was conclusive in 112 cases for *BCL2* rearrangement with positive results in 83 cases (74%; Figure 2e). *BCL6* rearrangement was observed in 21 cases ($n=105$; 20%; Figure 2f). In 31 patients, it was not possible to determine either *BCL2* or *BCL6* translocations. Overall survival was worse in cases of follicular lymphoma with an absence of *BCL2* rearrangement (12.9 ± 1.4 – 7.9 ± 1.0 years; $P<0.05$; Figure 3d) and the presence of *BCL6* rearrangement (13.4 ± 1.4 – 6.4 ± 1.1 years; $P<0.05$; Figure 3e). In 97 cases, FISH analysis was evaluated for both *BCL2*

Follicular lymphoma in young adults

IX Duarte *et al*

9

Table 4 FISH results for *BCL2* and *BCL6* in 94 cases of follicular lymphoma in younger adults; correlation with clinical and pathological features

<i>FISH rearrangement:</i>	<i>BCL2-/BCL6-</i>	<i>BCL2-/BCL6+</i>	<i>BCL2+/BCL6-</i>	<i>BCL2+/BCL6+</i>
<i>Clinical features (%(+ /tested))</i>				
Gender: male	50 (9/18)	27 (3/11)	41 (24/59)	22 (2/9)
Age ≤30	22 (4/18)	18 (2/11)	17 (10/59)	22 (2/9)
FLIPI ≥3	33 (1/3)	50 (3/6)	35 (8/23)	50 (2/4)
B symptoms	50 (2/4)	57 (4/7)	26 (6/23)	50 (2/4)
Ann Arbor stage III–IV	50 (2/4)	43 (3/7)	52 (13/25)	100 (4/4)
Bone marrow involvement	0/3	20 (1/5)	22 (5/23)	75 (3/4)
Elevated LDH level	0/3	20 (1/5)	10 (2/20)	50 (1/2)
Anemia	25 (1/4)	60 (3/5)	19 (4/21)	0/2
<i>Histological and immunohistochemical features (%(+))</i>				
	n = 18	n = 11	n = 59	n = 9
Fibrosis	6 (1)	9 (1)	8 (5)	0
Persistence of mantle zone	0	9 (1)	19 (11)	22 (2)
Starry-sky appearance	17 (3)	0	2 (1)	11 (1)
Presence of diffuse area	50 (9)	27 (3)	3 (2)	0
Grade 3 staging	67 (12)	45 (5)	17 (10)	11 (1)
<i>BCL2</i> staining-positive cases	94 (17)	91 (10)	97 (57)	100 (9)
<i>BCL6</i> staining-positive cases	100 (18)	91 (10)	100 (59)	100 (9)
CD10-positive cases	61 (11)	36 (4)	93 (55)	100 (9)
MUM1/IRF4-positive cases	56 (10)	55 (6)	2 (1)	0
CD23-positive cases	17 (3)	9 (1)	36 (21)	33 (3)
MDM2 ≥20%	39 (7)	45 (5)	10 (6)	0
Ki-67 index ≥50%	61 (11)	45 (5)	25 (15)	11 (1)

Abbreviations: FISH: fluorescence *in situ* hybridization; FLIPI: follicular lymphoma international prognostic index; LDH: lactate dehydrogenase.

and *BCL6*, and four groups were created according to the status of these translocations: *BCL2* – /*BCL6* – ($n = 18$; 19%), *BCL2* + /*BCL6* – ($n = 59$; 61%), *BCL2* – /*BCL6* + ($n = 11$; 11%), *BCL2* + /*BCL6* + ($n = 9$; 9%). Associations of these groups with clinical and histological features at diagnosis are summarized in Table 4. Figure 3f summarizes the survival among different groups according to *BCL2* and *BCL6* translocations. Subgroup *BCL2* + /*BCL6* – demonstrated the highest mean survival (13.7 ± 1.5), and the group *BCL2* – /*BCL6* + demonstrated the lowest mean survival (6.5 ± 2.0 ; $P < 0.05$).

Hierarchical clustering. Applying unsupervised hierarchical clustering using pathological and molecular variables, our cases of follicular lymphoma in young adults could be categorized into two groups with different characteristics (Figure 4). Group A represented mainly follicular lymphoma cases with positivity for CD10, *BCL6*, *BCL2*, and *BCL2* rearrangement, and absence of *BCL6* rearrangement. Group B was composed mostly of follicular lymphoma cases with higher grades, higher Ki-67 index, and expression of MDM2. Cases of group B also had a higher frequency of diffuse areas, presence of *BCL6* rearrangement, and absence of *BCL2* rearrangement. No difference in overall survival was observed between these two groups, although the *P*-value supports a trend towards worse survival in group B. Association of life expectancy with potential prognostic markers are showed in Table 5.

Discussion

Non-Hodgkin lymphomas in adolescents and young adults present biological and epidemiological peculiarities that if better understood could help optimize their outcome. Follicular lymphoma is exceedingly rare in those <15 years (1.5% of all non-Hodgkin lymphomas); its incidence increases with age and peaks between 55 and 59 years (25% of all non-Hodgkin lymphomas). Recently, follicular lymphoma occurring in children was characterized in detail.^{8,9} We undertook the current study on an extensive cohort of young adults between the ages of 19 and 40 years, because of the dearth of knowledge regarding the clinicopathologic features and the outcome in patients diagnosed with follicular lymphoma in that age group.

Most follicular lymphoma cases in patients <40 years are manifested in the older age subgroups within this population (35–39 years) and are more common in female population. Interestingly, follicular lymphoma is more common in male individual during childhood, and with increasing age, there is a gender shift to female predominance.¹⁰ Forty-nine percent of our cases were between 36 and 40 years of age, and 56% were female subjects.

Follicular lymphoma generally involves not only the lymph nodes, but also the spleen, peripheral blood, and Waldeyer's ring.¹ Bone marrow involvement is reported from 15 to almost 70%, depending on histologic grade. In our series, bone marrow was infiltrated in 33% of the cases, with higher frequency at grade 2 (44%). Follicular lymphoma

Figure 4 Unsupervised hierarchical clustering based on clinicopathologic variables of 94 cases of follicular lymphoma in young adults. The cases can be divided into groups A and B.

can also arise at other extranodal sites, that is, in the small intestine; some of these lymphomas may differ in their molecular properties and also in their clinical behavior from nodal and systemic counterparts.¹⁷ Three of our cases were intestinal follicular lymphoma—two in the duodenum and one in the stomach—all three achieved complete remission after treatment with no documented spread to other sites.

Lobetti-Bodoni *et al*¹⁸ studied 153 follicular lymphoma patients <40 years in comparison with 850 patients >40 years, and found that younger patients had longer overall survival and longer cause-specific survival. They also showed that younger subjects had lower elevation of lactate dehydrogenase and less frequent primary extranodal localization, but more frequent bone marrow involvement. In their series, bone marrow involvement was 57% in young adults, which was very different from the 33% found in our series. We could speculate that the low frequency of bone marrow involvement in our cases could be related to unilateral bone marrow biopsy performed in most of our patients. Elevated lactate dehydrogenase was observed in similar proportions in both series (14 vs 11%).

Follicular lymphoma is typically diagnosed in advanced stages, with only 26–33% of patients presenting stage I or II disease.² Summerfield *et al*,¹¹ studying 46 follicular lymphoma patients under 40 years of age, found that 74% were Ann Arbor stages III and IV. In our series, these stages corresponded to 66% (56 of the 85).

Several prognostic parameters have been identified in an effort to predict outcome in patients with follicular lymphoma, including FLIPI, which divides follicular lymphoma cases into three groups with distinct survival probabilities.¹⁹ In our series, we found significant differences between

low/intermediate (<3), and high-risk FLIPI groups (≥3) in terms of overall survival. Although currently the FLIPI 2 score is used,²⁰ we were unable to apply this type of score in our cases due to incomplete availability of some clinical and biological parameters, which were not routinely collected at the time of diagnosis. These included size of the largest tumor mass and serum β2-microglobulin level.

The prognostic significance of the follicular lymphoma microenvironment has been previously studied.²¹ Farinha *et al*²² suggested that a high number of tumor-associated macrophages (≥15 CD68+ macrophages/HPF) were correlated with a poor prognosis (5.0 years) in 12 of the 99 follicular lymphoma cases as opposed to 87 cases with <15 CD68+ macrophages/HPF (16.3 years). In this respect, we found more than five macrophages/HPF in 5% of our cases and this was also correlated with poorer overall survival compared with the group with ≤5 macrophages/HPF (7.6 vs 14 years, respectively). Tumor-induced fibrosis occurred in 10% of our cases; one-fourth of these presented in cervical lymph nodes. As other indolent lymphomas hardly ever show accompanying sclerosis, this feature is helpful for histopathologists in establishing the diagnosis.¹ It had no impact on overall survival in our hands, although a correlation of fibrosis with poor overall survival has been reported and was found to be independent of the FLIPI in advanced-stage follicular lymphoma.²³ Diffuse areas were found in 12% of our cases. In some of these cases, the use of CD23 was of help, confirming that the tumor cells were growing outside of the follicles. These areas were composed mainly of centrocytes with very few centroblasts, and lacked significant impact on overall survival. It is important to reinforce that diffuse areas formed predominantly by large

Follicular lymphoma in young adults

IX Duarte *et al*

11

Table 5 Association of life expectancy with potential prognostic markers in young patients with follicular lymphoma

	Estimated life expectancy		95% Confidence interval		P-value
	(years)	Deviation	Lower bound	Upper bound	
General	13.4	0.8	11.8	14.9	
<i>FLIPI</i>					
<3	12.2	0.7	10.8	13.6	0.001
≥3	6.3	1.8	2.7	10.0	
<i>LDH</i>					
Normal	13.1	0.5	12.1	14.1	0.001
Elevated	7.4	1.6	4.2	10.5	
<i>Anemia</i>					
No	13.5	0.3	12.8	14.1	0.001
Yes	5.8	1.4	3.1	8.6	
<i>BM involvement</i>					
No	13.7	0.3	13.1	14.2	0.003
Yes	8.3	1.1	6.2	10.4	
<i>Mantle zone</i>					
No	11.5	0.7	10.1	12.9	0.90
Yes	13.8	1.4	11.0	16.5	
<i>Diffuse areas</i>					
No	13.5	0.8	11.9	15.1	0.83
Yes	4.5	0.4	3.7	5.3	
<i>TAM</i>					
No and 1 +	14.0	0.7	12.6	15.4	0.04
2 + and 3 +	7.6	2.0	3.6	11.6	
<i>Fibrosis</i>					
No and 1 +	13.2	0.9	11.5	14.9	0.63
2 + and 3 +	9.7	0.9	7.8	11.5	
<i>CD10</i>					
—	9.1	0.9	7.4	10.8	0.43
+	13.7	0.8	12.1	15.3	
<i>BCL6</i>					
—	6.6	1.5	3.7	9.5	0.60
+	13.0	1.0	11.1	15.0	
<i>MUM1/IRF4</i>					
—	12.9	1.1	10.8	15.0	0.09
+	8.0	1.4	5.2	10.8	
<i>CD23</i>					
—	13.7	0.8	12.1	15.4	1.00
+	9.9	0.8	8.4	11.4	
<i>MDM2 (≥20%)</i>					
No	13.1	1.2	10.7	15.5	0.02
Yes	7.7	1.1	5.6	9.8	
<i>Ki-67 (≥50%)</i>					
No	14.1	0.7	12.7	15.6	0.03
Yes	9.9	1.4	7.0	12.7	
<i>BCL2 rearrangement</i>					
—	7.9	1.0	5.9	9.9	0.02
+	12.9	1.4	10.2	15.7	
<i>BCL6 rearrangement</i>					
—	13.4	1.4	10.6	16.2	0.01
+	6.4	1.1	4.2	8.7	

Table 5 (Continued)

	Estimated life expectancy		95% Confidence interval		P-value
	(years)	Deviation	Lower bound	Upper bound	
Follicular dendritic cells meshwork					
Absent	9.6	0.5	8.7	10.5	0.99
Disrupted	8.9	0.7	7.5	10.3	
Preserved	12.8	1.3	10.2	15.3	
Kappa/lambda restriction					
–	12.9	1.1	10.8	15.0	0.82
+	8.0	1.5	5.0	11.0	
CD10 vs MUM1					
+ / +	8.5	1.6	5.3	11.7	0.22
+ / –	13.5	0.9	11.7	15.3	
– / +	2.6	0.7	1.2	4.1	
– / –	10.0	0.2	9.7	10.4	
BCL2 vs BCL6 rearrangement					
+ / +	7.5	1.6	4.4	10.7	0.02
+ / –	13.7	1.5	10.8	16.7	
– / +	6.6	2.0	2.6	10.5	
– / –	7.6	0.8	6.1	9.1	

Abbreviations: BM: bone marrow; FLIPI: follicular lymphoma international prognostic index; LDH: lactate dehydrogenase; TAM: tumor-associated macrophages.

transformed cells would require a separate diagnosis of diffuse large B-cell lymphoma.

Transformation from follicular lymphoma into an aggressive lymphoma, usually diffuse large B-cell lymphoma, occurs at a rate of 3% per year.²⁴ Conconi *et al*²⁵ reported histologic transformation in 26% at 14 years in a series of 281 cases treated in Switzerland. In our series, we observed concomitance of diffuse large B-cell lymphoma with follicular lymphoma in 7 (4%) patients at the time of diagnosis. Four of these cases were grade 3B, 2 were grade 3A, and one was grade 2. Thus far, we have had no documented histologic transformation in the remaining cohort of cases.

With respect to grade, we found no significant difference between groups graded as 1, 2, and 3A in terms of overall survival. Only grade 3B cases showed significant worsening of overall survival. This is in accordance with a recent study by Wahlin *et al*,²⁶ who evaluated a population-based cohort of 505 follicular lymphoma patients in a broad age range (25–89 years) and found that grade 3A follicular lymphoma behaved like an indolent lymphoma. Others have confirmed similar findings.²⁷ Jaglowski *et al*,¹⁰ in a SEER review of follicular lymphoma in adolescents and young adults, cite that the relative frequency of low-grade follicular lymphoma increases with age due to the general trend of more aggressive lymphomas in the young population. In patients aged 15–24 years, grades 1 through 3 occur with approximately equal frequencies, whereas in the 35–39 age group, grade 1 represents ~55% of diagnoses, followed by grade 2 at 30% and grade 3 at 18%. In our series, the proportion of grade 1 follicular lymphoma by age

subgroups showed only a slight variation: it was higher (54%) in the younger age subgroup (≤25 years), diminished (41%) in the following age subgroup (26–30 years), and increased again in older age subgroups, 31–35 (44%) and 36–40 years (46%). This difference from previously reported series probably indicates that our cases are not related to the pediatric type of follicular lymphoma.

Follicular lymphoma cells typically express B-cell markers together with germinal center (GC) markers (CD10, BCL6, and HGAL). MUM1/IRF4, a post-GC B-cells marker, usually is not present in neoplastic cells of follicular lymphoma.^{7,28–31} BCL2 protein is expressed in most follicular lymphoma, including cases lacking the t(14, 18) translocation. Variations in this immunoprofile have been reported and some of them are associated with prognostic value. High-grade follicular lymphoma that lack t(14, 18) were found to be frequently associated with a 3q27/ BCL6 rearrangement, and a CD10-negative and MUM1/IRF4-positive immunophenotype.^{32–34} In our cases, the expression of MUM1/IRF4 was seen in a minority of the cases (12%; 18+/156). In these cases, CD10 was negative in 37%; there was lack of BCL2 rearrangement in 89% and presence of BCL6 rearrangement in 35%. Unlike Louissaint *et al*,⁹ who found all BCL2 rearrangement-negative/high-proliferative index (BCL2-N/HPI) cases to be stage I among 58 adult follicular lymphoma studied (≥18 years of age), in our series, just one-third were stage I follicular lymphoma. Liu *et al*⁸ found expression of MUM1/IRF4 in all pediatric follicular lymphoma cases involving the Waldeyer ring. We had five cases involving the tonsil, with no expression of MUM1/IRF4. Only one extranodal

case occurring in the thyroid was positive for MUM1/IRF4. CD23 expression in neoplastic cells can be observed in follicular lymphoma.^{35,36} In this series, CD23 was positive in 24% of the cases (39+/163). No difference in outcome was noted with different levels of expression of CD23 in follicular lymphoma cells.

At the molecular level, 70–95% of follicular lymphoma are reported to contain a translocation between chromosomes 14 (*IGH* region) and 18 (*BCL2* region).^{37,38} In the present study, *BCL2* rearrangement was present in 84 cases (74%; $n = 112$). Rearrangement of the *BCL6* gene, initially thought to be specifically associated with diffuse large B-cell lymphoma, is observed in 6.4% up to 14.3% of follicular lymphoma at the time of diagnosis, and may be prone to subsequent higher-grade transformation.³⁹ It is also suggested that *BCL6* rearrangements could be related to adverse clinical outcomes.^{33,40} In our series, we observed that rearrangement in 21 cases (20%; $n = 105$). Diaz-Alderete *et al.*⁴⁰ studying follicular lymphoma cases for *BCL2* and *BCL6* rearrangements by FISH on paraffin-embedded tissue sections, found positivity in 64 (101+/158) and 14% (22+/156) of the cases, respectively. They also distributed their cases into four groups: *BCL2*–/*BCL6*– (32%), *BCL2*+/ *BCL6*– (56%), *BCL2*–/*BCL6*– (5%), and *BCL2*+/ *BCL6*– (9%). In our series, these frequencies were 19, 61, 11, and 9%, respectively. In terms of histologic grades, the frequency of *BCL2* rearrangement in our cases was higher in grade 1 follicular lymphoma (93%), followed by grade 2 (75%), grade 3A (50%), and grade 3B (11%). An opposite trend was detected in the frequency of *BCL6* rearrangement: 21, 20, 9, and 50%, respectively. We found five cases of high-grade lymphoma with features of follicular lymphoma presenting with *BCL6*, but not *BCL2* rearrangements. Jardin *et al.*³⁴ studied 15 cases with *BCL6* (3q27) rearrangement and absence of t(14;18), and found that these cases had distinct pathological features in comparison with classical follicular lymphoma, such as more prominent nodal architecture and larger follicles.

An interesting finding in the current series was worse survival in follicular lymphoma cases in patients where MDM2 was expressed in >20% of the neoplastic cells. Camacho *et al.*⁴¹ also found worse survival in follicular lymphoma cases with higher expression of MDM2.⁴¹

It is important to state that this study is not based on cases with uniform and standardized treatment, and includes patients treated with different protocols, reflecting the absence of any standard approach to the treatment of follicular lymphoma.

In summary, according to our findings, follicular lymphoma in this age group (19–40 years) shows many similarities with follicular lymphoma in adults of older age, including frequency in anatomic sites, grading distribution, and adverse prognostic parameters like lactate dehydrogenase, bone marrow

involvement, anemia, poor risk FLIPI, higher number of tumor-associated macrophages, grade 3B follicular lymphoma, and presence of *BCL6* rearrangement.

Acknowledgements

We thank the Medical Centers and colleagues who provided the clinical and follow-up information: Francine de Agostinho, MD; Ana Maria Rebêlo, MD; Suley Vancine, MD; Rodrigo Maganha, MD; Henrique Pereira, MD; Rafael Gaiolla, MD; Alexandre de O Sales, MD; Sônia Lima Marcena, MD; Thiago Lopes, MD; Fábio Negretti, MD; Armando Antico Filho, MD; João Henrique Amaral e Silva, MD; Paula C. Abreu e Lima, MD; Siderley S Carneiro, MD; Samia Demachki, MD. We also extend thanks to Gabriela Gualco, MD, for her insights, Eduardo Queiroga, MD, for his help with FISH studies, and to Antonio Bruni for the statistical analysis.

Disclosure/conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- 1 Klapper W. Pathobiology and diagnosis of follicular lymphoma. *Semin Diagn Pathol* 2011;28:146–160.
- 2 Relander T, Johnson NA, Farinha P, *et al.* Prognostic factors in follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2010; 28:2902–2913.
- 3 Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol* 1998;16:2780–2795.
- 4 Fisher RI, LeBlanc M, Press OW, *et al.* New treatment options have changed the survival of patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2005;23: 8447–8452.
- 5 Peterson BA, Petroni GR, Frizzera G, *et al.* Prolonged single-agent versus combination chemotherapy in indolent follicular lymphomas: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol* 2003;21:5–15.
- 6 Glas AM, Kersten MJ, Delahaye LJ, *et al.* Gene expression profiling in follicular lymphoma to assess clinical aggressiveness and to guide the choice of treatment. *Blood* 2005;105:301–307.
- 7 Harris NL, Swerdlow SH, Jaffe ES, *et al.* Follicular Lymphoma. In: Swerdlow EH, Campo E, Harris NL, *et al.* (eds) WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, 4th edn. IARC: Lyon; 2008, pp 220–226.
- 8 Liu Q, Salaverria I, Pittaluga S, *et al.* Follicular Lymphomas in Children and Young Adults: A Comparison of the Pediatric Variant With Usual Follicular Lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2013;37:333–343.
- 9 Louissaint A Jr, Ackerman AM, Dias-Santagata D, *et al.* Pediatric-type nodal follicular lymphoma: an indolent clonal proliferation in children and adults with high

- proliferation index and no BCL2 rearrangement. *Blood* 2012;120:2395–2404.
- 10 Jaglowski SM, Linden E, Termuhlen AM, *et al*. Lymphoma in adolescents and young adults. *Semin Oncol* 2009;36:381–418.
 - 11 Summerfield GP, Wood KM, Taylor PR, *et al*. Survival in young patients (less than 40 years) with follicular lymphoma: a population based study by the Scotland and Newcastle Lymphoma Group. *Leuk Lymphoma* 2004;45:1149–1157.
 - 12 Rueda A, Casanova M, Redondo M, *et al*. Has the time to come leave the 'watch-and-wait' strategy in newly diagnosed asymptomatic follicular lymphoma patients? *BMC Cancer* 2012;12:210.
 - 13 Cox DR. Regression models and life-tables. *J R Stat Soc* 1972;187–220.
 - 14 Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 457–481.
 - 15 de Hoon MJ, Imoto S, Nolan J, *et al*. Open source clustering software. *Bioinformatics* 2004;20: 1453–1454.
 - 16 Saldanha AJ. Java Treeview—extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics* 2004;20:3246–3248.
 - 17 Yamamoto S, Nakase H, Yamashita K, *et al*. Gastrointestinal follicular lymphoma: review of the literature. *J Gastroenterol* 2010;45:370–388.
 - 18 Lobetti-Bodoni C, Rancoita PM, Montoto S, *et al*. (eds). The importance of age in prognosis of follicular lymphoma: clinical features and life expectancy of patients younger than 40 years. Proceedings of the 53rd American Society of Hematology Annual Meeting San Diego, CA, USA. *Blood* 2011;118:1593.
 - 19 Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P, *et al*. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood* 2004;104:1258–1265.
 - 20 Federico M, Bellei M, Marcheselli L, *et al*. Follicular lymphoma international prognostic index 2: a new prognostic index for follicular lymphoma developed by the international follicular lymphoma prognostic factor project. *J Clin Oncol* 2009;27:4555–4562.
 - 21 Solal-Celigny P, Cahu X, Cartron G. Follicular lymphoma prognostic factors in the modern era: what is clinically meaningful? *Int J Hematol* 2010;92:246–254.
 - 22 Farinha P, Masoudi H, Skinnider BF, *et al*. Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma (FL). *Blood* 2005;106:2169–2174.
 - 23 Klapper W, Hoster E, Rolver L, *et al*. Tumor sclerosis but not cell proliferation or malignancy grade is a prognostic marker in advanced-stage follicular lymphoma: the German Low Grade Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* 2007;25:3330–3336.
 - 24 Montoto S, Davies AJ, Matthews J, *et al*. Risk and clinical implications of transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2007;25:2426–2433.
 - 25 Conconi A, Ponzio C, Lobetti-Bodoni C, *et al*. Incidence, risk factors and outcome of histological transformation in follicular lymphoma. *Br J Haematol* 2012;157:188–196.
 - 26 Wahlin BE, Yri OE, Kimby E, *et al*. Clinical significance of the WHO grades of follicular lymphoma in a population-based cohort of 505 patients with long follow-up times. *Br J Haematol* 2012;156:225–233.
 - 27 Horn H, Schmelter C, Leich E, *et al*. Follicular lymphoma grade 3B is a distinct neoplasm according to cytogenetic and immunohistochemical profiles. *Haematologica* 2011;96:1327–1334.
 - 28 Karube K, Guo Y, Suzumiya J, *et al*. CD10-MUM1 + follicular lymphoma lacks BCL2 gene translocation and shows characteristic biologic and clinical features. *Blood* 2007;109:3076–3079.
 - 29 Piccaluga PP, Sapienza MR, Agostinelli C, *et al*. Biology and treatment of follicular lymphoma. *Expert Rev Hematol* 2009;2:533–547.
 - 30 Younes SF, Beck AH, Lossos IS, *et al*. Immunoarchitectural patterns in follicular lymphoma: efficacy of HGAL and LMO2 in the detection of the interfollicular and diffuse components. *Am J Surg Pathol* 2010;34:1266–1276.
 - 31 Dogan A, Bagdi E, Munson P, *et al*. CD10 and BCL-6 expression in paraffin sections of normal lymphoid tissue and B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol* 2000;24:846–852.
 - 32 Horsman DE, Okamoto I, Ludkovski O, *et al*. Follicular lymphoma lacking the t(14;18)(q32;q21): identification of two disease subtypes. *Br J Haematol* 2003;120: 424–433.
 - 33 Guo Y, Karube K, Kawano R, *et al*. Bcl2-negative follicular lymphomas frequently have Bcl6 translocation and/or Bcl6 or p53 expression. *Pathol Int* 2007;57:148–152.
 - 34 Jardin F, Gaulard P, Buchonnet G, *et al*. Follicular lymphoma without t(14;18) and with BCL-6 rearrangement: a lymphoma subtype with distinct pathological, molecular and clinical characteristics. *Leukemia* 2002;16:2309–2317.
 - 35 Olteanu H, Fenske TS, Harrington AM, *et al*. CD23 expression in follicular lymphoma: clinicopathologic correlations. *Am J Clin Pathol* 2011;135:46–53.
 - 36 Thorns C, Kalies K, Fischer U, *et al*. Significant high expression of CD23 in follicular lymphoma of the inguinal region. *Histopathology* 2007;50:716–719.
 - 37 Montoto S, Lopez-Guillermo A, Colomer D, *et al*. Incidence and clinical significance of bcl-2/IgH rearrangements in follicular lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2003;44:71–76.
 - 38 Vaandrager JW, Schuurin E, Raap T, *et al*. Interphase FISH detection of BCL2 rearrangement in follicular lymphoma using breakpoint-flanking probes. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;27:85–94.
 - 39 Akasaka T, Lossos IS, Levy R. BCL6 gene translocation in follicular lymphoma: a harbinger of eventual transformation to diffuse aggressive lymphoma. *Blood* 2003;102:1443–1448.
 - 40 Diaz-Alderete A, Doval A, Camacho F, *et al*. Frequency of BCL2 and BCL6 translocations in follicular lymphoma: relation with histological and clinical features. *Leuk Lymphoma* 2008;49:95–101.
 - 41 Camacho FI, Bellas C, Corbacho C, *et al*. Improved demonstration of immunohistochemical prognostic markers for survival in follicular lymphoma cells. *Mod Pathol* 2011;24:698–707.