SHEILA APARECIDA COELHO SIQUEIRA

**Contribuição da imuno-histoquímica para a
classificação dos linfomas de pequenas
células B**

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

Área de concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Venâncio Avancini
Ferreira Alves

SÃO PAULO

2005

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor

Siqueira, Sheila Aparecida Coelho

Contribuição da imuno-histoquímica para a classificação dos linfomas de pequenas células B / Sheila Aparecida Coelho Siqueira. – São Paulo, 2005.

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

Departamento de Patologia.

Área de concentração: Patologia

Orientador: Venâncio Avancini Ferreira Alves.

Descritores: 1.IMUNOHISTOQUÍMICA 2.LINFOMA DE PEQUENAS
CÉLULAS 3.CLASSIFICAÇÃO 4.PROGNÓSTICO

USP/FM/SBD-345/05

Ao Temístocles
amor da minha vida,

à mãe Cida
que tinha um sonho
e
ao pai Oscar
que me ajudou a realizá-lo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves pela orientação não só desta tese mas de toda minha carreira como patologista.

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva pela confiança e incentivo.

Ao Prof. Dr. Thales de Brito e à Profa. Dra. Wilma dos Santos Oliveira Fernandes por me ensinarem a gostar de Patologia.

Ao Prof. Dr. José Vassalo e à Dra. Yara de Menezes pelos ensinamentos e esmero nos diagnósticos dos pacientes.

Às Profas. Dras. Beatriz Beitler e Juliana Pereira pelo fornecimento dos dados clínicos dos pacientes.

Ao Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva pelo apoio incondicional em vários momentos.

Às biomédicas Neila Aparecida de Souza Silva, Marta Mitiko Otta e Rita de Cássia Araújo Melo Góis Pinto pela inestimável ajuda nas reações imuno-histoquímicas.

Ao Sr. Antônio de Castro Bruno pela colaboração nas análises estatísticas.

À Sra. Roseli Polo pelo auxílio na preparação gráfica.

À Sra. Sônia Strong Castelo Chaves pela revisão do texto em inglês.

Às secretárias do Departamento de Patologia, Liduvina da Silva Neto e Vera Lúcia Carvalho Noya, pela cooperação e amizade.

À tia Dedé e às minhas irmãs Débora e Kátia pelo carinho e compreensão.

Aos colegas da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas e do Departamento de Patologia da FMUSP pela paciência e amizade.

Aos residentes de Patologia que com suas dúvidas nos estimulam a estudar.

A todos que de uma maneira ou outra colaboraram para a realização desta tese.

SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Caracterização dos linfomas indolentes de células B.....	12
1.1.1 Linfoma linfocítico / leucemia linfóide crônica.....	12
1.1.2 Linfoma linfoplasmocítico.....	14
1.1.3 Linfoma da zona marginal esplênica.....	16
1.1.4 Linfoma da zona marginal extra-nodal (tipo MALT).....	17
1.1.5 Linfoma da zona marginal nodal.....	19
1.1.6 Linfoma folicular.....	20
1.1.7 Linfoma do manto.....	23
1.2 Diagnóstico diferencial.....	26
1.3 Caracterização dos antígenos.....	27
1.4 Marcadores imuno-histoquímicos relacionados ao prognóstico....	32
1.4.1 p53.....	32
1.4.2 Antígeno Ki-67.....	34
2. OBJETIVOS.....	35
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	38
3.1 Casuística.....	39
3.2 Métodos.....	40
3.2.1 Método imuno-histoquímico.....	41
3.3 Caracterização das neoplasias.....	44

3.3.1 Primeira fase: Estudo morfológico.....	44
3.3.2 Segunda fase: Painel mínimo – Diagnóstico inicial.....	47
3.3.3 Terceira fase: Painel ampliado – Diagnóstico final.....	47
3.4 Informes adicionais obtidos por métodos imuno-histoquímicos....	48
3.5 Estadiamento.....	52
3.6 Evolução clínica.....	53
3.7 Análise estatística.....	54
4. RESULTADOS.....	56
4.1 Caracterização da casuística.....	57
4.2 Análise da contribuição diagnóstica dos anticorpos do painel ampliado.....	71
4.3 Análise da distribuição das variáveis histológicas de acordo com o diagnóstico.....	75
4.3.1 Aspecto nodular.....	75
4.3.2 Centros de proliferação.....	77
4.3.3 Fibrose.....	79
4.3.4 Proliferação vascular.....	81
4.4 Análise da distribuição das células dendríticas de acordo com o diagnóstico.....	83
4.5 Relevância clínica da classificação da OMS 2001.....	85
4.5.1 Avaliação da resposta inicial.....	85
4.5.2 Avaliação da evolução da doença.....	87
4.5.3 Sobrevida.....	89

4.6 Fatores prognósticos.....	92
4.6.1 Imunoexpressão da proteína p53 e sobrevida.....	92
4.6.2 Influência do índice de proliferação celular na sobrevida.....	96
5. DISCUSSÃO.....	101
5.1 Contribuição das variáveis histológicas não definidoras.....	113
5.2 Contribuição da análise das células dendríticas.....	114
5.3 Aspectos clínicos.....	116
5.4 Fatores prognósticos.....	118
6. CONCLUSÕES.....	124
7. ANEXOS.....	127
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	139
APÊNDICE	

RESUMO

Siqueira SAC. *Contribuição da imuno-histoquímica para a classificação dos linfomas de pequenas células B* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 154p.

Os linfomas de pequenas células B, apesar de apresentarem similaridades morfológicas foram recentemente identificados como entidades distintas, com várias diferenças clínicas e biológicas (OMS, 2001). Nós avaliamos a utilidade de um painel de anticorpos reativos em material fixado em formalina e embocado em parafina na diferenciação destas neoplasias. Utilizando dados clínicos, critérios morfológicos e um painel mínimo de anticorpos constituído por CD20 e CD3, nós selecionamos 134 linfomas de pequenas células B, entre 169 linfomas diagnosticados em linfonodos de janeiro de 1991 a dezembro de 2000 no HC-FMUSP e classificados como A, B, E, F e A/E pela Working Formulation. Eles foram então agrupados em: 1. fortemente sugestivo de um tipo de linfoma; 2. com diagnóstico diferencial entre dois tipos de linfoma e 3. linfoma de pequenas células B sem indícios para subclassificação. Com um painel ampliado de anticorpos incluindo CD5, CD10, CD23, CD43, bcl-2 e ciclina D1, a maioria deles, mas não todos, pode ser adequadamente classificada. Este painel confirmou o diagnóstico em 96,5% dos casos do grupo 1. No grupo 2 ele confirmou um dos dois diagnósticos em 81,5% dos casos. No grupo 3 ele estabeleceu um diagnóstico definitivo em 55% dos casos. Quando todos os grupos foram considerados, um diagnóstico correto pode ser firmado em 88,1% dos casos, enquanto em 6,7% deles nós mantemos duas possibilidades de diagnóstico e em outros 5,2% deles estabelecemos apenas um diagnóstico genérico de "linfoma de pequenas células B". Os anticorpos mais úteis foram o CD10 que separou os linfomas foliculares dos outros linfomas de pequenas células B, o CD 23 que separou os linfomas linfocíticos/LLC e a ciclina D1 que identificou os linfomas do manto. Nós avaliamos também variáveis histológicas como: aspecto nodular, centros de proliferação, fibrose e proliferação vascular nestes linfomas, procurando diferenças entre eles, e observamos que o aspecto nodular favorece os diagnósticos de linfoma do manto ou folicular e que a presença de centros de proliferação deve dirigir o diagnóstico para linfoma linfocítico/LLC. Não identificamos diferenças entre os grupos com relação à fibrose e proliferação vascular. Outra variável avaliada foi o arcabouço de células dendríticas identificadas pela reação com CD21 e CD35, o qual mostrou que agrupamentos semelhantes a centros germinativos residuais ou expandidos predominaram na maioria destes linfomas, exceto no linfoma linfocítico/LLC. Em relação ao impacto clínico não evidenciamos associação significativa da resposta inicial do paciente com o tipo do linfoma. Mas a evolução dos casos com linfoma do manto ou LLC versus linfoma do manto foi menos favorável, com um tempo de sobrevida menor. Já na pesquisa de marcadores prognósticos nós avaliamos a imunoexpressão da proteína p53 e do antígeno Ki-67. No geral,

os casos que expressaram p53 tiveram uma tendência a sobrevida menor do que os p53 negativos. Isto foi mais nítido nos casos com linfoma linfocítico/LLC e linfoma do manto. Com relação ao antígeno Ki-67 nós escolhemos como nível de corte 20% de células positivas e observamos indícios de que níveis mais baixos estão associados com tempo de sobrevida maior, especialmente no linfoma do manto.

Descritores: Imunohistoquímica; Linfoma de pequenas células; Classificação; Prognóstico

SUMMARY

Siqueira SAC. *Contribution of immunohistochemistry to small B cell lymphomas classification* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 154p.

Small B-cell lymphomas, despite sharing morphological similarities, were recently identified as distinct entities with several clinical and biological differences (WHO, 2001). We evaluated the usefulness of a panel of reactive antibodies in formalin-fixed and paraffin-embedded material for the differentiation of these neoplasias. Using clinical data, morphological criteria and a minimal antibody panel consisting of CD20 and CD3, we selected 134 small B-cell lymphomas, out of 169 lymphomas diagnosed in lymph nodes from January 1991 to December 2000 in HC-FMUSP and classified as A, B, E, F and A/E by Working Formulation. They were then grouped as: 1. strongly suggestive of one type of lymphoma; 2. with differential diagnosis between two types of lymphoma and 3. small B-cell lymphoma with no indication for subclassification. With an extended antibody panel including CD5, CD10, CD23, CD43, bcl-2 and cyclin D1, most of them, but not all, could be adequately classified. This panel confirmed the diagnosis in 96.5% of the cases in group 1. In group 2, it confirmed one of the two diagnosis in 81.5% of the cases. In group 3, it established a definite diagnosis in 55% of the cases. When all groups were considered, a definitive diagnosis could be achieved in 88.1% of the cases, whereas in 6.7% of them, two possible diagnosis were maintained, and in 5.2% of them, a generic diagnosis of "small B-cell lymphoma" was established. The most useful antibodies were CD10, which separated follicular lymphomas from other small B-cell lymphomas, CD23, which discriminated lymphocytic lymphomas/CLL and cyclin D1, which identified mantle cell lymphomas. We also evaluated histological variables such as nodular aspect, proliferation centers, fibrosis and vascular proliferation in these lymphomas, searching for differences among them, and observed that the nodular aspect facilitates the diagnosis of mantle cell or follicular lymphoma and that the presence of proliferation centers points to a diagnosis of lymphocytic lymphoma/CLL. We did not observe differences among the groups regarding fibrosis and vascular proliferation. Another assessed variable was the structure of dendritic cells identified through the reaction with CD21 and CD35; it showed that clusters, similar to residual or expanded germinal centers, predominated in most of these lymphomas, except in lymphocytic lymphoma/CLL. Regarding the clinical impact, we did not observe any significant association between the patient's initial response to chemotherapy and lymphoma type. Nevertheless, the evolution of mantle cell lymphoma or CLL versus mantle cell lymphoma patients was less favorable, with a lower survival rate. We also assessed some prognostic markers, such as the immunoexpression of p53 protein and Ki-67 antigen. In general, cases that expressed p53 had a lower survival rate compared to p53 negative cases. This was more evident in patients

diagnosed with lymphocytic lymphoma/CLL and mantle cell lymphoma. Regarding the Ki-67 antigen, the cutoff was set at 20% of positive cells, and we have found a trend toward lower levels being associated to a higher survival rate, especially for mantle cell lymphomas.

Keywords: Immunohistochemistry; Small cell lymphoma; Classification; Prognosis

1. INTRODUÇÃO

Nos anos 70, várias classificações de linfomas não Hodgkin, com bases conceituais muito diversas tais como a de Rappaport (1966), a de Lukes e Collins (Lukes et al., 1974), a de Kiel (Lennert et al., 1975), a da British National Lymphoma Investigation (Henry et al., 1978), a de Dorfman (1974) e a da Organização Mundial de Saúde (Mathe et al., 1976) eram usadas em todo o mundo. Tal diversidade refletia a falta de consenso entre os diversos grupos de estudiosos, resultando na falta de critérios uniformes para o diagnóstico de linfomas e dando origem a problemas consideráveis entre patologistas e oncologistas, tornando muito difícil a comparação dos trabalhos publicados na literatura, especialmente quanto à história natural e à resposta terapêutica.

A principal polêmica a esta época era a compreensão dos linfomas como doença única ou múltipla. Esta última proposta, a de que os linfomas reproduziriam no plano da neoplasia o desenvolvimento natural do sistema linfóide, defendida principalmente por Lennert (1978) e por Lukes (1979), levava em consideração a diversidade entre as linhagens linfocitárias B e T, o amadurecimento celular e as variações morfológicas e funcionais por ocasião da exposição a antígenos. Tratava-se na época de proposta de difícil aplicação prática, especialmente porque sua caracterização requeria amostras

congeladas para estudos de imunofenotipagem, além da compreensão dos aspectos experimentais em animais ou de células em cultivo.

De outra parte, com base apenas em aspectos morfológicos, outros grupos propunham que os linfomas não Hodgkin constituíam uma única doença genérica com vários graus de agressividade que podiam ser revelados com base na morfologia e dados clínicos (Nathwani et al.,1979).

Este conceito encorajou a convicção de que seria possível idealizar um único sistema de graduação capaz de prever a evolução clínica da doença.

Este foi o princípio da “Working Formulation for Clinical Usage” (WF) publicada em 1982 na qual os linfomas eram divididos em três grupos prognósticos indicados por graus de malignidade clínica, baseados na sobrevida dos pacientes recrutados no estudo.

Esta classificação é relativamente fácil de ser aplicada uma vez que é baseada predominantemente no padrão de crescimento (folicular versus difuso) e no tamanho das células.

Por exemplo:

A – linfoma maligno linfocítico de pequenas células

Padrão difuso com linfócitos redondos pequenos ou de tamanho médio, com discreta variação na forma e tamanho nuclear, e poucas figuras de mitose. Um vago padrão nodular com agrupamentos de células grandes é descrito como centros de proliferação. Linfócitos

plasmocitóides com ocasionais inclusões intracitoplasmáticas e/ou nucleares podem ser proeminentes em pacientes com gamopatias.

B – linfoma maligno folicular predominantemente de pequenas células clivadas

Padrão predominantemente ou parcialmente folicular. Foliculos de forma e tamanho relativamente uniformes, sem um manto bem definido comprimem as regiões linfóides entre eles que podem ou não conter células neoplásicas. Os macrófagos “tingible body” em geral estão ausentes e não há evidências de polarização celular dentro dos foliculos que são compostos por células pequenas, com citoplasma escasso. Estas células são pouco maiores do que os linfócitos normais e têm núcleos irregulares com indentações proeminentes e planos de clivagem lineares. Um pequeno número de células não clivadas é encontrado e sempre existem algumas células grandes com citoplasma basofílico. Figuras de mitose são raras.

E – linfoma maligno difuso de pequenas células clivadas

Este tipo representa o correspondente difuso do linfoma folicular, com o mesmo tipo celular. A freqüência de figuras de mitose varia, mas em geral é maior do que a observada no tipo folicular. Um pequeno número de células grandes não clivadas é invariavelmente encontrado. Esclerose pode ser evidente e pode ser relatada.

F – linfoma maligno difuso de pequenas e grandes células

Esta categoria representa um grupo heterogêneo de linfomas de composição celular mista. Alguns deles, nos quais os linfócitos pequenos são do tipo clivado, podem representar o correspondente difuso do linfoma folicular do tipo misto com células pequenas clivadas e células grandes. Outros, nos quais prevalecem as células grandes e pequenas com contornos nucleares irregulares, mas não clivadas, podem ter marcadores de linfócitos T. Algumas células neoplásicas exibem características plasmocitóides.

A aplicação ampla da WF fez surgir deficiências significativas que puderam ser melhor identificadas ao longo dos anos 90. Sabe-se atualmente que as diversas categorias nos grupos da WF incluem um grande número de condições que diferem bastante na etiologia, quadro clínico, história natural, epidemiologia e resposta ao tratamento. Um exemplo relevante é o linfoma linfocítico de células pequenas que pode incluir diversas entidades, hoje reconhecidas, com prognósticos muito diferentes, tais como linfoma linfocítico/leucemia linfóide crônica, linfoma do manto e linfoma da zona marginal extranodal do tipo MALT (Zukerberg et al., 1993). Um determinado aspecto histológico como o nodular/folicular pode ser encontrado não só nos linfomas foliculares mas também no linfoma do manto, no

linfoma da zona marginal e mesmo como um padrão pseudofolicular no linfoma linfocítico/LLC.

Além disso, a WF não leva em consideração o imunofenótipo na categorização dos linfomas quando sabe-se agora que este fator tem importância no resultado. Por exemplo, linfomas T em geral são mais agressivos do que os linfomas B com morfologia comparável (Escalon et al., 2005).

Na época em que a WF foi proposta, a imunofenotipagem não era possível sem a disponibilidade de tecidos frescos ou congelados, mas agora se pode conseguir o mesmo resultado utilizando-se tecido rotineiramente fixado em formalina e embebido em parafina (Dunphy et al., 2004).

Apesar de alguns tipos de linfoma poderem ser diagnosticados pela avaliação morfológica (pex: linfoma linfocítico/LLC, linfoma folicular e linfoma da zona marginal extra-nodal do tipo MALT) a análise imunofenotípica contribui para a reproducibilidade do diagnóstico da maioria dos linfomas, permitindo a distinção de tipos morfológicamente similares (Hsi et al., 2001).

Desde a introdução da WF foram então reconhecidas muitas “novas entidades” que respondem por uma proporção significativa dos linfomas não Hodgkin encontrados na prática de rotina (Piris et al., 1990, Banks et al., 1992 e Zukerberg et al., 1993).

Além disso, cada variedade de linfoma apresenta seu próprio espectro de graus de agressividade clínica e morfológica, e o

grau não pode ser determinado com base apenas no padrão de crescimento ou no tamanho da célula.

Por fim a WF baseia-se em dados de sobrevida obtidos de pacientes tratados nos anos 60 e 70, período em que os protocolos terapêuticos variavam muito, dificultando sobremaneira as cooperações que poderiam permitir a compreensão da história natural da doença.

Em teoria, do mesmo modo que as outras neoplasias, os linfomas devem ser classificados com base na sua suposta histogênese, de modo a fornecer informação máxima sobre sua biologia, história natural e resposta à terapia.

Na prática, entretanto, como o conhecimento do sistema imune era ainda insuficiente para esta abordagem ser aplicada em todos os casos, uma classificação biologicamente precisa dos linfomas ainda não parecia viável na prática diagnóstica. Apesar disto, com os dados morfológicos, imunofenotípicos, moleculares e clínicos atualmente disponíveis é possível listar numerosas entidades distintas que podem ser reconhecidas e diagnosticadas na prática rotineira, e que precisam ser usadas para classificar os pacientes antes do tratamento (Pittaluga et al., 1996).

O reconhecimento da importância desta integração de aspectos biológicos e patológicos uniu um grupo de patologistas europeus e norte-americanos que se tornou conhecido como International Lymphoma Study Group, e que lançou em 1994 uma lista de entidades clinico-patológicas claramente caracterizadas na

literatura, que podem ser reconhecidas com técnicas amplamente disponíveis. As entidades biológicas são enfatizadas, saindo da abordagem morfológica pura (Chan et al., 2001). Tal lista foi publicada em 1994 como uma proposta de atualização da classificação dos linfomas e denominada Revised European American Lymphoma (REAL) Classification (Harris et al.). Após submissão à comunidade laboratorial e clínica internacional, esta proposta serviu como base para a mais recente classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) publicada em 2001 (Jaffe et al.).

A melhora na definição dos linfomas foi particularmente importante para as entidades que englobam os linfomas de pequenas células B, na WF classificados como A, B, E e F (Chan et al., 1995).

Na nova classificação, estes linfomas aparecem como entidades distintas que, apesar de serem constituídas por células de tamanhos semelhantes, são proliferações clonais de células B que têm diferenças importantes no imunofenótipo, nas alterações genéticas, no quadro clínico e no resultado do tratamento. Em muitos aspectos, parecem recapitular as etapas normais de diferenciação das células B de modo que podem ser classificados de acordo com a etapa de desenvolvimento da célula B correspondente.

No grupo dos linfomas de células pequenas B, que compreende os tipos mais frequentes de doenças linfoproliferativas na população adulta, encontram-se o linfoma linfocítico/leucemia linfóide crônica, o linfoma linfoplasmocítico, os linfomas da zona marginal

esplênica, nodal e extranodal, o linfoma folicular e o linfoma do manto (Glass et al., 1997).

Ainda que o processo de maturação dos linfócitos B e T seja complexo, e tal diversidade seja ainda maior nos vários eventos relacionados à transformação neoplásica, a morfologia e o imunofenótipo são suficientes para o diagnóstico da maioria destas neoplasias. Como o processo evolutivo ocorre com expressão combinada de um conjunto de proteínas no citoplasma ou na membrana dos linfócitos, assim também a identificação dos linfomas correspondentes a cada etapa requer um painel de anticorpos para se chegar ao diagnóstico correto. Em alguns casos, o quadro clínico pode ser essencial, como nos linfomas da zona marginal. Em outros, a análise citogenética e o uso de métodos como hibridização molecular (FISH – fluorescent in situ hybridization) ou amplificação de ácidos nucléicos pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) podem ser úteis tanto na diferenciação entre os linfomas de pequenas células B como na distinção de processos reativos (Arber et al., 2000, Vega et al., 2003, Bahloul et al., 2005).

Uma característica da seqüência evolutiva das células linfóides e dos linfomas correspondentes é a possibilidade de ampla variação de aspectos morfológicos em uma mesma neoplasia. Assim, por exemplo, o linfoma do manto pode ser composto de células pequenas, blastóides ou mesmo pleomórficas. Também o comportamento clínico de um tipo de linfoma pode ser variável, mas

cada entidade parece apresentar um fator de unificação que é um imunofenótipo e/ou genótipo distinto (Chan et al., 2001).

Diversos estudos têm demonstrado a relevância clínica desta classificação, sendo o mais amplo disponível o estudo retrospectivo realizado pelo Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project e publicado em 1997 que incluiu 1378 casos de linfomas de nove instituições em 8 países. Este Projeto mostrou que em geral existe uma boa reproducibilidade entre observadores, que poucos tipos de linfomas podem ser diagnosticados apenas pela avaliação morfológica e que a análise imunofenotípica contribui significativamente para a reproducibilidade dos diagnósticos, tanto por fornecer informação da linhagem como por permitir a distinção de tipos de linfomas morfológicamente semelhantes.

O desenvolvimento de novos anticorpos monoclonais permitindo que a imunofenotipagem atualmente possa ser convenientemente realizada em tecidos fixados em formalina e processados de maneira rotineira contribui para a reproducibilidade dos diagnósticos da maioria dos linfomas e favorece a aplicação da nova classificação da OMS (Zukerberg et al., 1995; Watson et al., 2000 e Hsi et al., 2001). Quando necessário o bloco de parafina pode ser facilmente enviado para um laboratório de referência para realização dos estudos imuno-histoquímicos (de Leon et al., 1998; Kurtin et al., 1999 e Chen et al., 2000).

Ao analisar a classificação da OMS, Chan et al. (2001) identificaram 4 categorias principais de linfomas não Hodgkin em termos de comportamento biológico: linfomas indolentes, linfomas agressivos, linfomas altamente agressivos e um grupo especial de linfomas indolentes localizados. O tratamento atual, em geral, é semelhante para as várias entidades dentro de cada grupo, mas o resultado pode ser muito diferente, uma vez que alguns respondem melhor que outros. A longo prazo a sobrevida dos linfomas agressivos e altamente agressivos é melhor do que a dos linfomas indolentes porque a cura praticamente não é atingida neste último grupo que inclui o linfoma linfocítico/leucemia linfóide crônica, o linfoma linfoplasmocítico, o linfoma da zona marginal esplênica, o linfoma da zona marginal nodal, o linfoma folicular, o linfoma do manto, a micose fungóide e a leucemia linfocítica de grandes células T granulares (Coiffier et al., 1999; Pileri et al., 2000, Chan et al., 2001 e Paes et al., 2002).

1.1. Caracterização dos linfomas indolentes de células B

1.1.1. Linfoma linfocítico / leucemia linfóide crônica

O linfoma linfocítico/leucemia linfóide crônica (LL/LLC) é uma doença linfoproliferativa clonal de células B (Pangalis et al., 2002).

Morfologicamente, é constituído por células linfóides pequenas com núcleos redondos e cromatina condensada, e variável quantidade de células linfóides maiores, com nucléolo proeminente e cromatina frouxa (prolinfócitos e paraimunoblastos), que dão origem aos centros de proliferação. Tais estruturas são compreendidas como agregados de células linfóides com poder de multiplicação muito superior às demais, sendo possível fonte de produção contínua das células neoplásicas. Apesar de geralmente serem reconhecíveis em cortes histológicos, estes centros de proliferação podem se tornar mais confluentes ou dar origem a um aspecto nodular levantando as possibilidades de diagnóstico diferencial com linfoma da zona marginal, ou até com linfoma folicular. Em alguns casos, a irregularidade nuclear sugere linfoma folicular ou linfoma do manto. Em outros casos, observam-se células plasmocitóides que podem levar ao diagnóstico diferencial com linfoma linfoplasmocítico. A presença de centros de proliferação parece ser muito mais importante do que a citologia das

células neoplásicas no diagnóstico do linfoma linfocítico/LLC. Raramente encontra-se padrão de crescimento interfolicular com centros germinativos reativos e manutenção parcial dos seios linfáticos, levando à confusão com linfonodos reativos ou com outros linfomas com um padrão de crescimento do tipo zona marginal ou do manto (Palestro et al., 1997).

A maioria dos casos ocorre em adultos na 7ª década de vida e apresenta envolvimento da medula óssea e do sangue periférico ao diagnóstico. A neoplasia em geral já se apresenta inicialmente comprometendo múltiplos linfonodos, o fígado e o baço.

O quadro clínico é indolente e a doença é considerada incurável com a terapia atualmente disponível (Montillo et al., 2005). Na evolução podem ocorrer transformação prolinfocitóide ou para linfoma de células grandes (Síndrome de Richter) (Giles et al., 1998) ou até para linfoma de Hodgkin (Fong et al., 2005).

As células neoplásicas expressam CD19, CD20, CD22, CD79a, CD5, CD23, CD43, CD11c, bcl-2, IgM ou IgD de superfície, e kappa ou lambda, que podem ser estudados à Citometria de Fluxo ou à Imuno-histoquímica. São negativas para CD10, bcl-6 e ciclina D1, e em geral negativas ou fracamente positivas para FMC7 e CD79b (OMS, 2001).

Utilizando-se análise citogenética convencional, anormalidades cromossômicas foram identificadas em 50% a 60% dos casos, incluindo trissomia do cromossomo 12, deleções de 11q e

anormalidades de 13q14 e 14q32. Mutações ou perda do gen *TP53* em 17p13 ocorrem em 10% dos casos e a frequência da inativação aumenta substancialmente nas fases tardias da doença, sugerindo que ele pode estar envolvido na progressão tumoral. (Said et al., 2003) A análise por FISH revela que aproximadamente 80% dos casos têm cariótipos anormais (Oscier et al., 2002). Índices de proliferação mais baixos (<5%), detectados pela expressão do antígeno Ki-67, são associados com doença mais indolente e resistência a tratamento (Palestro et al., 1997).

1.1.2. Linfoma linfoplasmocítico

O linfoma linfoplasmocítico (LLp) consiste de uma proliferação difusa de células linfóides pequenas, células plasmocitóides (com citoplasma basofílico abundante e núcleo semelhante ao de linfócitos) e plasmócitos com ou sem corpúsculos de Russell e Dutcher. Além disto estas células não podem apresentar características superponíveis às do linfoma linfocítico/LLC, do linfoma do manto, do linfoma da zona marginal ou do linfoma folicular, sendo portanto um diagnóstico de exclusão (Andriko et al., 2001, Pangalis et al., 2005). Seu padrão de crescimento habitual é interfolicular, poupando os seios linfáticos.

Compromete indivíduos adultos na 7ª década de vida, com leve predomínio em homens. A maioria dos casos acomete a medula óssea, e envolvimento de linfonodos e baço é comum. Em geral é associado com a presença de uma paraproteína sérica monoclonal do tipo IgM, com ou sem hiperviscosidade sanguínea (Macroglobulinemia de Waldenstrom) (Treon et al., 2003). Esta paraproteína pode ter atividade de auto-anticorpo e de crioglobulina.

As células neoplásicas expressam CD19, CD20, CD22, CD38, CD79a e bcl-2, e são negativas para CD5, CD10, CD23, bcl-6 e ciclina D1. O CD43 pode ou não ser positivo. As células têm imunoglobulina citoplasmática, em geral do tipo IgM e mostram restrição de cadeia leve (OMS, 2001).

Além do rearranjo de genes de cadeias leve e pesada da imunoglobulina, estudos genéticos e de biologia molecular mostraram a ocorrência da translocação t(9;14)(p13;q32) em cerca de 50% dos casos. As regiões de recombinação entre os cromossomos envolvem o locus da cadeia pesada da imunoglobulina no cromossomo 14q32 e a região genômica contendo o gen PAX5 no cromossomo 9p13. Este gen codifica uma proteína ativadora específica da célula B que é importante no desenvolvimento inicial do linfócito B (Harris et al., 2001).

1.1.3. Linfoma da zona marginal esplênica

O linfoma da zona marginal (LZM) esplênica é uma neoplasia constituída por células linfóides pequenas que compromete e substitui os centros germinativos da polpa branca esplênica, misturando-se com uma zona marginal externa de células grandes, com citoplasma claro. Tanto as células pequenas quanto as grandes infiltram a polpa vermelha. No sangue periférico, freqüentemente se observam linfócitos vilosos e na medula óssea a infiltração é geralmente focal, podendo ser intra-sinusoidal. Os linfonodos do hilo esplênico estão freqüentemente envolvidos (Mollejo et al., 1997).

Acomete indivíduos adultos, acima dos 50 anos de idade, sem predileção pelo sexo. Os pacientes apresentam esplenomegalia, com linfocitose e pancitopenia, em geral sem linfadenopatia periférica. A evolução clínica é extremamente indolente, sendo a neoplasia resistente à quimioterapia. A esplenectomia pode ser seguida por remissão prolongada.

As células neoplásicas expressam CD19, CD20, CD22, CD79a e FMC7, e podem expressar fracamente bcl-2. São, em geral, negativas para CD5, CD10, CD23, CD43, bcl-6 e ciclina D1 (OMS, 2001).

As alterações genéticas ainda não foram bem estudadas, mas a perda de um alelo do cromossomo 7q21-32 foi descrita em 40%

dos casos e a desregulação do gene *CDK6* localizado em 7q21 foi relatada em vários casos de linfoma da zona marginal esplênica. A trissomia do cromossomo 3, encontrada em linfomas da zona marginal nodal e extra-nodal foi observada em alguns casos. Mutações no gen *TP53* variam de 0% a 40% e em geral são associadas com progressão desta neoplasia (Franco et al., 2003).

1.1.4. Linfoma da zona marginal extra-nodal (tipo MALT)

O linfoma da zona marginal extra-nodal (tipo MALT – tecido linfóide associado à mucosa) reproduz as características morfológicas do MALT normal. É caracterizado por um infiltrado polimorfo de linfócitos pequenos, células B da zona marginal, células B monocitóides e plasmócitos, assim como raras células grandes basofílicas. Folículos reativos estão geralmente presentes, com as células neoplásicas ocupando a zona marginal e/ou a região interfolicular. Ocasionalmente os folículos podem ser colonizados por células monocitóides ou da zona marginal. Estas células classicamente infiltram o epitélio formando as chamadas “lesões linfoepiteliais” (Isaacson et al., 1983).

Os pacientes são geralmente adultos na 6^a. e 7^a. décadas de vida, com leve predominância em mulheres. A maioria dos pacientes apresenta doença localizada.

O estômago é o local mais comum, sendo que estes linfomas compreendem a maioria dos linfomas de células pequenas e quase 50% dos todos os linfomas gástricos. Podem comprometer também pulmão, tireóide, glândulas salivares e órbita (Zinzani et al., 1997).

Muitos pacientes têm história de doença auto-imune ou de gastrite por *Helicobacter pylori* no caso do linfoma gástrico. Terapia dirigida contra este microorganismo resulta em regressão da maioria das lesões gástricas iniciais. Os casos que não respondem a antibióticos e aqueles que ocorrem em outros locais podem ser curados com cirurgia, radio ou quimioterapia (Pileri et al., 2000).

As células neoplásicas são positivas para CD19, CD20, CD79a e bcl-2, fracamente positivas para CD43 e CD11c, e negativas para CD5, CD10, CD23, bcl-6 e ciclina D1. Expressam, em geral, IgM e mais raramente IgA ou IgG, e mostram restrição de cadeia leve (OMS, 2001).

A alteração genética mais comum do linfoma da zona marginal extra-nodal do tipo MALT é a translocação t(11;18)(q21;21) que une o gen *API2* que codifica um inibidor de apoptose ao gen *MLT* (*MALT1*), gerando uma nova proteína de fusão com funções anti-apoptóticas (Harris et al., 2001). A trissomia do cromossomo 3 também

é freqüentemente encontrada. Mais raramente a t(1;14)(p22;q32) leva a desregulação da transcrição do gen *BCL10*, um regulador negativo de apoptose (Ye et al., 2000). Mutações do *TP53* também foram detectadas em uma freqüência muito baixa.

1.1.5. Linfoma da zona marginal nodal

O linfoma da zona marginal nodal apesar de ser primário em linfonodo é idêntico ao dos linfonodos secundariamente envolvidos por linfoma da zona marginal extra-nodal ou MALT. Morfologicamente apresenta uma proliferação difusa peri-sinusal, perivascular e parafolicular de células monocitóides, podendo ser confundido com linfoma do manto com aspecto mais monocitóide ou quando no trato gastrointestinal, com linfoma folicular com ou sem diferenciação monocitóide, com proliferações linfóides reativas, uma vez que folículos hiperplásicos estão freqüentemente presentes, ou com linfoma linfocítico/LLC quando as células não têm aspecto monocitóide (Maes et al., 2002).

Esta é uma doença rara que apresenta comprometimento isolado ou generalizado dos linfonodos. A medula óssea está comprometida em 30% dos casos e raramente pode envolver o sangue periférico. A evolução clínica é indolente podendo-se encontrar linfoma

da zona marginal extranodal. Quando disseminado, em geral é incurável com a terapia atualmente disponível.

As células neoplásicas mostram positividade para CD19, CD20, CD22, CD79a, bcl-2 e FMC-7. Expressam IgM e menos freqüentemente IgA ou IgG, e mostram restrição de cadeia leve kappa ou lambda. Em geral as células são negativas para CD5, CD10, CD23, CD43, bcl-6 e ciclina D1 (OMS, 2001).

Devido à sua raridade, as suas alterações genéticas não foram ainda bem estudadas. Entretanto, a trissomia do 3 e as translocações $t(11;18)(q21;q21)$ e $t(1;14)(p22;q32)$ encontradas no linfoma da zona marginal extra-nodal não são observadas na forma nodal.

1.1.6. Linfoma folicular

O linfoma folicular (LF) é uma neoplasia de células B do centro do folículo linfóide que tem um padrão de crescimento pelo menos parcialmente folicular.

Em geral, é composto por uma mistura de células centrofoliculares clivadas (centrócitos) e células centrofoliculares grandes não clivadas (centroblastos), com predomínio dos primeiros. O

grau de agressividade clínica desta neoplasia depende do número de centroblastos (Shiozawa et al., 2003).

A distinção de uma hiperplasia folicular reacional pode ser problemática. Além disso é atualmente reconhecido que nem todos os linfomas que crescem em um padrão folicular são originários de células centrofoliculares. Colonização folicular de centros germinativos benignos por linfoma da zona marginal ou mesmo por linfoma do manto precisam ser diferenciadas de linfoma folicular.

Na atual classificação da OMS (2001), o linfoma folicular é graduado pela proporção de células grandes não clivadas (centroblastos). A contagem absoluta do número de centroblastos deve ser feita em 10 campos microscópicos de grande aumento (400X), em folículos neoplásicos diferentes. O grau 1 tem 0-5 centroblastos/CGA, o grau 2 tem 6-15 centroblastos /CGA e o grau 3 tem mais de 15 centroblastos/CGA.

Afeta predominantemente indivíduos adultos na 6ª década de vida, com discreto predomínio em mulheres. A maioria dos pacientes tem doença disseminada ao diagnóstico, em geral comprometendo linfonodos, mas também o baço, a medula óssea e ocasionalmente sangue periférico e sítios extra-nodais. O curso clínico é indolente, com sobrevida média de mais de 8 anos. Em geral a doença é incurável com o tratamento atualmente disponível.

As células neoplásicas expressam CD19, CD20, CD22, CD79a, CD10, bcl-2 e bcl-6, e em geral são negativas para CD5, CD43 e ciclina D1 (OMS, 2001).

O índice de proliferação celular medido por marcação do antígeno Ki-67 correlaciona-se com os subgrupos histológicos do linfoma folicular confirmando a associação entre proliferação celular e células grandes em linfomas não Hodgkin. Também parece que os pacientes com linfoma folicular apresentando baixos índices de proliferação celular têm uma sobrevida global mais longa do que aqueles com alto índice (Martin et al., 1995).

Este linfoma é caracterizado pela translocação t(14;18)(q32;q21) detectada por técnicas citogenéticas convencionais em aproximadamente 80% a 90% dos casos (Pileri et al., 2000). Nesta translocação o gen *BCL2* localizado no cromossomo 18q21 é justaposto ao gen da cadeia pesada da imunoglobulina *IGH* em 14q32, resultando na hiperexpressão da proteína bcl-2 que regula apoptose. Outro método de detecção desta translocação é a PCR, que é usada particularmente na pesquisa de doença residual mínima e pode ser utilizada em tecido incluído em parafina. Outras alterações genéticas compreendem deleções do cromossomo 6 em 6q27 que ocorre em aproximadamente 20% dos casos e mutações do gen *TP53* que estão freqüentemente associadas a transformação histológica para linfoma difuso de grandes células (Sander et al., 1993).

1.1.7. Linfoma do manto

O linfoma do manto (LM), apesar de suas células pequenas serem compreendidas em todas as antigas classificações morfológicas como relevante sinal de formas indolentes, é uma neoplasia com comportamento clínico mais agressivo (Kurtin, 1998, Chan et al., 2001).

Habitualmente apresenta uma proliferação monótona de células de tamanho pequeno a médio, com núcleos irregulares, lembrando as células clivadas dos centros germinativos. No entanto, pode-se encontrar um predomínio de células pequenas redondas ou de células monocitóides. Uma variante morfológica importante é o tipo blastóide (anaplásico, pleomórfico) composto por células maiores, com alto índice mitótico e alto índice de proliferação que pode ser medido pela marcação do antígeno Ki-67 (Izban et al., 2000 e Raty et al., 2003).

As células se dispõem em padrão difuso, nodular ou do tipo zona do manto, ou mesmo em uma combinação dos três.

É interessante destacar que este clássico linfoma de células pequenas, que era incluído na categoria E da WF, devido às variáveis histológicas requer diagnóstico diferencial amplo que inclui tanto linfoma linfocítico/LLC, linfoma da zona marginal e linfoma

folicular, como até linfoma difuso de grandes células B e linfoma linfoblástico (Zhang et al., 1999 e Raty et al., 2002).

Ocorre em adultos na 7ª década de vida, com predomínio em homens. Em geral encontra-se disseminado ao diagnóstico, com envolvimento de linfonodos, baço, anel de Waldeyer, medula óssea e sítios extra-nodais, especialmente o trato gastrointestinal. É incurável com os tratamentos atualmente disponíveis e a sobrevida mediana varia de 3 a 5 anos (Cerny et al., 2002). A forma blastóide é mais agressiva, mas transformação para um linfoma de grandes células parece não ocorrer.

Esta neoplasia expressa CD19, CD20, CD79a, CD5, CD43, bcl-2 e ciclina D1. CD22 e FMC7 também são positivos, porém mais fracos. Em geral é negativa ou fracamente positiva para CD23, CD10 e bcl-6 são negativos (OMS, 2001).

A presença da translocação t(11;14)(q13;q32) é um fator constante nesta neoplasia (de Boer et al., 1995 e Schlette et al., 2001). Ela justapõe o gen *CCND1* (também conhecido como *BCL1*, *PRAD1*) em 11q13 com o amplificador do gen *IGH* em 14q32. Como resultado desta translocação encontra-se hiperexpresso o gen *CCND1* que codifica a proteína ciclina D1, um membro das ciclinas D do tipo G1 envolvido no controle celular e não expresso em células B normais. A hiperexpressão da ciclina D1 parece encurtar a fase G1 e acelerar a entrada na fase S. Entretanto não é suficiente para transformar células ou induzir linfomagenese. Portanto outros fatores celulares parecem

desempenhar um papel no linfoma do manto (Swerdlow et al., 2002). Além disso várias vias associadas com apoptose estão alteradas e substancialmente suprimidas funcionalmente no linfoma do manto.

Métodos de FISH usando sondas para os cromossomos 11 e 14 são muito sensíveis e podem detectar a t(11;14) em até 95% dos linfomas do manto (Kodet et al., 2003). A análise por citogenética convencional pode detectar a translocação em pelo menos 70% a 80% dos casos. Uma abordagem alternativa para obter apoio para o diagnóstico de linfoma do manto é avaliar a expressão da ciclina D1, porque todas as translocações t(11;14) teoricamente resultam em hiperexpressão desta proteína. Como linfócitos normais expressam níveis muito baixos de ciclina D1, não detectáveis por imuno-histoquímica, este método é conveniente e específico para distinguir linfoma do manto de outros tipos de linfomas. Entretanto, apesar da especificidade desta alteração, vários autores têm colocado restrição à sua utilidade prática, referindo baixa sensibilidade (Dunphy et al., 2001). A detecção do mRNA da ciclina D1 por RT-PCR quantitativo, ao contrário, é muito sensível e distingue os baixos níveis desta proteína em linfomas que não a expressam ou em células normais, dos altos níveis característicos do linfoma do manto (Belaud-Rotureau et al., 2002).

Outra alteração compreende a mutação e hiperexpressão do gen *TP53* que, quer ao diagnóstico, quer na recidiva pode servir como um marcador prognóstico para linfomas do manto. Esta mutação

está fortemente associada com transformação blastóide e prediz um pior prognóstico (Louie et al., 1995).

1.2. Diagnóstico diferencial

Uma vez que o patologista esteja familiarizado com os aspectos morfológicos específicos destas neoplasias linfóides, há autores que defendem que os casos mais típicos de linfoma linfocítico/LLC, linfoma folicular e linfoma da zona marginal extra-nodal podem ser diagnosticados sem necessidade de imunofenotipagem ou estudos genéticos, desde que uma quantidade adequada de tecido bem fixado esteja disponível (Hsi et al., 2001).

Entretanto, em casos difíceis ou quando a fixação ou a quantidade de tecido não são adequadas, a imunofenotipagem pode ajudar bastante tanto no diagnóstico como na melhoria da reproducibilidade inter-observadores (Chan et al., 2001).

Quando não se têm nem cortes histológicos adequados, nem tecido disponível para imunofenotipagem, o limite do diagnóstico é “linfoma de pequenas células, não classificável”.

Apesar da história natural dos vários tipos de linfomas descritos ser significativamente diferente, a análise da literatura com relação ao tratamento destes linfomas não é apropriada porque estas

entidades só recentemente foram bem definidas (Coiffier et al., 1999). Além disso, os tratamentos disponíveis são limitados, de modo que muitos deles são tratados de maneira semelhante (Zinzani et al., 2005). No entanto, quando se suspeita de linfoma do manto, devido ao seu maior grau de agressividade, pode estar indicada uma nova biópsia para se obter tecido adequado para a sub-classificação (Argatoff et al., 1997).

1.3. Caracterização dos antígenos

CD20 – é uma proteína transmembrana de 35kd envolvida na tradução de sinal. Ela parece ter propriedades de canal de cálcio e é associada com tirosinoquinasas. É expressa normalmente em linfócitos B maduros e em um subgrupo de linfócitos B imaturos. É também expressa na grande maioria dos linfomas de células B maduras. Como no desenvolvimento dos linfócitos B normais, esta proteína não é expressa em muitos linfomas linfoblásticos e nos plasmocitomas (Hsi et al., 2001).

CD3 – o complexo CD3 é o componente tradutor de sinal dos receptores $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ dos linfócitos T. Ele consiste de cadeias γ , δ e ϵ , e de um homodímero intracitoplasmático de cadeias ξ . Apesar de não se conhecer a exata

estequiometria do complexo CD3, acredita-se que exista uma cadeia γ , uma cadeia δ e duas cadeias ϵ . Durante o desenvolvimento da célula T, a expressão do CD3 acompanha o rearranjo da cadeia TCR β , sendo que a expressão citoplasmática precede a forma de membrana. CD3 é um marcador específico de linfócitos T e sua expressão pode ser observada na maioria dos linfomas de células T. No entanto a negatividade para CD3 não descarta a linhagem T uma vez que sua expressão pode ser perdida nestes linfomas (Hsi et al., 2001).

CD43 – é uma sialoglicoproteína transmembrana que age nas interações célula-célula e é encontrada em linfócitos T, histiócitos e células mielóides, neoplásicas ou não. É um marcador muito sensível mas não específico da linhagem T, pois se observa expressão aberrante em vários linfomas de células B, principalmente de células pequenas (Lai et al., 1999).

CD5 – é uma glicoproteína de 67 kd da membrana celular que parece estar envolvida na modulação da sinalização de receptores de linfócitos B e T. É considerado um marcador de linfócitos T e está presente tanto em timócitos como em linfócitos T pós-tímicos. Entretanto está presente também em um pequeno subgrupo de linfócitos B não neoplásicos. É útil no diagnóstico de linfomas de células B devido a sua expressão em quase todos os casos de linfomas linfocíticos/LLC e na maioria dos linfomas do manto. Nos outros

linfomas de pequenas células B não se identifica expressão de CD5 (Dorfman et al., 1997).

CD10 – ou CALLA (antígeno da leucemia linfoblástica aguda comum) é uma metaloproteinase de 100 kd da superfície celular envolvida na modulação das respostas celulares a hormônios peptídeos, idêntica à enzima endopeptidase neutra e também conhecida como encefalinase. É expressa em muitos tipos celulares incluindo algumas linhagens de células epiteliais assim como células hematopoiéticas, tais como linfócitos e granulócitos. Não é restrita a uma linhagem linfocitária e é expressa tanto em células precursoras como em linfócitos maduros, particularmente células do centro germinativo. CD10 é útil na caracterização de linfoma/leucemia de células B ou T precursoras, linfoma folicular, linfoma de Burkitt e de subgrupos de linfoma difuso de grandes células B (McIntosh et al., 1999; Watson et al., 2000, Barcus et al., 2000 e Chu et al., 2000).

CD23 – é uma glicoproteína de membrana do tipo II que é um receptor de baixa afinidade para IgE. Tem também homologia com lectinas animais dependentes de cálcio e interage com outras moléculas da superfície celular tais como CD21, CD11b e CD11c, sugerindo que ela também está envolvida nas interações entre células. É expressa em vários tipos de células incluindo linfócitos B ativados. Sua expressão em linfomas tem relevância no

diagnóstico, uma vez que é observada na maioria dos linfomas linfocíticos/LLC, enquanto é geralmente ausente nos linfomas do manto (Dorfman et al., 1994; Kumar et al., 1996 e DiRaimondo et al., 2002).

Bcl-2 – o gen *BCL2* localizado no cromossomo 18q21, codifica uma proteína da membrana mitocondrial interna de 25 kd, que desempenha um papel central na proteção celular contra apoptose ou morte celular programada. A translocação deste gen com o gen da cadeia pesada da imunoglobulina no cromossomo 14q32, é a translocação mais frequentemente observada nos linfomas foliculares. Esta translocação t(14;18) leva a hiperexpressão da proteína bcl-2 nestes linfomas. Como o centro germinativo reacional não expressa bcl-2, a detecção desta proteína é muito útil no diagnóstico diferencial entre linfoma folicular e hiperplasia folicular (Lai et al., 1998 e Baliga et al., 2002).

Ciclina D1 – é o produto do gen *CCND1*, localizado no cromossomo 11q13. Está envolvida na progressão do ciclo celular em G1, e é ativada por meio de rearranjo em um subgrupo de adenomas de paratireóide e linfomas. A proteína ciclina D1 se liga a quinase p34 do ciclo celular e dirige as células de G1 para a fase S. A translocação t(11;14)(q13;q32) envolvendo o gen *CCND1* e o gen da cadeia pesada da imunoglobulina é encontrada na grande maioria dos linfomas do manto, nos quais se observa uma

hiperexpressão nuclear. A ciclina D1 é expressa também em carcinomas de mama, carcinomas epidermóides, tricoleucemias e plasmocitomas, mas não em linfócitos normais (Hankin et al., 1999 e Miranda et al., 2000).

CD21 e CD35 – os anticorpos anti CD21 e CD35 reconhecem os receptores de complemento C3d e C3b, respectivamente. Eles são expressos em células dendríticas foliculares, que são células apresentadoras e processadoras de antígeno, presentes nos centros germinativos. Além de marcar as neoplasias de células dendríticas, estes anticorpos são úteis por destacar a arquitetura nodal e a presença de folículos linfóides verdadeiros, os quais exibem arcabouço dendrítico folicular. Por causa da íntima relação entre a célula dendrítica folicular e os linfócitos B, espera-se que a transformação neoplásica das células B afete a arquitetura dos folículos linfóides, podendo-se utilizar estas alterações no diagnóstico dos linfomas (Bagdi et al., 2001).

1.4. Marcadores imuno-histoquímicos (IH) relacionados ao prognóstico

1.4.1. p53

O gen supressor de tumor *TP53*, localizado na banda 13.1 do braço curto do cromossomo 17 codifica um fator de transcrição que está envolvido na parada do ciclo celular e indução de apoptose em células geneticamente alteradas (Sander et al., 1993). O controle se dá por uma parada na transição entre as fases G1 e S, permitindo a reparação do DNA quando necessária. As mutações ou deleções do gen *TP53* podem facilitar a transmissão de uma alteração genética e a emergência de clones com vantagem de sobrevivência. Ele é o gen mais frequentemente alterado em câncer humano, estando mutado em aproximadamente 50% de todas as neoplasias malignas (Hsi et al., 2001).

O gen *TP53* codifica uma fosfoproteína de 53 kD que está presente no núcleo de células normais. A proteína p53 do tipo selvagem tem uma meia-vida curta e não pode ser detectada na maioria das células normais. Já a proteína p53 mutada tem uma meia-vida prolongada e torna-se detectável por métodos imuno-

histoquímicos que utilizam anticorpos monoclonais anti-p53 (Sander et al., 1993).

Em neoplasias linfóides, as mutações no gen *TP53* foram encontradas principalmente em linfomas agressivos, principalmente do tipo Burkitt. Em geral, os linfomas indolentes são p53 negativos. No entanto, tem-se cada vez mais demonstrado uma relação entre mutação do gen *TP53* e pior prognóstico nestas neoplasias, tanto por transformação da doença em um linfoma mais agressivo como por resistência ao tratamento (Wilson et al., 1997).

Apesar de alguns trabalhos terem demonstrado que a expressão de p53 por imuno-histoquímica não reflete necessariamente mutação no gen *TP53* e vice-versa, estudos mais recentes mostraram que este método de detecção tem resultados concordantes com a análise seqüencial direta na maioria dos casos, e que os poucos casos de reação imuno-histoquímica positiva na ausência de mutações detectáveis no gen *TP53* podem apresentar outros mecanismos de estabilização da proteína (Wilson et al., 1997).

Além disso, este método de detecção é mais simples, rápido e barato, podendo ser um instrumento útil tanto na avaliação do prognóstico como na indicação de tratamento em pacientes com doença mais agressiva.

1.4.2. Antígeno Ki-67

Ki-67 é um antígeno nuclear que está presente em todo o ciclo celular menos nas células em repouso (G0). Ele pode ser detectado nas células em proliferação através do uso de anticorpos monoclonais pelo método da imuno-histoquímica.

O anticorpo anti-Ki-67 (Mib-1) reconhece duas proteínas nucleares com pesos moleculares de 345 e 395 kD que são o produto de um gen localizado na banda 25 do braço longo do cromossomo 10 e é útil na avaliação do índice de proliferação celular de tumores e portanto na graduação de linfomas (Hsi et al., 2001 e Martin et al., 1995).

Do ponto de vista do diagnóstico a marcação do Ki-67 pode ser útil na caracterização de linfoma de Burkitt (quase 100% das células) versus outros linfomas de células grandes, e na diferenciação entre linfoma folicular versus folículos linfóides reativos. No linfoma do manto, altos índices de proliferação celular à apresentação (>20%) foram associados com transformação blastóide (Raty et al., 2003). Em linfomas agressivos, pode ser usado como marcador prognóstico, uma vez que aqueles que apresentam Ki-67 positivo em mais de 80% das células têm pior prognóstico (Wilson et al., 1997 e Kurtin, 1998).

2. OBJETIVOS

-
1. Analisar inicialmente a contribuição diagnóstica do estudo morfológico e de um “painel mínimo de anticorpos” na identificação dos tipos histológicos definidos na Classificação da OMS, 2001, com base em casos de linfomas originalmente incluídos nas classes “células pequenas” pela anterior categorização “Working Formulation”.
 2. Analisar a contribuição diagnóstica do uso de amplo painel imuno-histoquímico na caracterização dos casos nas entidades propostas pela OMS 2001, com especial atenção àqueles cujo diagnóstico morfológico não apresentava uma hipótese mais fortemente sugestiva na abordagem inicial.
 3. Avaliar a contribuição individual dos anticorpos deste painel para o diagnóstico final, buscando, se possível, a identificação de um painel a um tempo simplificado mas com elevada resolubilidade.
 4. Analisar a distribuição das “variáveis histológicas não definidoras” para o diagnóstico final, caracterizando as condições de diagnóstico diferencial de sua máxima aplicabilidade.

-
5. Avaliar a relevância clínica da identificação dos tipos individualizados dos linfomas de pequenas células B de acordo com a Classificação OMS 2001, em especial com relação à resposta inicial ao tratamento e à sobrevida.
 6. Avaliar a contribuição prognóstica da pesquisa da proteína p53 e do marcador de proliferação celular Ki-67 no conjunto dos linfomas de pequenas células B e nos tipos histológicos mais freqüentes.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

O protocolo deste estudo retrospectivo teve a aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob número 358/02 (Apêndice).

3.1. Casuística

Dos arquivos da Divisão de Anatomia Patológica (DAP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) foram levantados os laudos de todos os pacientes que no período de 1º de janeiro de 1991 a 31 de dezembro de 2000 receberam o diagnóstico em exame de linfonodo de linfoma não Hodgkin classificado pela WF como:

A – linfoma maligno linfocítico de pequenas células

- consistente com LLC
- plasmocitóide

B – linfoma maligno folicular predominantemente de pequenas células clivadas

- com áreas difusas
- com esclerose

E – linfoma maligno difuso de pequenas células clivadas

- com esclerose

F – linfoma maligno difuso misto de pequenas e grandes células

- com esclerose
- com componente de células epitelióides

3.2. Métodos

Utilizando-se o número de identificação dos linfonodos foram levantadas todas as lâminas e os blocos de parafina correspondentes.

Quando só os blocos de parafina foram encontrados solicitamos a feitura de novas lâminas coradas pela hematoxilina e eosina (HE).

A partir da análise destas lâminas foi selecionado para cada caso um bloco de parafina contendo fragmento de linfonodo

representativo da doença, com tamanho suficiente para a feitura de novos cortes histológicos a serem utilizados em exame imuno-histoquímico.

Foram excluídos os casos dos quais os blocos de parafina não estavam disponíveis em quantidade ou qualidade técnica satisfatória.

3.2.1. Método imuno-histoquímico

A partir dos blocos de parafina, novos cortes histológicos de 4 µm foram feitos e colocados em lâminas de vidro previamente tratadas com 3-aminopropil-trietoxisilano. A seguir foram aquecidos a 60° C durante uma noite, desparafinados com xilol e reidratados com concentrações decrescentes de etanol até água destilada.

A peroxidase endógena foi bloqueada em solução de peróxido de hidrogênio (20 volumes) com 4 imersões de 5 minutos cada.

Para recuperação dos antígenos, os cortes foram imersos em tampão citrato 0,01 mol/L em pH 6,0 (exceto ciclina D1, pH 9,0) e aquecidos em panela de pressão por 3 minutos. A seguir foram lavados em PBS.

A Tabela 1 mostra os anticorpos utilizados assim como as suas diluições.

Tabela 1 – Anticorpos utilizados para imuno-histoquímica

ANTIGENO	CLONE	MARCA	DILUIÇÃO
CD20	L26	Dako	1/1100
CD3	policlonal	Dako	1/1400
CD5	4C7	Novocastra	1/300
CD10	56C6	Novocastra	1/50
CD23	1B12	Novocastra	1/50
CD43	DF-T1	Dako	1/200
bcl-2	124	Dako	1/100
Ciclina D1	DCS-6	Dako/Novocastra	1/100
CD21	2G9	Novocastra	1/150
CD35	RLB25	Novocastra	1/400
p53	DO7	Dako	1/500
Ki-67	KiS5	Dako	1/400

A reatividade foi detectada através de incubação com anticorpos secundários anti-camundongo obtido em coelho para os anticorpos monoclonais ou anti-coelho obtido em cabra para o anticorpo policlonal anti-CD3, e um complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (DUET ou LSAB2, Dako), empregando como cromógeno 3,3 diaminobenzidina.

Cortes histológicos de tonsila palatina hiperplásica serviram como controles positivos para a maioria das reações, exceto para ciclina D1 que teve como controle positivo um caso previamente diagnosticado como linfoma do manto e p53 para o qual usamos como controle um carcinoma ductal de mama previamente demonstrado como positivo. Cortes em que foram omitidos apenas os anticorpos primários serviram como controle negativo.

A reação foi considerada positiva nas amostras com inequívoca coloração da membrana das células neoplásicas, distinta da coloração de fundo para a maioria dos anticorpos. Para os CD3, CD10, CD21 e CD35 além da coloração de membrana identificou-se também coloração citoplasmática e para o bcl-2 apenas coloração citoplasmática. Para ciclina D1, p53 e Ki-67 considerou-se positiva a coloração nuclear.

Em todas as lâminas submetidas a reação imuno-histoquímica foram adicionalmente procurados controles internos que confirmassem a sua “positividade ou negatividade”.

3.3. Caracterização das neoplasias

3.3.1. Primeira fase: Estudo morfológico

A partir do exame microscópico dos cortes corados pela hematoxilina e eosina realizado pela autora, cada neoplasia foi reclassificada utilizando-se apenas os critérios clínicos e morfológicos descritos pela OMS, 2001.

Foram também analisadas as seguintes características microscópicas:

- **aspecto nodular** – agrupamentos de células lembrando folículos linfóides primários ou secundários
- **centros de proliferação** - agrupamentos de células com núcleos pequenos, médios (pró-linfócitos) ou grandes (para-imunoblastos) e citoplasma levemente basofílico
- **fibrose** - finas faixas de tecido conjuntivo fibroso denso permeando células isoladas ou agrupadas
- **proliferação vascular** – agregados de vasos capilares por vezes com paredes hialinizadas e endotélio tumefeito

Figura 1 – Aspecto nodular em linfoma folicular (HE 50X)

Figura 2 – Centros de proliferação em linfoma linfocítico (HE 50X)

Figura 3 – Fibrose (HE 100X)

Figura 4 – Proliferação vascular (HE 200X)

3.3.2. Segunda fase: Painel mínimo – Diagnóstico inicial

Numa segunda fase, utilizando um **painel mínimo** de anticorpos constituído pelo anti-CD20 e o anti-CD3 nós estabelecemos o que denominamos de **diagnóstico inicial**.

Nesta fase os espécimes foram inicialmente divididos em 3 grupos: o dos linfomas de células B (CD20 positivos), o dos linfomas de células T (CD3 positivos) e aqueles negativos para CD20 e CD3.

Com estes dados cada amostra foi reavaliada segundo a classificação da OMS, 2001.

3.3.3. Terceira fase: Painel ampliado – Diagnóstico final

Já numa terceira fase utilizando um **painel ampliado** constituído pelos anticorpos anti-CD5, CD10, CD23, CD43, bcl-2 e ciclina D1, os linfomas de células B foram novamente subclassificados de acordo com a classificação da OMS, 2001, com o que definimos o **diagnóstico final**.

3.4. Informes adicionais obtidos por métodos imuno-histoquímicos

A presença e a forma do arcabouço de centros germinativos foi analisada através da identificação das células dendríticas utilizando os anticorpos anti- CD21 e anti-CD35.

Eles foram divididos em:

- **resquícios** de centros germinativos – agrupamentos raros, com poucas células e esparsos
- centros germinativos **residuais** – agrupamentos semelhantes ao de centros germinativos
- centros germinativos **expandidos** – agrupamentos grandes, irregulares e fragmentados

Figura 5 – Resquício de centro germinativo (células dendríticas marcadas para CD21) (IH 200X)

Figura 6 – Centro germinativo residual (células dendríticas marcadas para CD35) (IH 200X)

Figura 7 – Centro germinativo expandido (células dendríticas marcadas para CD35) (IH 200X)

Nós pesquisamos também a imunoexpressão do gen supressor de tumor *TP53* sendo considerados positivos os casos com mais de 5% das células neoplásicas apresentando núcleos fortemente corados.

Figura 8 – Imunoexpressão de p53 (IH 400X)

O índice de proliferação celular estimado pelo antígeno Ki-67 foi avaliado em “grupos” com intervalos de 5%, variando de 0-5% a 96%-100%.

Figura 9 – Imunoexpressão de antígeno Ki-67 (IH 400X)

3.5. Estadiamento

Os casos foram acompanhados pela equipe médica do Ambulatório de Linfomas não Hodgkin do Serviço de Hematologia e Hemoterapia do HC-FMUSP.

O estadiamento clínico foi realizado previamente ao início do tratamento, de acordo com a classificação de Ann Arbor (Carbone et al., 1971), revista na Reunião de Costwolds (Lister et al., 1989).

Os procedimentos utilizados para o estadiamento foram: exame físico, tomografia computadorizada de pescoço, tórax, abdome

e pelve (ou na ausência destes, raio X de tórax pósterio-anterior e perfil, e ultrassonografia de abdome e pelve) e biópsia de medula óssea.

De acordo com o diagnóstico recebido, o estadiamento clínico, e outros critérios clínicos e laboratoriais, os pacientes, receberam um dos seis tipos de tratamento que foram: observação, radioterapia localizada na massa tumoral, gastrectomia, esplenectomia e quimioterapia com ou sem antracíclicos. Alguns pacientes receberam uma combinação destas formas de tratamento.

3.6. Evolução clínica

A resposta ao tratamento foi avaliada nos pacientes que receberam quimioterapia, após o 3º ou 4º ciclos e ao final da indução, sendo empregadas as seguintes definições:

- **remissão completa** (RC) para o desaparecimento de qualquer evidência clínica da doença, ou seja, ausência da sintomatologia inicial e normalização do exame físico e das alterações radiológicas presentes antes do início do tratamento, sendo necessária a persistência desses critérios por pelo menos 4 semanas

- **remissão parcial** (RP) para redução igual ou superior a 50% da massa tumoral, persistindo por pelo menos 4 semanas após o término do tratamento
- **sem resposta** (SR) para aqueles casos em que a redução da massa tumoral foi inferior a 50%, ou nos casos em que houve progressão da doença ou o surgimento de nova lesão na vigência do tratamento ou em menos de 4 semanas da regressão ou do desaparecimento da doença

A **sobrevida global** (SG) foi medida como o intervalo em meses entre o diagnóstico e o óbito, ou a última avaliação clínica.

3.7. Análise estatística

Modelos de Função Discriminante (Tatsuoka, 1970) foram utilizados visando caracterizar grupos de linfomas, tendo como variáveis classificatórias CD20, CD3, CD43, CD5, CD10, CD23, bcl-2 e ciclina D1.

Modelos de Regressão Logística Multinomial (Siegel et al., 1988) foram ajustados utilizando como variável resposta o tipo do linfoma de acordo com o diagnóstico final e as variáveis CD5, CD10,

CD23, CD43, bcl-2 e ciclina D1. Este procedimento consiste em ajustar um modelo saturado, com todas as variáveis presentes e ir retirando uma a uma as variáveis com contribuição não significativa para explicar a variável reposta, o tipo de linfoma.

Todos os testes de associação entre duas variáveis foram feitos com base na estatística Qui-quadrado de Pearson (McCall, 1970).

As curvas de distribuição da proporção de sobreviventes foram obtidas através do Método de Kaplan e Meier (1958) para tábuas de vida.

A estatística sugerida por Breslow (1970) foi utilizada para comparação das distribuições.

O nível de significância adotado em todos os testes foi de 5%.

Utilizamos o programa “Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)” 11.0 (Chicago, EEUU) para a análise estatística de nossos dados.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da casuística

Nos arquivos da DAP-HCFMUSP foram encontrados 228 laudos de linfomas classificados como A, B, E, F, e A/E pela WF. O último item aparece porque na época do diagnóstico não foi possível diferenciar entre as categorias A e E.

Destes 228 exames, 59 (34,9%) tiveram que ser excluídos porque os blocos de parafina não apresentavam amostras em quantidade ou qualidade técnica suficientes para as análises propostas. Convém ressaltar que 22 (37,2%) deles eram revisão de lâminas provenientes de outros laboratórios, as quais haviam sido enviadas sem os blocos de parafina correspondentes.

Assim sendo foram selecionados por fim 169 linfonodos que correspondiam a 145 pacientes. Todos os dados estão expostos no Anexo 1.

Através dos dados obtidos nos prontuários observamos que destes 145 pacientes, 86 (59,3%) eram do sexo masculino e 59 (40,7%) eram do sexo feminino. A média de idade dos pacientes na

época do primeiro exame foi 57,7 anos, variando de 11 a 87 anos. Em dois casos não pudemos determinar a idade do paciente.

Em 121 identificamos o estadiamento clínico, sendo que 1 paciente encontrava-se em Estádio I, 6 em Estádio II, 9 em Estádio III e 105 em Estádio IV.

Em 19 pacientes encontramos mais de um exame de linfonodo em épocas diferentes sendo que 16 pacientes possuíam 2 exames, um paciente possuía 3 exames e dois pacientes possuíam 4 exames.

Dos 169 linfonodos examinados observamos que 130 exames foram realizados antes do tratamento e 36 foram realizados após tratamento quimioterápico. Em 3 pacientes não pudemos definir a época do exame em relação ao tratamento. Dos 33 exames pós-tratamento, 16 correspondiam a 12 pacientes que também apresentavam exame pré-tratamento. Um estudo piloto comparando os dados dos pacientes mostrou que não ocorreram divergências significativas entre os diagnósticos pré e pós-tratamento (Anexo 2). Assim sendo, consideramos pertinente continuar o estudo com todos os 169 linfonodos selecionados.

A Tabela 2 mostra os números e a porcentagem dos diagnósticos segundo a WF.

Tabela 2 – Distribuição dos casos segundo a Working Formulation (WF)

WORKING FORMULATION	N	%
A	45	26,6
B	22	13,0
E	28	16,6
F	60	35,5
A/E	14	8,3
TOTAL	169	100

Utilizando os critérios morfológicos definidos pela OMS, 2001, associados a dados clínicos tais como idade, sexo e localização do linfonodo nós pudemos através da análise dos cortes histológicos corados pelo HE chegar aos seguintes diagnósticos apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Distribuição dos casos de acordo com a classificação da OMS, 2001 utilizando apenas os dados clínicos e morfológicos

DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO	N	%
Linfoma linfocítico/LLC	39	23,1
Linfoma do manto	25	14,8
Linfoma folicular	15	8,9
Linfoma da zona marginal	3	1,8
Linfoma linfoplasmocítico	2	1,2
LLC x linfoma do manto	20	11,8
Linfoma do manto x linfoma folicular	5	3,0
Linfoma do manto x linfoma da zona marginal	2	1,2
Linfoma de pequenas células	19	11,2
Linfoma de grandes células	25	14,8
Linfoma células blastóides	5	3,0
Linfoma de grandes células X Hodgkin	2	1,2
normal x parcial	7	4,1
TOTAL	169	100

Acrescentando a esta análise os dados obtidos através da pesquisa dos antígenos CD20 e CD3 (**painel mínimo**) nos cortes histológicos submetidos à reação imuno-histoquímica, nós chegamos então ao que definimos como **diagnósticos iniciais**.

Em todos os 7 (4,1%) casos em que havia dúvida entre linfonodo parcialmente comprometido por neoplasia ou não, esta

dúvida pode ser resolvida utilizando-se apenas estes 2 marcadores, caracterizando-se 3 linfomas da zona marginal esplênica, 1 linfoma de pequenas células B e 3 linfonodos sem comprometimento neoplásico. Esta dúvida ocorreu principalmente em linfonodos de drenagem de linfoma da zona marginal extra-nodal (tipo MALT) ou de linfoma da zona marginal esplênica.

Em 2 (1,2%) casos, tanto a pesquisa de CD20 como a de CD3 resultou negativa nas células neoplásicas. Na busca do diagnóstico definitivo nós pesquisamos apenas nestes casos marcadores de linfomas de Hodgkin como o CD15 e o CD30, e de leucemias mielóides agudas como a mieloperoxidase, e pudemos firmar o diagnóstico de linfoma de Hodgkin (LH) clássico em um dos casos e leucemia mielóide aguda (LMA) no outro.

Finalmente contamos com 164 amostras de linfomas não Hodgkin, podendo definir o **diagnóstico inicial** em dois grandes grupos: o de 159 (96,9%) linfomas de células B e o de 5 (3,1%) linfomas de células T.

O grupo de linfomas de células B pode ser subdividido em 134 (84,3%) linfomas de células pequenas, 24 (15,1%) linfomas de células grandes e 1 (0,6%) linfoma de células blastóides.

O grupo de linfomas de células T pode ser dividido apenas em 2 (40%) linfomas de células T periféricas e 3 (60%) linfomas linfoblásticos T.

Analisando os linfomas de pequenas células B objetivo final do nosso estudo, observamos que em 87 (64,9%) deles, a análise morfológica complementada pelo painel mínimo de anticorpos permitiu a forte sugestão de um diagnóstico, em 27 (20,2%) deles houve dúvida entre dois diagnósticos e em 20 (14,9%) nós chegamos apenas a um diagnóstico genérico. A Tabela 4 mostra os **diagnósticos** definidos como **iniciais** neste grupo.

Tabela 4 – Diagnóstico inicial no grupo dos linfomas de pequenas células B

DIAGNÓSTICO INICIAL	N	%
Linfoma linfocítico/LLC	39	29,1
Linfoma do manto	25	18,7
Linfoma folicular	15	11,2
Linfoma da zona marginal	6	4,5
Linfoma linfoplasmocítico	2	1,5
LLC x linfoma do manto	20	14,9
Linfoma do manto x linfoma folicular	5	3,7
Linfoma do manto x linfoma da zona marginal	2	1,5
Linfoma de pequenas células B	20	14,9
TOTAL	134	100

Figura 10 – Linfonodo reacional corado para CD20 (IH 50X)

Figura 11 – Linfonodo reacional corado para CD3 (IH 50X)

Diagrama 1 – Painel mínimo: Diagnóstico inicial

Todos os casos foram então submetidos a reações imuno-histoquímicas com o **painel ampliado** de anticorpos que incluía o CD5, CD10, CD23, CD43, bcl-2 e ciclina D1 (Tabela 5).

Tabela 5 – Distribuição da reatividade de cada anticorpo do painel ampliado de acordo com o diagnóstico inicial

DIAGNÓSTICO INICIAL	CD5	CD10	CD23	CD43	bcl-2	ciclina D1	TOTAL	
	N/%	N/%	N/%	N/%	N/%	N/%	N	%
LL/LLC	38/97,4	0	36/92,3	36/92,3	39/100	0	39	29,1
LM	16/64	0	0	10/40	25/100	23/92	25	18,7
LF	0	14/93,3	0	1/6,7	13/86,7	1/6,7	15	11,2
LZM	0	0	0	0	5/83,3	0	6	4,5
LLp	0	0	0	0	2/100	0	2	1,5
LLC x LM	14/70	0	11/55	16/80	20/100	5/25	20	14,9
LM x LF	0	3/60	0	0	5/100	1/20	5	3,7
LM x LZM	0	0	0	0	2/100	0	2	1,5
LpcB	10/50	0	5/25	7/35	17/85	2/10	20	14,9
TOTAL	78/58,2	17/12,7	52/38,8	70/52,2	128/95,5	32/23,9	134	100

Com isso chegamos ao que denominamos **diagnóstico final**.

A Tabela 6 mostra os **diagnósticos iniciais e finais** nas 134 amostras de linfomas de pequenas células B.

Tabela 6 – Comparação dos diagnósticos iniciais com os diagnósticos finais

DIAGNÓSTICO FINAL							
	LL/LLC	LM	LF	LZM	LLp	LLC x LM	LpcB
DIAGNÓSTICO INICIAL	TOTAL						
LL/LLC	39						39
LM		23				2	25
LF		1	14				15
LZM				6			6
LLp					2		2
LLC x LM	11	5				3	1
LM x LF		1	3				1
LM x LZM				2			
LpcB	4	2		5		4	5
TOTAL	54	32	17	13	2	9	7

Nos 87 casos em que o diagnóstico inicial era fortemente sugestivo de um tipo de linfoma, o uso do painel ampliado confirmou este diagnóstico em 84 (96,5%) deles. Em apenas 3 (3,5%) casos o diagnóstico inicial foi modificado, como em um linfoma inicialmente

classificado como folicular que na verdade tratava-se de um linfoma do manto e dois linfomas classificados inicialmente como linfoma do manto que com as marcações imuno-histoquímicas não pudemos diferenciar de linfoma linfocítico/LLC..

Quando no diagnóstico inicial houve dúvida entre dois tipos de linfomas, o que ocorreu em 27 casos, com o uso do painel ampliado um destes tipos pode ser confirmado em 22 (81,5%) dos casos. Em 5 (18,5%) casos ou a dúvida permaneceu ou chegou-se apenas ao diagnóstico genérico de linfoma de pequenas células B.

Já nos 20 casos com diagnóstico inicial de linfoma de pequenas células B, de maneira genérica, em 11 (55%) casos pudemos chegar a um diagnóstico final através da utilização do painel ampliado. Em 4 (20%) casos, mesmo com este painel nós apenas pudemos limitar a dúvida entre dois tipos de linfomas (linfoma linfocítico/LLC versus linfoma do manto) e em 5 (25%) casos permaneceu o diagnóstico inicial genérico de linfoma de pequenas células B.

Interessante achado foi o obtido pela não exclusão das 25 amostras de linfomas de grandes células ou blastóides, nas quais o uso do painel ampliado de anticorpos permitiu o diagnóstico final em todos os casos: enquanto em 22 (88%) casos o diagnóstico de linfoma de grandes células B foi confirmado, em 3 (12%) casos houve uma mudança radical do diagnóstico para linfoma do manto, forma blastóide ou pleomórfica.

Figura 12 – Linfoma do manto blastóide (HE 400X)

Na Tabela 7 pode-se observar os padrões de reatividade de cada anticorpo do **painel ampliado** de acordo com o **diagnóstico final**.

Tabela 7 – Distribuição da reatividade de cada anticorpo do painel ampliado de acordo com o diagnóstico final

DIAGNÓSTICO FINAL	CD5	CD10	CD23	CD43	bcl-2	ciclina D1	TOTAL	
	N/%	N/%	N/%	N/%	N/%	N/%	N	%
LL/LLC	52/96,3	0	51/94,4	50/92,6	54/100	0	54	39,4
LM	20/57,1	0	0	16/45,7	35/100	35/100	35	25,5
LF	0	17/100	0	1/5,9	15/88,2	0	17	12,4
LZM	0	0	0	0	9/69,2	0	13	9,5
LLp	0	0	0	0	2/100	0	2	1,5
LLC x LM	9/100	0	0	4/44,4	9/100	0	9	6,6
LpcB	0	0	0	0	7/100	0	7	5,1
TOTAL	81/59,1	17/12,4	51/37,2	71/51,8	131/95,6	35/25,5	137	100

No Diagrama 2 pode-se observar as diversas etapas passando pelos painéis mínimo e ampliado de anticorpos até se chegar ao diagnóstico final.

Diagrama 2 – As diversas etapas até o diagnóstico final

4.2. Análise da contribuição diagnóstica dos anticorpos do painel ampliado

Na Tabela 8 são apresentados os valores dos parâmetros gerados pelos Modelos de Função Discriminante tendo como variáveis classificatórias os resultados dos estudos imuno-histoquímicos.

Tabela 8 – Correlação estatística entre os resultados imuno-histoquímicos do painel ampliado e o diagnóstico final

	LL/CLL X LM			LM X LF			LM X LZM		
	Wilks' Lambda	F	Sig.	Wilks' Lambda	F	Sig.	Wilks' Lambda	F	Sig.
CD20	a,			a,			a,		
CD3	a,			a,			a,		
CD43	,726	32,771	,000	,841	9,429	,003	,814	10,491	,002
CD5	,763	26,981	,000	,696	21,795	,000	,735	16,611	,000
CD10	a,			b,			a,		
CD 23	,130	581,629	,000	a,			a,		
bcl-2	a,			,918	4,487	,039	,755	14,907	,000
ciclina D1	b,			b,			b,		

“a” não pode ser computado porque esta variável é uma constante

“b” não pode ser computado porque esta variável é constante

Observa-se que apesar de vários dos marcadores imuno-histoquímicos terem atingido o nível de significância, os que se mostraram mais discriminantes foram o CD10, o CD23 e a ciclina D1.

Os mesmos resultados foram obtidos quando Modelos de Regressão Logística Multinomial foram ajustados para os tipos mais freqüentes de linfomas tendo como variáveis os resultados dos estudos imuno-histoquímicos (Tabela 9).

Tabela 9 – Resultados dos modelos preditivos para o tipo de linfoma em função dos marcadores imuno-histoquímicos

DIAGNÓSTICO FINAL	ANTÍGENO	F	p
Linfoma linfocítico/LLC	CD23	94,1	<0,001
Linfoma do manto	ciclina D1	189,9	<0,001
Linfoma folicular	CD10	189,9	<0,001

Figura 13 – Algoritmo diagnóstico útil para a classificação dos linfomas de pequenas células B

Figura 14 – Linfoma linfocítico/LLC corado para CD23 (IH 100X)

Figura 15 – Linfoma do manto corado para ciclina D1 (IH 400X)

Figura 16 – Linfoma folicular corado para CD10 (IH 50X)

4.3. Análise da distribuição das variáveis histológicas de acordo com o diagnóstico

4.3.1. Aspecto nodular

Na Tabela 10 e no Gráfico 1 observa-se a distribuição do aspecto nodular segundo o diagnóstico final.

Tabela 10 – Distribuição do aspecto nodular em cada classe do diagnóstico final

DIAGNÓSTICO FINAL	ASPECTO NODULAR				TOTAL	
	NÃO		SIM			
	N	%	N	%	N	%
LL/LLC	51	94,4	3	5,6	54	100
LM	11	31,4	24	68,6	35	100
LF	0	0	17	100	17	100
LZM	9	69,2	4	30,8	13	100
LLp	0	0	2	100	2	100
LLC X LM	8	88,9	1	11,1	9	100
LpcB	5	71,4	2	28,6	7	100
TOTAL	84	61,3	53	38,7	137	100

$\chi^2=71,8$; $p<0,001$

Gráfico 1 – Presença do aspecto nodular em cada classe do diagnóstico final

$$\chi^2=71,8; p<0,001$$

Nota-se associação significativa entre o diagnóstico final e o aspecto nodular, sendo este predominante além do esperado nos linfomas foliculares, nos linfomas do manto e linfoplasmocíticos, ressaltando-se que este último compõe um grupo de apenas 2 casos.

Os linfomas foliculares caracterizaram-se por formação de “folículos” em 100% dos casos, mas este aspecto não foi considerado “variável” por ser critério necessário para seu diagnóstico.

Em 68,6% dos linfomas do manto observou-se “esboços nodulares” e nos dois casos de linfomas linfoplasmocíticos deste

estudo as células neoplásicas se dispunham por entre folículos remanescentes.

4.3.2. Centros de proliferação

Na Tabela 11 e no Gráfico 2 observa-se a distribuição conjunta do diagnóstico final e dos centros de proliferação.

Tabela 11 – Distribuição dos centros de proliferação de acordo com as classes do diagnóstico final

DIAGNÓSTICO FINAL	CENTROS DE PROLIFERAÇÃO				TOTAL	
	NÃO		SIM			
	N	%	N	%	N	%
LL/LLC	11	20,4	43	79,6	54	100
LM	35	100	0	0	35	100
LF	17	100	0	0	17	100
LZM	13	100	0	0	13	100
LLp	2	100	0	0	2	100
LLC X LM	9	100	0	0	9	100
LpcB	7	100	0	0	7	100
TOTAL	94	68,6	43	31,4	137	100

$\chi^2 = 96,3$; $p < 0,001$

Gráfico 2 – Presença de centros de proliferação em cada classe do diagnóstico final

$$\chi^2 = 96,3; p < 0,001$$

Nota-se associação significativa entre o diagnóstico final e a presença de centros de proliferação.

O linfoma linfocítico/LLC foi o único que apresentou centros de proliferação, que ocorreram em 79,6% dos casos. Estes centros de proliferação apareceram destacados nas reações imuno-histoquímicas para CD23. Nos cortes histológicos de linfoma linfocítico/LLC submetidos a reações imuno-histoquímicas que resultaram negativas, a coloração pela hematoxilina também facilitou a visualização destes centros de proliferação.

4.3.3. Fibrose

Na Tabela 12 e no Gráfico 3 observa-se a distribuição da fibrose de acordo com o diagnóstico final.

Tabela 12 – Distribuição da fibrose de acordo com as classes do diagnóstico final

DIAGNÓSTICO FINAL	FIBROSE				TOTAL	
	NÃO		SIM			
	N	%	N	%	N	%
LL/LLC	46	85,2	8	14,8	54	100
LM	23	65,7	12	34,3	35	100
LF	13	76,5	4	23,5	17	100
LZM	8	61,5	5	38,5	13	100
LLp	1	50	1	50	2	100
LLC X LM	6	66,7	3	33,3	9	100
LpcB	4	57,1	3	42,9	7	100
TOTAL	101	73,7	36	26,3	137	100

$\chi^2=7,7$; $p=0,262$

Gráfico 3 – Presença de fibrose em cada classe do diagnóstico final

$$\chi^2=7,7; p=0,262$$

Não foi evidenciada associação significativa entre o diagnóstico final e a presença de fibrose.

No entanto, merece destaque o fato de que em alguns dos tipos de linfomas como o do manto e o da zona marginal encontraram-se áreas de fibrose em 34,3% e 38,5% respectivamente, e esta não estava associada com tratamento quimioterápico prévio.

4.3.4. Proliferação vascular

Na Tabela 13 e no Gráfico 4 observa-se a distribuição da proliferação vascular em função do diagnóstico final.

Tabela 13 – Distribuição da proliferação vascular de acordo com cada classe do diagnóstico final

DIAGNÓSTICO FINAL	PROLIFERAÇÃO VASCULAR				TOTAL	
	NÃO		SIM			
	N	%	N	%	N	%
LL/LLC	23	42,6	31	57,4	54	100
LM	17	48,6	18	51,4	35	100
LF	11	64,7	6	35,3	17	100
LZM	7	53,8	6	46,2	13	100
LLp	1	50	1	50	2	100
LLC X LM	4	44,4	5	55,6	9	100
LpcB	3	42,9	4	57,1	7	100
TOTAL	66	48,2	71	51,8	137	100

$\chi^2=2,84$; p=0,829

Gráfico 4 – Presença de proliferação vascular em cada classe do diagnóstico final

$$\chi^2=2,84; p=0,829$$

Não foi encontrada associação significativa entre a presença de proliferação vascular e o diagnóstico final.

Apesar da maioria dos casos apresentar algum grau de proliferação vascular, esta também não estava relacionada com tratamento quimioterápico anterior.

4.4. Análise da distribuição das células dendríticas de acordo com o diagnóstico

Na Tabela 14 e no Gráfico 5 observa-se a distribuição dos agrupamentos de células dendríticas segundo o diagnóstico final.

Tabela 14 – Distribuição dos diversos tipos de agrupamentos de células dendríticas de acordo com cada classe do diagnóstico final

DIAGNÓSTICO FINAL	CÉLULAS DENDRÍTICAS									
	Não		Resquícios		CG		CG		TOTAL	
					residuais		expandidos			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
LL/LLC	26	48,1	18	33,3	5	9,3	5	9,3	54	100
LM	1	2,9	4	11,4	1	2,9	29	82,9	35	100
LF	0	0	0	0	1	5,9	16	94,1	17	100
LZM	1	7,7	1	7,7	3	23,1	8	61,5	13	100
LLp	0	0	0	0	2	100	0	0	2	100
LLC X LM	1	11,1	3	33,3	1	11,1	4	44,4	9	100
LpcB	0	0	0	0	0	0	7	100	7	100
TOTAL	29	21,2	26	19,0	13	9,5	69	50,4	137	100

$\chi^2=103,9$; $p<0,001$

Gráfico 5 – Presença dos diversos tipos de agrupamentos de células dendríticas em cada classe do diagnóstico final

de agrupamento das células dendríticas e o diagnóstico final.

Em 81,4% dos casos de linfoma linfocítico/LLC estes agrupamentos estão ausentes ou são apenas resquícios, enquanto na maioria dos outros linfomas predominam os agrupamentos expandidos. Assim como a variável histológica “aspecto nodular”, chama a atenção a presença de agregados de células dendríticas reativas a CD21 e CD35, e também a CD23 nos linfomas foliculares e nos linfomas do manto.

4.5. Relevância clínica da classificação da OMS 2001

Foram analisados os dados clínicos dos 116 pacientes que correspondiam aos 137 linfonodos diagnosticados como linfomas indolentes.

4.5.1. Avaliação da resposta inicial

Na Tabela 15 observa-se a resposta inicial ao tratamento quimioterápico em função do diagnóstico final.

Tabela 15 – Resposta inicial à quimioterapia de acordo com o diagnóstico final

DIAGNÓSTICO FINAL	RESPOSTA INICIAL						TOTAL	
	Completa		Parcial		Progressão			
	N	%	N	%	N	%	N	%
LL/LLC	10	28,6	21	60,0	4	11,4	35	100
LM	3	15,0	14	70,0	3	15,0	20	100
LF	6	42,9	8	57,1	0	0	14	100
LZM	3	42,9	4	57,1	0	0	7	100
LLp	0	0	0	0	1	100	1	100
LLC X LM	1	33,3	2	66,7	0	0	3	100
LpcB	2	40,0	2	40,0	1	20,0	5	100
TOTAL	25	29,4	51	60,0	9	10,6	85	100

$\chi^2=15,43$; $p=0,219$

Com base nos dados disponíveis não foi possível evidenciar associação significativa entre o diagnóstico final e a resposta inicial ao tratamento, nos 85 (73,2%) casos dos quais conseguimos recuperar estes dados, a partir da análise dos prontuários.

No entanto pode-se observar que a maioria dos casos apresentou resposta parcial à quimioterapia.

4.5.2. Avaliação da evolução da doença

Na Tabela 16 nota-se a distribuição da evolução da doença segundo o diagnóstico final.

Tabela 16 – Padrão de evolução da doença de acordo com o diagnóstico final

DIAGNÓSTICO FINAL	EVOLUÇÃO									
	Estável		Progressão		Óbito em 3 anos		Óbito após 3 anos		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
LL/LLC	12	35,3	4	11,8	7	20,6	11	32,4	34	100
LM	5	20,8	5	20,8	11	45,8	3	12,5	24	100
LF	8	66,7	2	16,7	1	8,3	1	8,3	12	100
LZM	7	70,0	2	20,0	0	0	1	10,0	10	100
LLp	1	100	0	0	0	0	0	0	1	100
LLC X LM	1	20,0	1	20,0	3	60,0	0	0	5	100
LpcB	2	50,0	0	0	1	25,0	1	25,5	4	100
TOTAL	36	40,0	14	15,6	23	25,6	17	18,9	90	100

$\chi^2=26,8$; $p=0,082$

Baseado nos 90 (77,6%) casos que tiveram acompanhamento médio de 39 meses (variando de 0 a 120 meses), não foi possível apontar associação entre o diagnóstico final e a

evolução da doença. Entretanto, há indícios de associação entre estas variáveis com os casos diagnosticados como linfoma do manto ou linfoma do manto X LLC apresentando evolução pior que os outros casos. O teste estatístico com $\chi^2=26,8$ e nível descritivo de $p=0,082$ está muito próximo do nível de significância adotado neste trabalho de 5%.

Quando estes mesmos 90 casos foram agrupados de acordo com o que consideramos evolução favorável (estável + óbito após 3 anos) e evolução desfavorável (progressão + óbito em 3 anos), como visualizado no Gráfico 6, torna-se mais nítida a diferença entre os casos diagnosticados como linfoma do manto ou linfoma do manto X LLC em relação aos outros tipos de linfomas ($\chi^2=14,9$; $p=0,021$).

Gráfico 6 – Evolução clínica favorável e desfavorável de acordo com o diagnóstico final

$$\chi^2 = 14,9; p=0,021$$

4.5.3. Sobrevida

No Gráfico 7 observam-se as curvas de sobrevida ajustadas segundo o diagnóstico final.

Gráfico 7 – Curvas de sobrevida de acordo com o diagnóstico final

E na Tabela 17 observa-se o tempo médio de sobrevida em função do diagnóstico final.

Tabela 17 – Tempo médio de sobrevida de acordo com o diagnóstico final

DIAGNÓSTICO FINAL	TMS (meses)	I.C. 95%
Linfoma linfocítico/LLC	66	[51 --- 82]
Linfoma do manto	39	[28 --- 50]
Linfoma folicular	100	[75 --- 125]
Linfoma da zona marginal	101	[88 --- 113]
Linfoma linfoplasmocítico	N/R	-
Linfoma do manto X LLC	48	[18 --- 77]
Linfoma de pequenas células B	46	[21 --- 70]

As diferenças acima apontadas foram significativas tendo a estatística de Breslow valor igual a $B=18,06$ com $p=0,006$.

Pode-se notar que o tempo médio de sobrevida dos casos diagnosticados como linfoma folicular e linfoma da zona marginal foram equivalentes e os mais elevados (~100 meses); os casos de linfoma linfocítico/LLC ficaram com tempo médio de sobrevida intermediário (66 meses) e os casos de linfoma do manto apresentaram a menor média (39 meses). Os casos de linfoma do manto X LLC e os de linfoma de pequenas células B genérico tiveram poucas observações e seus valores médios (48 e 46 meses, respectivamente) ficaram entre os de linfoma linfocítico/LLC e os de linfomas do manto.

4.6. Fatores prognósticos

4.6.1. Imunoexpressão da proteína p53 e sobrevida

Nos Gráficos 8 e 9 observam-se as curvas de sobrevida ajustadas à imunoexpressão da proteína p53.

Gráfico 8 – Curva de sobrevida do conjunto de casos em relação à imunoexpressão da proteína p53

B=3,23; p=0,072

Gráfico 9 – Imunoexpressão de p53 de acordo com o diagnóstico final

Há fortes indícios de influência da imunoexpressão da proteína p53 no tempo de sobrevida. A estatística de Breslow comparando estas duas distribuições foi $B=3,23$ com $p=0,072$, valor muito próximo de 5%. Não foi possível evidenciar melhor a diferença porque após 40 meses o grupo dos casos com p53 positivo ficou com apenas 2 pacientes.

No Gráfico 10 observa-se o efeito da imunoexpressão da proteína p53 nos casos com os diagnósticos finais mais freqüentes.

Gráfico 10 – Curvas de sobrevida em relação à imunoeexpressão de p53 dos três tipos mais frequentes de linfomas

Da análise destas distribuições foi possível estimar o tempo médio de sobrevida dos casos que receberam estes

diagnósticos segundo a presença ou não de imunoexpressão da proteína p53 (Tabela 18).

Tabela 18 – Tempo médio de sobrevida em relação à imunoexpressão de p53 dos três principais tipos de linfomas

DIAGNÓSTICO FINAL	TMS		Breslow	p
	p53 -	p53 +		
Linfoma linfocítico/LLC	70 meses [53 --- 88]	39 meses [27 --- 51]	3,32	0,068
Linfoma do manto	42 meses [29 --- 55]	33 meses [10 --- 57]	3,47	0,062
Linfoma folicular	N/E	98 meses [72 --- 124]	3,46	0,063

Pode-se então concluir que há indícios de que os pacientes com imunoexpressão da proteína p53 no linfoma linfocítico/LLC e no linfoma do manto possuem menor tempo de sobrevida.

4.6.2. Influência do índice de proliferação celular na sobrevida

No Gráfico 11 evidenciam-se as curvas de sobrevida em função do índice de proliferação celular medido através da detecção do antígeno Ki-67 ($\leq 20\%$ ou $>20\%$).

Gráfico 11 – Curvas de sobrevida em relação ao índice de proliferação celular (Ki-67 $\leq 20\%$ ou Ki-67 $>20\%$)

B=1,87; p=0,172.

No Gráfico 12 observam-se indícios de influência significativa do índice de proliferação celular no tempo de sobrevida, principalmente até os 40 meses.

Quanto aos valores médios, como foram superiores a 40 meses, a diferença observada não foi significativa. Para $Ki-67 \leq 20\%$ o tempo médio de sobrevida foi igual a 73 meses com IC [57 --- 89]; para $Ki-67 > 20\%$ a média foi igual a 70 meses com IC [55 --- 85].

Gráfico 12 – Índice de proliferação celular (Ki-67 $\leq$ 20% ou Ki-67 $>20\%$) de acordo com o diagnóstico final

No Gráfico 13 observam-se as curvas de sobrevida dos três principais tipos de linfomas diagnosticados de acordo com o índice de proliferação celular ($Ki-67 \leq 20\%$ ou $>20\%$).

Gráfico 13 – Curvas de sobrevida em relação ao índice de proliferação celular (Ki-67 $\leq$ 20% ou Ki-67 >20%) dos três tipos de linfomas mais frequentes

Nos casos diagnosticados como linfoma linfocítico/ LLC ou linfoma folicular não se identifica a influência do índice de proliferação celular nas curvas de sobrevida. Já nos casos de linfoma do manto foi observada diferença significativa no comportamento das curvas de sobrevida em função deste índice ($B=8,40$; $p=0,004$).

Na Tabela 19 vê-se o tempo médio de sobrevida para os três principais tipos de linfomas segundo o índice de proliferação.

Tabela 19 – Tempo médio de sobrevida em relação ao índice de proliferação celular ($Ki-67 \leq 20\%$ ou $Ki-67 > 20\%$) dos três principais tipos de linfomas

DIAGNÓSTICO FINAL	TMS		Breslow	p
	Ki-67 $\leq 20\%$	Ki-67 $> 20\%$		
Linfoma linfocítico/LLC	69 meses [47 --- 91]	62 meses [43 --- 81]	0,45	0,504
Linfoma do manto	54 meses [40 --- 68]	28 meses [17 --- 39]	8,40	0,004
Linfoma folicular	N/E	92 meses [61 --- 123]	2,50	0,113

Evidencia-se que a igualdade das distribuições levou a médias iguais para os casos diagnosticados como linfoma linfocítico/LLC. Já nos casos diagnosticados como linfoma do manto a diferença nas distribuições levou a diferentes tempos médios de sobrevida.

5. DISCUSSÃO

O diagnóstico e a classificação dos linfomas sofreram uma radical transformação na última década, partindo de um sistema puramente morfológico (WF,1982) para um sistema que usa os conhecimentos da seqüência de maturação biológica dos linfócitos e de seu perfil de expressão antigênica determinável por métodos imunológicos (REAL,1994), culminando com a classificação oficializada pela OMS em 2001.

Na visão atual, o estudo morfológico dos cortes histológicos corados pela HE persiste como a base do diagnóstico dos linfomas, sendo a imunofenotipagem a técnica auxiliar mais utilizada, através da Citometria de Fluxo ou principalmente por Imuno-histoquímica. Os hematopatologistas modernos baseiam-se na imuno-histoquímica tanto para diferenciar um processo neoplásico de alterações de natureza reacional, quanto para uma classificação precisa dos linfomas (Hsi et al., 2001). A imuno-histoquímica permite também que se faça o diagnóstico em biópsias pequenas, anteriormente inadequadas para o exame (Singh et al., 1997 e Watson et al., 2000).

O presente estudo traz a abordagem do patologista cirúrgico quanto ao atual estado de compreensão das ferramentas para o diagnóstico dos linfomas de pequenas células B.

Para tal, nós levantamos 169 linfonodos da DAP-HC utilizando a WF como base para incluirmos todos os linfomas de células pequenas diagnosticados de 1991 a 2000.

A fase inicial deste estudo baseou-se na análise morfológica dos cortes histológicos corados pela HE complementada apenas com o painel mínimo que incluiu os anticorpos anti-CD20 e anti-CD3. Com este procedimento inicial pudemos separar os linfomas B dos T e diferenciar linfonodos sem neoplasia daqueles parcialmente comprometidos por linfoma.

Nesta casuística observamos que casos de linfoma de Hodgkin e mesmo de leucemia mielóide aguda, baseando-se apenas na morfologia, podem ocasionalmente gerar dificuldades relevantes com os linfomas não Hodgkin. O Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project (1997), estudando 1403 casos diagnosticados como linfoma não Hodgkin entre 1988 e 1990, em 9 centros diferentes, observou também que 25 deles (1,8%) não eram linfomas não Hodgkin. Nos nossos casos, a ausência de marcação para CD20 e CD3 deu uma pista deste fato. Esta etapa, entretanto, não permitiu a subclassificação adequada dos linfomas B de pequenas células nas entidades reconhecidas pela OMS, 2001.

Os 134 (79,3%) linfonodos definidos como linfomas de pequenas células B foram então o objetivo central do nosso estudo. O grupo composto por estes linfomas é bastante heterogêneo clinicamente, apesar de morfologicamente haverem muitas semelhanças entre eles. A imunofenotipagem permite que se faça na maioria das vezes uma classificação adequada. Vários autores (Yang et al., 1994; de Leon et al., 1998; Tworek et al., 1998; Kurtin et al., 1999; Chen et al., 2000; Korin et al., 2000 e Watson et al., 2000) testaram painéis imuno-histoquímicos utilizando anticorpos mono e policlonais em tecidos congelados ou fixados em formalina para chegar ao diagnóstico de linfomas de pequenas células. No entanto todos eles utilizaram estes painéis em casos típicos, representativos de cada entidade descrita na classificação da OMS, 2001.

Neste nosso trabalho, a aplicação do painel ampliado incluindo CD5, CD10, CD23, CD43, bcl-2 e ciclina D1 resultou em diagnóstico definitivo em 118 (88,1%) linfomas de células pequenas B, restando 16 (11,9%) ainda indefinidos.

Quando nos baseando apenas no estudo morfológico associado ao painel mínimo sugerimos fortemente um diagnóstico, conseguimos com a imuno-histoquímica comprovar este diagnóstico em 96,5% dos casos restando apenas 3,5% casos sem diagnóstico definitivo. Isto aconteceu em 2 casos inicialmente diagnosticados como linfoma do manto, que pela falta de expressão de ciclina D1 não pudemos diferenciar de linfoma linfocítico/LLC e em um caso de

linfoma considerado folicular que foi reclassificado como linfoma do manto.

Quando com o estudo morfológico associado à pesquisa de CD20 e CD3 ficamos na dúvida entre 2 diagnósticos, o número de casos nos quais conseguimos comprovar um dos diagnósticos passou para 81,5%, ficando então 18,5% dos casos sem diagnóstico definitivo. Estes incluíram 4 casos inicialmente diagnosticados como linfoma linfocítico/LLC x linfoma do manto, sendo que 3 deles mantiveram o diagnóstico inicial e o último foi chamado de linfoma de pequenas células B, e um caso de linfoma do manto x linfoma folicular que também recebeu apenas aquela denominação genérica.

Quando o diagnóstico inicial foi de apenas linfoma de pequenas células B, a adoção do painel ampliado permitiu a conclusão diagnóstica em 55,5%. Nos demais 45,0% não pudemos firmar um diagnóstico definitivo, ficando 20,0% entre dois diagnósticos e 25,0% mantendo o diagnóstico inicial.

Analisando-se individualmente a contribuição de cada anticorpo para o diagnóstico final, observamos que entre os linfomas de pequenas células encontrados em linfonodos, todos são CD20 positivos e CD3 negativos. Isto está de acordo com de Leon et al. (1998) e Kurtin et al. (1999) que mostraram positividade para CD20 em todos os seus 139 casos de linfomas de células pequenas, sendo 55 casos do primeiro e 84 do último autor. No entanto, CD20 e CD3 têm um papel fundamental na diferenciação entre linfonodos sem ou com

comprometimento parcial pela neoplasia. Permitir a distinção entre um processo benigno e um maligno é uma das utilidades da imunofenotipagem segundo Hsi et al. (2001) que também cita a possibilidade de se firmar diagnóstico em biópsias pequenas. O padrão de coloração do CD20, mais fraco no linfoma linfocítico/LLC, e do CD3, salientando o aspecto nodular nos linfomas folicular e do manto, também colaboraram com o diagnóstico final. Uma coloração muito fraca para o CD20 é citada por vários autores, entre eles Pileri et al. (2000) que destacam a sua relevância frente ao aumento do uso terapêutico de anticorpos anti-CD20. Entretanto tais achados não permitiram a distinção entre os diversos linfomas aqui classificados como de células pequenas.

Outro marcador bastante utilizado em Citometria de Fluxo que neste trabalho teve uma contribuição pequena foi o CD5 (Dorfman et al., 1997 e Watson et al., 2000). Na população dos linfomas de células pequenas, diagnosticados em linfonodos, observamos que a grande maioria (66,4% dos nossos casos) é constituída por linfoma linfocítico/LLC ou linfoma do manto, sendo ambos positivos para CD5. O outro linfoma de células pequenas mais comum em linfonodos é o linfoma folicular (12,7% dos nossos casos) que por sua típica morfologia nodular pode em grande parte das vezes ser diferenciado dos outros dois. Seu marcador característico, CD10 (McIntosh et al., 1999; Barcus et al., 2000 e Dogan et al., 2000), colaborou mais nestes

casos do que o CD5, sendo positivo em 100% dos linfomas foliculares e negativo em todas as nossas outras amostras.

Em seus 84 casos típicos de linfomas de células pequenas Kurtin et al. (1999) também encontraram CD10 positivo apenas nos linfomas foliculares. Já Dogan et al. (2000), analisando 24 linfomas da zona marginal extra-nodal (tipo MALT), 19 linfomas do manto e 13 linfomas da zona marginal esplênica não observaram positividade para CD10 em nenhum deles, enquanto dos 39 linfomas foliculares nodais, 36 eram fortemente positivos para CD10. E Barcus et al. (2000), em 23 linfomas foliculares observaram 3 casos negativos para CD10.

No presente estudo, pesquisamos adicionalmente dois anticorpos anti-bcl-6 (clones P1F6 - Novocastra e PG-B6p - Dako) que haviam sido postulados por Cattoretti et al. (1995), Pittaluga et al. (1996) e Raible et al. (1999) como marcador de linfoma folicular. No entanto, em nossa rotina habitual de processamento de amostras, não obtivemos uma coloração das células neoplásicas que as destacassem do fundo e por isso os abandonamos.

O antígeno CD5 foi detectado em 78 (58,2%) dos nossos linfomas de pequenas células, sendo mais positivo no linfoma linfocítico/LLC (97,4%) do que nos linfomas do manto (64,0%). Quando comparados com a literatura, os nossos casos de linfoma do manto tiveram um baixo índice de positividade para CD5, contrastando com os relatos de Liu et al. (2002) que usando citometria de fluxo e imuno-histoquímica em 235 casos de linfoma do manto, demonstraram

positividade para CD5 em 210 (89,4%) deles e de Bosch et al. (1998) que avaliando 57 casos de linfoma do manto notaram imunoexpressão de CD5 em 55 (96%) deles. Talvez o fato de utilizarmos material com tempo de fixação em formalina irregular e muitos anos de emblocagem em parafina tenha influenciado os nossos resultados.

Nove (6,7%) casos deste nosso estudo exibiram reatividade apenas para CD5, mas não para CD23 e ciclina D1, e portanto o diagnóstico diferencial entre linfoma linfocítico/LLC e linfoma do manto não pode ser realizado.

Na atual pesquisa, um marcador que teve uma contribuição mais relevante foi o CD23, sendo positivo em 94,4% dos linfomas linfocíticos/LLC e negativo em todos os outros linfomas de células pequenas, inclusive nos linfomas do manto, seu principal diagnóstico diferencial. Este importante achado corrobora evidência prévia de Kurtin et al. (1999) que em 84 casos de linfomas linfocíticos identificaram apenas um caso CD23 negativo. Já em três de seus 26 casos de linfoma folicular e em um caso de linfoma da zona marginal nodal ele demonstrou positividade para CD23. Nos nossos casos de linfomas foliculares o CD23 destacou apenas a rede de células dendríticas e talvez o caso de Kurtin et al. (1999) diagnosticado como linfoma da zona marginal nodal fosse melhor classificado como linfoma linfocítico.

Relevante contribuição da nossa pesquisa de CD23 ocorreu em 3 casos que foram imunorreativos para CD23 e negativos

para CD5, nos quais firmamos o diagnóstico de linfoma linfocítico/LLC. Em dois a presença de centros de proliferação evidentes foi forte indício morfológico, mas no terceiro, com morfologia incomparável, a positividade forte para CD23, e a ausência de CD10 e ciclina D1 foi essencial para este diagnóstico.

Deve-se considerar que a maioria das publicações que relatam positividade de CD23 em linfoma do manto são baseadas em citometria de fluxo (Dorfman et al., 1994; Kumar et al., 1996; Gong et al., 2001 e DiRaimondo et al., 2002). Em uma publicação recente que descreve CD23 positivo em 18 linfomas do manto, em apenas um dos 5 casos positivos na análise imuno-histoquímica a coloração era intensa (Schlette et al., 2003).

O marcador que mais contribuiu no diagnóstico diferencial, neste nosso trabalho foi a ciclina D1, oncoproteína hiperexpressa na translocação t(11;14)(q13;q32), característica do linfoma do manto (de Boer et al., 1995; Zukerberg et al., 1995; Bosch et al., 1998; Campo et al., 1999; Chan et al., 1999; Liu et al., 2002). A experiência que adquirimos neste estudo leva-nos a postular que sua positividade deve ser obrigatória para se fazer este diagnóstico e excluir as outras possibilidades, diferentemente de Watson et al. (2000) que em seu estudo com 25 linfomas do manto demonstraram expressão de ciclina D1 em apenas 22 deles. Neste trabalho ele não revela se os casos negativos para ciclina D1 estavam entre aqueles positivos para CD23 ou CD10, o que para nós mudaria a classificação original para linfoma

linfocítico e linfoma folicular respectivamente. Também não fica claro se para o diagnóstico inicial foram utilizados outros métodos de detecção de antígenos tais como citometria de fluxo ou imuno-histoquímica em material congelado.

Já em seu estudo com 55 casos de linfomas de células pequenas com diagnóstico firmado utilizando cortes histológicos corados pela HE, e na maioria deles também por citometria de fluxo de Leon et al. (1998) descreveram ciclina D1 fortemente positiva em um de seus 16 casos de linfoma linfocítico. Ao nosso ver este caso também seria melhor classificado como linfoma do manto.

Mais recentemente Cheuk et al. (2004) mostraram com o uso de um anticorpo monoclonal obtido em coelho contra ciclina D1 (SP4), mais sensível que o utilizado por nós, raros casos de linfoma linfocítico/LLC positivos.

O'Malley et al. (2005) relataram também um caso de linfoma linfocítico/LLC como centros de proliferação característicos que apresentava positividade para ciclina D1 em alguns pró-linfócitos e para-imunoblastos. Neste caso, métodos de FISH e citogenética convencional demonstraram trissomia do cromossomo 12 e ausência da translocação t(11;14). Eles referem que este mesmo sendo um fato muito incomum, deve ser pensado como possível causa de erro no diagnóstico.

Além dos linfomas de células pequenas, a ciclina D1 foi positiva também em um caso com morfologia blastóide e em 2 casos

com células grandes. É importante identificar estes casos de linfoma do manto blastóide pois eles têm um prognóstico pior (Weisenburger et al., 2000 e Leoncini et al., 2005).

Os outros 2 marcadores, o CD43 e o bcl-2 não contribuíram para o diagnóstico final. Alguns autores demonstraram entretanto que eles podem ajudar principalmente no diagnóstico diferencial entre um processo reacional e um linfoma. Isto é especialmente importante quando encontramos um infiltrado linfocitário CD20 positivo que expressa também CD43 ou quando nódulos semelhantes a centros germinativos expressam bcl-2 (Lai et al., 1998 e Lai et al., 1999). Estudando 778 casos de linfomas não Hodgkin, Lai et al. (1998) observaram que dos 638 linfomas de pequenas células B, 546 (85,6%) eram positivos para bcl-2, enquanto dos nossos 134 casos, 128 (95,5%) foram positivos para bcl-2.

Os linfomas da zona marginal, que ainda não apresentam marcadores fortemente característicos, compreenderam 13 (7,7%) dos nossos casos. Eles foram diagnosticados em linfonodos de drenagem de linfomas MALT (5) ou de linfomas da zona marginal esplênica (8). Talvez alguns dos casos por nós denominados linfomas de pequenas células B sem outra especificação sejam na verdade linfomas da zona marginal nodal, os quais são extremamente raros e ainda hoje não apresentam marcadores disponíveis para uso na rotina diagnóstica.

Os dois espécimes de linfomas linfoplasmocíticos eram morfológicamente típicos, CD5, CD10, CD23 e ciclina D1 negativos, e

associados a Macroglobulinemia de Waldestrom. Sua escassez nesta casuística impede qualquer análise detalhada.

De modo resumido, nossos achados demonstram que a morfologia associada ao pequeno painel de CD20 e CD3 favoreceu fortemente um diagnóstico em 64,9% dos linfomas de células pequenas B e que o estudo completo com o painel ampliado permitiu o diagnóstico final em 88,1% deles.

O estudo crítico da imunorreatividade de cada anticorpo do painel ampliado, nesta série diagnóstica, seleciona 3 marcadores: CD10, CD23 e ciclina D1 que a nosso ver são os que mais contribuem no diagnóstico diferencial de linfomas de pequenas células em linfonodos. Utilizando-os em um painel simplificado podemos confirmar o diagnóstico morfológico ou modificá-lo mesmo nos casos mais difíceis, deixando apenas uma pequena porcentagem (11,9%) sem diagnóstico definitivo.

Estes casos requerem anticorpos mais sensíveis ou outros métodos complementares como citogenética, FISH, citometria de fluxo ou PCR para que seja firmado o diagnóstico.

5.1. Contribuição das variáveis histológicas não definidoras

Analisando as variáveis histológicas observa-se que o aspecto nodular pode ser encontrado em vários tipos de linfomas tais como o linfoma do manto, o linfoma folicular e o linfoma linfoplasmocítico, mostrando forte associação com estes tipos ($\chi^2=71,8$; $p<0,001$). No entanto, apesar de poder ser confundido com os centros de proliferação, em nenhum dos espécimes de linfoma linfocítico/LLC nós encontramos este aspecto nodular que lembra folículos linfóides primários ou secundários e que é típico do linfoma folicular. Portanto, em um linfoma de pequenas células B o aspecto nodular deve falar contra a possibilidade de linfoma linfocítico/LLC.

Já os centros de proliferação por alguns considerados típicos do linfoma linfocítico/LLC (Bonato et al., 1998) estiveram presentes em 43 (79,6%) dos espécimes com este diagnóstico e em nenhum dos outros tipos de linfoma ($\chi^2=96,3$; $p<0,001$). Na maioria destes espécimes (90,7%) o perfil imuno-histoquímico também era típico de linfoma linfocítico/LLC, com imunorreatividade para CD5 e CD23.

Nosso presente estudo, portanto, corrobora a idéia de a presença de centros de proliferação em um linfoma de pequenas células B deve dirigir o diagnóstico para linfoma linfocítico/LLC, mas sua ausência (20,4% de nossos casos) não exclui tal diagnóstico.

Quanto à presença de fibrose, nós pudemos depreender que além de não estar associada com o tratamento (Anexo 2), também não está relacionada com o tipo do linfoma de pequenas células B ($\chi^2=7,7$; $p=0,262$).

O mesmo ocorreu com a presença de proliferação vascular que não pode ser associada com o tratamento (Anexo 2) e também não está relacionada com o tipo de linfoma de pequenas células B ($\chi^2=2,84$; $p=0,829$).

Onciu et al. (2002) não observaram também diferenças significativas com relação ao uso de quimioterapia entre pacientes que apresentaram imunofenótipos discordantes em dois sítios anatômicos diferentes.

5.2. Contribuição da análise das células dendríticas

A análise dos diversos tipos de agrupamentos de células dendríticas, melhor destacados pela marcação do CD21 e do CD35, assim como do CD23, mostrou que os agrupamentos residuais, semelhantes aos dos centros germinativos e os agrupamentos expandidos, que são maiores, irregulares e fragmentados predominaram na maioria dos tipos de linfoma de pequenas células B, exceto no linfoma linfocítico/LLC ($\chi^2=103,9$; $p<0,001$). Nestes, as

células dendríticas estavam ausentes ou dispostas em arranjos esparsos, com poucas células. Portanto estas últimas características, além de favorecer a possibilidade de linfoma linfocítico/LLC torna pouco provável a possibilidade de se tratar de um dos outros tipos de linfomas de pequenas células B.

Em linfomas foliculares, Bagdi et al. (2001) descreveram folículos anormais com uma rede de células dendríticas densa, marcadamente definida e expandida. Além disso identificaram uma associação entre diminuição das células dendríticas e transformação para linfoma difuso de grandes células B.

Shiozawa et al. (2003) também descreveram o desaparecimento de células dendríticas foliculares CD21 positivas precedendo a transformação de linfoma folicular para linfoma difuso.

Kurtin (1998), Campo et al. (1999) e Swerdlow et al. (2002), também observaram em linfomas do manto uma rede de células dendríticas foliculares proeminentes tanto nos casos com padrão nodular como naqueles com padrão difuso.

5.3. Aspectos clínicos

Um objetivo secundário deste estudo foi a avaliação do impacto clínico da alocação dos casos em uma das entidades da nova classificação da OMS.

Os limites desta análise são:

- retrospectiva
- não controlada
- não padronização da quimioterapia
- adesão irregular ao tratamento

Devemos, entretanto, considerar que à época do diagnóstico não havia consenso quanto a esquemas terapêuticos específicos.

Quando analisamos a resposta inicial do paciente ao primeiro tratamento quimioterápico não pudemos evidenciar associação significativa desta variável com o tipo de linfoma de pequenas células B ($\chi^2=24,3$; $p=0,145$).

Isto reflete uma das características destes linfomas: todos são incuráveis com as terapias vigentes (Coiffier et al., 1999, Montillo et al., 2005). Assim sendo, o objetivo do tratamento é melhorar a qualidade de vida, principalmente diminuindo as massas tumorais e os sintomas. Para tanto, e como a maioria destes pacientes está na 6ª ou

7ª década de vida, os esquemas terapêuticos em uso utilizam doses mais baixas dos diversos quimioterápicos.

Já quando avaliamos a evolução da doença observamos que nos casos diagnosticados como linfoma do manto ou naqueles em que persistiu a dúvida entre linfoma do manto *versus* LLC, a evolução da doença tendeu a ser menos favorável, apesar do teste estatístico não mostrar uma associação forte entre estas duas variáveis ($\chi^2=26,8$; $p=0,082$). Se agruparmos os casos que permaneceram estáveis com aqueles que foram a óbito após 3 anos do diagnóstico (evolução favorável) e os casos que tiveram progressão da doença com aqueles que foram a óbito até 3 anos após o diagnóstico (evolução desfavorável) fica mais nítida a diferença de evolução dos casos com diagnóstico de linfoma do manto e LLC X linfoma do manto em relação aos outros linfomas diagnosticados ($\chi^2=14,9$; $p=0,021$).

Isto está de acordo com a literatura que mostra um comportamento mais agressivo do linfoma do manto do que dos outros linfomas de pequenas células B (Chan et al., 2001 e Leoncini et al., 2005). Apesar desta maior agressividade ele ainda permanece incurável com as terapias vigentes. Porém devemos fazer todos os esforços (CF, IH, citogenética, FISH, PCR) para separá-lo do restante do grupo, pois só assim poderemos analisar novos esquemas terapêuticos (Cerny et al., 2002).

Para avaliarmos a evolução da doença analisamos também as curvas de sobrevida ajustadas segundo o diagnóstico final.

Através delas e da análise do tempo médio de sobrevida pudemos observar que apesar de todos serem considerados como linfomas indolentes, os casos diagnosticados como linfoma folicular e linfoma da zona marginal tiveram uma sobrevida maior que os casos de linfoma linfocítico/LLC e que estes também sobreviveram mais tempo que os casos diagnosticados como linfoma do manto.

É importante notar que os casos que não puderam ser diferenciados entre linfoma linfocítico/LLC e linfoma do manto e aqueles que receberam o diagnóstico genérico de linfoma de pequenas células B, apesar de serem poucos, apresentaram valores de tempo de sobrevida que ficaram entre os de linfoma linfocítico/LLC e os de linfoma do manto. Isto mostra que com anticorpos mais sensíveis ou outros métodos complementares nós provavelmente classificaríamos estes casos entre estes dois tipos de linfomas, um deles mais indolente (linfoma linfocítico/LLC) e o outro mais agressivo (linfoma do manto).

5.4. Fatores prognósticos

Nós também procuramos marcadores imuno-histoquímicos que possam estar relacionados com o prognóstico destes linfomas.

Quando analisamos os nossos casos como um todo, observamos que existem fortes indícios de que a mutação do gen

TP53, identificada indiretamente pela presença de acúmulo da proteína p53 no núcleo da células, é um fator de mau prognóstico (B=3,23; p=0,072). Provavelmente com um maior número de casos ficasse mais nítida a diferença no tempo de sobrevida.

Quando analisamos os três principais tipos de linfomas diagnosticados em separado podemos observar que esta diferença se mantém tanto no linfoma linfocítico/LLC como no linfoma do manto.

Wilson et al. (1997) demonstraram concordância entre a hiperexpressão da proteína p53 detectada por imuno-histoquímica e mutações no gen *TP53*. Também Harris et al. (2001) em um estudo sobre transformação de linfomas indolentes para linfomas agressivos citam as mutações do gen *TP53* como um dos eventos moleculares envolvidos. Para eles, um dos mecanismos seria por um aumento na resistência a drogas.

Cordone et al., 1998 além de identificarem uma forte correlação entre positividade para p53 por método imuno-citoquímico e mutações no gen *TP53* detectadas por sequenciamento direto do cDNA (RT-PCR), também demonstraram em seu estudo com 181 pacientes portadores de linfoma linfocítico/LLC que as mutações deste gen estão relacionadas com pior resposta a terapia e uma sobrevida mais curta.

Oscier et al. (2002) em um estudo com 205 pacientes com linfoma linfocítico/LLC, utilizando citometria de fluxo e RT-PCR para detectar perda ou mutações do gen *TP53* mostraram que elas podem ser consideradas um fator de prognóstico ruim.

Já Palestro et al. (1997), avaliando 54 casos de linfoma linfocítico/LLC por imuno-histoquímica não conseguiram demonstrar correlação entre mutação no gen *TP53* e prognóstico, talvez devido ao pequeno número de casos positivos (11).

Izban et al. (2000) em um trabalho com 24 casos de linfoma do manto, sendo 17 formas típicas e 7 blastóides, mostraram um maior número de células expressando p53 nestes últimos, sem no entanto apresentar uma diferença com significância estatística.

Em um estudo com 30 pacientes portando linfomas com a translocação t(11;14)(q13;q32) típica do linfoma do manto, Louie et al. (1995) mostraram que casos que expressaram p53 à imuno-histoquímica tanto ao diagnóstico como na recidiva tiveram um pior prognóstico. Nenhum de seus casos era blastóide.

Entre os 53 casos de linfoma do manto estudados por Greiner et al. (1996), 8 (15%) apresentavam mutações no gen *TP53* detectadas tanto por PCR como por imuno-histoquímica, sendo 2 dos 32 casos com morfologia típica (6,3%) e 6 dos 21 casos de formas variantes (28,6%). Houve uma diferença significativa na sobrevida média dos pacientes com mutações no gen *TP53* quando comparados com aqueles sem mutações (1,3 anos *versus* 5,1 anos). Um dos mecanismos moleculares por eles aventados para explicar esta diferença seria a perda de regulação da ciclina D1 pelo p53, levando a um índice mitótico e uma fração de proliferação maiores nas variantes blastóides do linfoma do manto.

Sander et al. (1993) examinando biópsias seqüenciais de 34 pacientes com linfomas foliculares transformados identificaram expressão da proteína p53 em 10 casos, concluindo que aproximadamente 25% a 30% dos linfomas foliculares se transformam para uma forma agressiva através de uma via que envolve mutação do gen *TP53*.

Já Shiozawa et al. (2003) estudando 35 casos de linfomas foliculares não conseguiram demonstrar diferenças significativas na expressão de p53 entre casos transformados e não transformados, nem correlacionar com a sobrevida global. Para eles o melhor marcador de transformação para um linfoma difuso de grandes células B seria o desaparecimento das células dendríticas CD21 positivas.

Outro marcador imuno-histoquímico que é utilizado como fator prognóstico em muitas neoplasias é o antígeno Ki-67, uma vez que ele reflete a proliferação celular.

Quando avaliamos o índice de proliferação celular medido pela pesquisa do antígeno Ki-67 ($\leq 20\%$ ou $> 20\%$) nos nossos casos como um todo, observamos indícios de influência significativa deste índice sobre o tempo de sobrevida ($B=1,87$; $p=0,172$), com os pacientes apresentando índices mais baixos sobrevivendo por um tempo maior.

Ao analisarmos este parâmetro nos casos com os diagnósticos mais freqüentes (linfoma linfocítico/LLC, linfoma do manto

e linfoma folicular) em separado, observamos que tanto nos casos de linfoma linfocítico/LLC como nos de linfoma folicular a influência deste índice nas curvas de sobrevida é pequena. Já nos casos de linfoma do manto ocorreu uma diferença significativa entre as curvas mostrando que as formas mais agressivas têm um índice de proliferação maior. Estes índices de proliferação celular mais altos estão associados com as variantes blastóide ou pleomórfica do linfoma do manto (Ott et al., 1994 e Izban et al., 2000).

Em 1994, Pich et al. mostraram em um estudo com 41 pacientes portadores de linfomas malignos de grau intermediário (WF-F) que o índice de proliferação celular medido pelo número de células positivas para o antígeno Ki-67 está diretamente relacionado com a fração de células em fase S.

Em um estudo com 54 casos de linfoma linfocítico/LLC Palestro et al. (1997) mostraram uma tendência a um curso mais indolente nos casos com menores índices de proliferação.

Já nos linfomas do manto Izban et al. (2000), Raty et al. (2002) e Raty et al. (2003) demonstraram uma forte correlação entre altos índices de proliferação celular e pior prognóstico, sendo que os mais altos índices foram observados nas formas variantes, que têm um comportamento mais agressivo.

Nos linfomas foliculares Martin et al. (1995) e Shiozawa et al. (2003) observaram associação entre o índice de proliferação celular medido pelo Ki-67 e o grau do linfoma, com o grau 3 apresentando os

índices mais altos. Além disso o índice de proliferação não foi um fator preditivo independente nem de sobrevida livre de doença nem de sobrevida global.

6. CONCLUSÕES

-
1. Um painel mínimo de anticorpos constituído por anti-CD20 e anti-CD3, além de segregar os linfomas B e T, mostrou-se útil na diferenciação entre linfonodos comprometidos por linfoma ou não. Seu uso associado ao padrão morfológico não permitiu, entretanto, a adequada classificação dos diversos subtipos de linfomas de pequenas células B.
 2. A adoção, no presente estudo, de painel amplo de anticorpos, permitiu o incremento de diagnóstico de 64,9% com o painel mínimo para identificação plena de 88,1% dos linfomas de pequenas células B.
 3. A seleção de um painel simplificado composto por anticorpos anti-CD10, anti-CD23 e anti-ciclina D1 permitiu a classificação da maioria dos linfomas de pequenas células B, sendo portanto esta a nossa recomendação de painel mínimo.
 4. As variáveis histológicas que mais contribuíram para a classificação dos linfomas de pequenas células B foram os centros de proliferação (presentes no linfoma linfocítico) e o aspecto nodular (ausente no linfoma linfocítico).

-
5. A classificação morfológica e imuno-histoquímica precisa permite a segregação do linfoma do manto como o de pior prognóstico e do linfoma da zona marginal como o de melhor prognóstico. Tal seleção poderá ser decisiva nas novas perspectivas terapêuticas.
 6. Há forte indício de correlação entre a imunoexpressão da proteína p53 e a sobrevida nos subtipos mais freqüentes de linfomas de pequenas células B, tendo os pacientes positivos para p53 uma sobrevida menor.
 7. Nos pacientes com linfoma do manto foi observada diferença significativa na sobrevida entre aqueles com baixos índices de proliferação celular, medidos pela imunoexpressão do antígeno Ki-67, e aqueles com altos índices de proliferação celular, estes últimos com um tempo de sobrevida menor.

7. ANEXOS

Anexo 1 – Lista dos 169 linfonodos de acordo com as diversas variáveis

No.	Caso	RGHC	Idade	Sexo	No.biópsia	WF	Diag. Morf.	Diag. Final	CD20	CD3	CD43	CD5
1	1	13506870A	79	M	43-5928-3	F	LGC	LGCB	+	-	-	-
2	2	13511369A	44	M	44-2842-0	A/E	LPC	LLC x LM	+	-	+	+
3	3	2051109B	63	F	B91-14257	F	LGC	LGCB	+	-	-	-
4	4	2112011A	76	F	B92-7200	A	LPC	LPCB	+	-	-	-
5	,		79	F	20-9956-0	A	LLC x LM	LPCB	+	-	-	-
6	5	2136504D	63	F	B92-3903	A	LPC	LM	+	-	+	+
7	6	2144490K	69	F	34-7448-8	A	LLC	LLC	+	-	+	+
8	7	2174135G	60	F	13-6280-1	F	LLC x LM	LLC	+	-	+	+
9	8	2181081I	84	M	44-9441-5	F	LGC	LTP	+	+	+	+
10	9	2393236C	53	F	35-6422-3	F	LLC	LLC	+	-	+	+
11	10	2430397B	87	F	32-8424-7	B	LF	LF	+	-	-	-
12	11	2450529A	63	F	B92-16757	A	LLC x LM	LLC x LM	+	-	+	+
13	12	2454154D	67	M	14-8483-4	A	LLC	LLC	+	-	+	+
14	,		70	M	26-9116-7	A	LLC	LLC	+	-	+	+
15	13	2465368K	56	M	27-5293-0	F	LLC x LM	LLC x LM	+	-	+	+
16	,		59	M	38-8065-6	F	LPC	LM	+	-	+	+
17	14	2477107K	69	M	41-1774-3	E	R x L	LZM	+	-	-	-
18	15	2489478E	44	F	B91-12745	B	LM x LF	LF	+	-	-	-
19	16	2528269E	81	F	B91-14277	B	R x L	R	,	,	,	,
20	17	2562094D	65	F	B92-13679	F	LLC	LLC	+	-	+	+
21	18	2562474E	45	M	B91-7084	F	LGC	LM	+	-	+	+
22	19	2646250H	53	M	B92-4729	E	LGC	LGCB	+	-	-	-
23	20	2657164E	85	F	19-2107-0	F	LM	LM	+	-	+	-
24	21	2660294J	64	F	B91-1760	F	LGC	LGCB	+	-	-	-
25	22	2663770G	53	F	15-8608-4	A	LPC	LZM	+	-	-	-
26	23	2667417J	65	F	12-7145-8	F	LLC x LM	LLC	+	-	+	+
27	24	2745067D	60	M	17-8179-0	B	LM	LM	+	-	+	-
28	25	2754282E	79	M	41-9975-8	A/E	LM	LM	+	-	+	+
29	26	2758856J	60	F	B92-5775	E	LM	LM	+	-	-	-
30	27	2762886C	68	F	32-7495-0	F	LGC	LM	+	-	-	+
31	28	2766111D	41	M	B92-4457	A	LLC	LLC	+	-	+	+
32	,		41	M	B92-11020	F	LLC	LLC	+	-	+	+
33	29	2766127F	66	M	B91-607	F	LM	LM	+	-	+	+
34	30	2766874J	78	F	B92-6068	A	LLC	LLC	+	-	+	+
35	31	2773291G	74	M	B91-1140	B	LF	LF	+	-	+	-
36	32	2782506E	70	M	B91-3822	E	LPC	LLC x LM	+	-	-	+
37	33	2785770K	35	F	B91-3894	F	LGC	LTP	-	-	+	-
38	34	2788284I	74	M	B91-5906	A	LPC	LLC x LM	+	-	-	+
39	35	2798569C	60	M	B92-17022	F	LLC	LLC	+	-	+	+
40	36	2799123J	41	M	B92-7533	A	R x L	LZM	+	-	-	-
41	37	2799161K	66	F	39-9210-1	A/E	R x L	LZM	+	-	-	-
42	38	2802081C	68	F	B91-9246	A	LLC x LM	LLC	+	-	+	+
43	39	4696J 310238	51	M	B91-11391	F	LM	LM	+	-	-	-
44	,		53	M	12-9838-0	F	LM	LM	+	-	+	-
45	40	2818380K	58	F	B91-13078	B	LM x LF	LM	+	-	-	-
46	,		58	F	B91-13147	B	LM	LM	+	-	-	+
47	41	2822306I	72	M	B91-13580	E	LLC x LM	LM	+	-	+	-
48	42	2822516I	18	M	B92-228	A	R x L	R	,	,	,	,
49	43	2827191C	55	F	B92-8200	F	LGC	LGCB	+	-	-	-
50	44	2829644G	61	M	B92-1350	A	LLC	LLC	+	-	+	+
51	,		64	M	19-0964-9	A	LLC	LLC	+	-	+	+
52	45	2841252F	42	M	B92-3906	E	LLC	LLC	+	-	-	+
53	46	5280A L3294	49	M	B92-6993	E	LPC	LPCB	+	-	-	-
54	47	2846507A	71	M	B92-15859	F	LZM	LZM	+	-	-	-
55	48	2856768A	79	M	B92-15323	F	LLC x LM	LLC	+	-	+	+
56	49	2870455D	30	F	B92-12195	F	LGC	LGCB	+	-	-	-
57	50	2874577E	40	M	B92-14050	E	LM	LM	+	-	+	+
58	51	2876303F	11	F	B92-12893	F	LGC	LGCB	+	-	-	-
59	52	2876922J	66	M	B92-12929	E	LLC	LLC	+	-	+	+
60	53	2877503D	55	M	B92-13687	A	LLC	LLC	+	-	+	+

"continua"

											"continuação"		
No.	Caso	RGHC	Idade	Sexo	No.biópsia	WF	Diag. Morf.	Diag. Final	CD20	CD3	CD43	CD5	
61	,		56	M	13-9977-2	F	LLC	LLC	+	-	+	+	
62	,		58	M	19-5663-9	A	LLC	LLC	+	-	+	+	
63	,		61	M	32-0809-5	A	LLC	LLC	+	-	+	+	
64	54	2879328B	42	F	13-9042-2	F	LPC	LZM	+	-	-	-	
65	55	2891541A	,	M	19-7691-5	E	LLC x LM	LM	+	-	+	+	
66	56	2891896B	49	F	13-9525-4	B	LF	LF	+	-	-	-	
67	57	14845C L3910	72	M	12-7303-5	F	LM	LM	+	-	+	+	
68	58	2896788D	59	M	13-1367-3	A	LM	LM	+	-	-	+	
69	,		59	M	13-9761-3	A	LF	LM	+	-	-	-	
70	59	2897657B	17	M	12-9845-3	F	LBI	LLT	-	+	+	-	
71	60	2901823G	65	M	13-1242-1	B	LM x LF	LPCB	+	-	-	-	
72	61	2905336A	65	M	13-3189-2	A	LLC x LM	LLC	+	-	-	+	
73	,		68	M	26-3998-0	E	LLC	LLC	+	-	-	+	
74	62	2907448D	78	F	41-4207-1	A	LLC	LLC	+	-	-	+	
75	63	1613A L1790E	83	F	45-3841-2	A/E	LLC	LLC	+	-	+	+	
76	64	2917586F	74	F	14-4570-7	E	LM	LM	+	-	-	-	
77	,		77	F	26-1111-2	E	LM	LM	+	-	-	-	
78	65	7604F L31272	45	M	13-8935-1	F	LLC	LLC	+	-	+	+	
79	,		50	M	32-4662-0	A	LLC x LM	LLC	+	-	+	+	
80	,		50	M	35-1307-6	A	LPC	LLC	+	-	+	+	
81	,		50	M	35-1510-9	A	LPC	LLC	+	-	+	+	
82	66	2922586C	39	F	18-4875-5	E	R x L	R	,	,	,	,	
83	67	2947453D	68	M	15-6237-1	E	LZM	LZM	+	-	-	-	
84	68	2962027E	63	M	15-6258-4	E	LM	LLC x LM	+	-	-	+	
85	69	2964361J	34	M	15-6232-0	F	LBI	LLT	-	+	+	-	
86	70	2966288B	60	M	16-0024-9	F	LZM	LZM	+	-	-	-	
87	71	2967553J	18	F	16-4256-1	A	LPC	LZM	+	-	-	-	
88	,		18	F	16-4285-5	A	LPC	LZM	+	-	-	-	
89	72	2973844C	57	M	16-2849-6	A	LLC	LLC	+	-	+	-	
90	73	2979725D	37	F	18-2790-1	A	LLC	LLC	+	-	+	+	
91	74	2988511G	47	M	16-8198-2	A	LPC	LZM	+	-	-	-	
92	,		47	M	17-0608-0	A	LGC	LGCB	+	-	-	-	
93	,		48	M	19-2125-8	F	LGC	LGCB	+	-	-	-	
94	75	2998328J	41	M	38-7663-2	F	LGC	LGCB	+	-	-	-	
95	76	3016239B	82	F	31-2389-8	F	LB x LH	LH	-	-	-	-	
96	77	3021461A	36	M	24-3856-9	E	LLC x LM	LLC	+	-	+	-	
97	78	3034707B	50	M	26-1088-4	F	LLC x LM	LLC x LM	+	-	+	+	
98	79	3047657C	61	M	20-2948-0	F	LLC	LLC	+	-	+	+	
99	,		66	M	37-9571-3	A/E	LPC	LLC	+	-	+	+	
100	80	3053409E	53	F	20-8731-6	A	Llp	Llp	+	-	-	-	
101	,		55	F	28-8425-9	A	Llp	Llp	+	-	-	-	
102	81	3084521B	39	M	23-8288-1	F	LGC	LGCB	+	-	-	-	
103	82	3090179I	65	M	23-7013-1	F	LGC	LGCB	+	-	-	-	
104	83	3090810H	56	M	22-2728-2	E	LLC x LM	LM	+	-	-	-	
105	84	3093780I	40	M	22-4883-2	B	LF	LF	+	-	-	-	
106	85	3094507G	61	M	23-7012-3	A	LLC	LLC	+	-	+	+	
107	86	3124743D	78	F	24-8809-4	B	LF	LF	+	-	-	-	
108	87	3130911J	56	M	24-7316-0	F	LGC	LGCB	+	-	-	-	
108	88	3132163D	78	M	40-3873-8	F	LGC	LGCB	+	-	-	-	
110	89	3135769C	66	F	25-5830-0	A	LM x LZM	LZM	+	-	-	-	
111	90	3138510I	54	F	25-7806-9	B	LF	LF	+	-	-	-	
112	91	3139239A	54	F	25-2814-2	F	LM	LM	+	-	+	-	
113	92	3142021E	45	M	25-8174-4	E	LLC	LLC	+	-	+	+	
114	93	3143348H	40	M	26-0106-0	E	LM	LM	+	-	-	+	
115	94	3150218H	65	M	26-8460-8	E	LM	LM	+	-	-	+	
116	95	3159701H	40	F	26-5757-0	B	LF	LF	+	-	-	-	
117	96	3169468K	67	F	27-2088-4	E	LM	LM	+	-	+	+	
118	97	3176451H	69	F	27-8521-8	E	LLC x LM	LM	+	-	+	-	
119	98	3180032I	80	M	34-6194-7	A/E	LM	LM	+	-	-	+	
120	99	3181015G	36	F	28-5133-4	F	LF	LF	+	-	-	-	
121	100	3185958B	27	F	29-6488-0	B	LM x LF	LF	+	-	-	-	
122	101	3186500C	48	F	28-8328-7	B	LF	LF	+	-	-	-	
123	102	3191544F	45	M	29-4355-7	E	LLC x LM	LM	+	-	-	-	
124	103	3193214F	66	M	29-4366-2	F	LF	LF	+	-	-	-	
125	104	3196563I	71	M	34-9899-9	A/E	LLC	LLC	+	-	+	+	

"continua"

"continuação"												
No.	Caso	RGHC	Idade	Sexo	No.biópsia	WF	Diag. Morf.	Diag. Final	CD20	CD3	CD43	CD5
126	105	3197548E	67	F	29-9111-0	A	LLC	LLC	+	-	+	+
127	106	3197555E	61	M	29-9108-0	A	LLC x LM	LLC	+	-	+	+
128	,		62	M	32-1439-7	F	LLC x LM	LLC	+	-	+	+
129	107	3202512D	58	F	30-4625-7	F	LGC	LGCB	+	-	+	-
130	108	3203139B	53	F	30-7140-5	E	LLC	LLC	+	-	+	+
131	109	3204155F	68	M	30-4714-8	F	LGC	LGCB	+	-	-	-
132	,		68	M	32-4663-9	F	LGC	LGCB	+	-	-	-
133	110	3218444E	47	M	31-9365-9	F	LM	LM	+	-	+	+
134	111	3225360E	64	M	38-9965-9	A/E	LLC	LLC	+	-	+	+
135	112	3227600A	77	F	32-7707-0	A/E	LLC x LM	LLC	+	-	+	+
136	113	3230600H	67	M	33-0083-8	F	LBI	LMA	-	-	+	-
137	114	3233413F	62	M	33-2301-3	E	LLC	LLC	+	-	+	+
138	115	3234686B	67	M	33-2693-4	A	LLC	LLC	+	-	+	+
139	116	3243254F	22	M	34-1169-9	A	LGC	LGCB	+	-	-	-
140	117	3247024C	53	F	35-8408-9	A	LLC	LLC	+	-	+	+
141	118	3247972I	27	F	35-5620-4	F	LPC	LPCB	+	-	-	-
142	,		27	F	5-5620-4	F	LPC	LPCB	+	-	-	-
143	119	3259120I	76	F	35-6751-6	A	LPC	LLC	+	-	+	+
144	120	3271147B	61	M	37-0918-3	F	LM	LM	+	-	-	+
145	121	3274372H	69	F	39-0367-2	A/E	LLC	LLC	+	-	+	+
146	122	3281688G	35	M	37-9567-5	B	LM x LF	LF	+	-	-	-
147	123	3292368C	61	F	39-0761-9	A	LLC	LLC	+	-	+	+
148	124	3301694E	68	M	39-3338-5	E	LM	LM	+	-	-	+
149	125	3303132B	43	F	39-5427-7	A/E	LLC	LLC	+	-	+	+
150	126	3317197H	61	F	40-6662-6	F	R x L	LPCB	+	-	-	-
151	127	3317920D	53	M	41-0805-1	B	LF	LF	+	-	-	-
152	128	3320690B	60	M	45-9431-2	F	LGC	LGCB	+	-	-	-
153	129	3329286C	59	M	43-0720-8	A/E	LM x LZM	LZM	+	-	-	-
154	130	3333149G	59	M	43-5454-0	A/E	LLC	LLC	+	-	+	+
155	131	3336062H	59	F	42-7343-5	A/E	LPC	LLC x LM	+	-	-	+
156	132	3349552C	68	M	45-6173-2	F	LBI	LM	+	-	-	+
157	133	4016511G	62	M	30-9894-0	F	LLC	LLC	+	-	+	+
158	134	4037609C	81	F	B91-874	B	LF	LF	+	-	-	-
159	135	4059438C	65	M	16-0449-0	F	LBI	LLT	-	+	+	+
160	136	5003190B	70	M	B91-495	A	LLC x LM	LLC	+	-	+	+
161	137	5012201A	70	M	15-8497-9	E	LM	LLC x LM	+	-	-	+
162	138	5125234E	70	M	21-6857-0	B	LF	LF	+	-	-	-
163	139	5148664H	67	M	14-2676-1	B	LM	LM	+	-	-	+
164	140	5246678D	69	M	37-9568-3	A	LLC	LLC	+	-	+	+
165	141	5287995D	74	M	45-2448-9	F	LGC	LGCB	+	-	-	-
166	142	5296921F	77	F	45-4805-1	F	LGC	LGCB	+	-	-	-
167	143	6010123J	15	M	B92-10282	F	LB x LH	LGCB	+	-	-	-
168	144	L31027130	38	M	12-9950-6	B	LF	LF	+	-	-	-
169	145	L32984278	?	M	23-2188-2	B	LM	LM	+	-	-	-

"conclusão"

Anexo 1 - Continuação

No.	Caso	CD10	CD23	bcl-2	ciclinaD1	CD21	CD35	p53	ki-67	Céls. Dend.	Asp.Nod.	Cent.prol.
1	1	+	-	+	-	-	-	+	30%	RCG	Não	Não
2	2	-	-	+	-	-	-	+	50%	Ausentes	Não	Não
3	3	-	-	+	-	-	-	-	25%	CGE	Não	Não
4	4	-	-	+	-	-	-	-	15%	CGE	Não	Não
5	,	-	-	+	-	-	-	-	15%	CGE	Não	Não
6	5	-	-	+	+	-	-	-	20%	Ausentes	Não	Não
7	6	-	+	+	-	-	-	-	5%	Ausentes	Não	Sim
8	7	-	+	+	-	-	-	-	25%	Ausentes	Não	Sim
9	8	-	-	-	-	-	-	-	75%	CGE	Não	Não
10	9	-	+	+	-	-	-	-	20%	CGE	Não	Sim
11	10	+	-	+	-	-	-	-	30%	CGE	Sim	Não
12	11	-	-	+	-	-	-	-	5%	RCG	Não	Não
13	12	-	+	+	-	-	-	-	20%	RCG	Não	Sim
14	,	-	+	+	-	-	-	-	5%	Ausentes	Não	Sim
15	13	-	-	+	-	-	-	-	20%	CGE	Sim	Não
16	,	-	-	+	+	-	-	+	30%	CGE	Não	Não
17	14	-	-	+	-	-	-	-	5%	CGE	Não	Não
18	15	+	-	+	-	-	-	-	25%	CGE	Sim	Não
19	16	,	,	,	,	,	,	,	,	CGR	Não	Não
20	17	-	+	+	-	-	-	-	5%	RCG	Não	Sim
21	18	-	-	+	+	-	-	+	55%	CGE	Não	Não
22	19	+	-	+	-	-	-	+	45%	CGE	Não	Não
23	20	-	-	+	+	-	-	-	25%	RCG	Sim	Não
24	21	-	-	-	-	-	-	-	55%	RCG	Não	Não
25	22	-	-	-	-	-	-	-	30%	CGR	Não	Não
26	23	-	+	+	-	-	-	-	35%	RCG	Não	Não
27	24	-	-	+	+	-	-	+	20%	RCG	Sim	Não
28	25	-	-	+	+	-	-	+	35%	CGE	Sim	Não
29	26	-	-	+	+	-	-	-	35%	CGE	Sim	Não
30	27	-	-	+	+	-	-	-	45%	CGE	Sim	Não
31	28	-	+	+	-	-	-	-	25%	Ausentes	Não	Sim
32	,	-	+	+	-	-	-	-	25%	Ausentes	Não	Sim
33	29	-	-	+	+	-	-	-	20%	CGE	Não	Não
34	30	-	-	+	-	-	-	-	5%	CGR	Não	Sim
35	31	+	-	+	-	-	-	-	55%	CGE	Sim	Não
36	32	-	-	+	-	-	-	-	5%	CGE	Não	Não
37	33	-	-	-	-	-	-	-	55%	Ausentes	Não	Não
38	34	-	-	+	-	-	-	-	5%	CGR	Não	Não
39	35	-	+	+	-	-	-	-	25%	Ausentes	Não	Sim
40	36	-	-	-	-	-	-	-	10%	CGR	Não	Não
41	37	-	-	+	-	-	-	-	5%	CGR	Sim	Não
42	38	-	+	+	-	-	-	-	5%	RCG	Não	Não
43	39	-	-	+	+	-	-	-	5%	CGE	Sim	Não
44	,	-	-	+	+	-	-	-	55%	CGE	Sim	Não
45	40	-	-	+	+	-	-	+	75%	CGE	Sim	Não
46	,	-	-	+	+	-	-	+	75%	CGE	Sim	Não
47	41	-	-	+	+	-	-	-	5%	CGE	Sim	Não
48	42	,	,	,	,	,	,	,	,	CGR	Não	Não
49	43	-	-	-	-	-	-	-	55%	CGE	Não	Não
50	44	-	+	+	-	-	-	-	5%	Ausentes	Não	Sim
51	,	-	+	+	-	-	-	-	25%	Ausentes	Não	Sim
52	45	-	+	+	-	-	-	-	10%	Ausentes	Não	Sim
53	46	-	-	+	-	-	-	-	5%	CGE	Sim	Não
54	47	-	-	+	-	-	-	-	35%	CGE	Não	Não
55	48	-	+	+	-	-	-	+	15%	RCG	Não	Sim
56	49	-	-	-	-	-	-	+	75%	CGE	Não	Não
57	50	-	-	+	+	-	-	-	10%	CGE	Não	Não
58	51	-	+	+	-	-	-	-	65%	RCG	Não	Não
59	52	-	+	+	-	-	-	-	10%	RCG	Não	Sim
60	53	-	+	+	-	-	-	-	15%	RCG	Não	Sim

"continua"

"continuação"												
No.	Caso	CD10	CD23	bcl-2	ciclinaD1	CD21	CD35	p53	ki-67	Céls. Dend.	Asp.Nod.	Cent.prol.
61	,	-	+	+	-	-	-	-	35%	Ausentes	Não	Sim
62	,	-	+	+	-	-	-	-	15%	RCG	Não	Sim
63	,	-	+	+	No. - Caso	CD10	CD23	bcl-2	ciclinaD1	CD21	CD35	Cent.prol.
64	54	-	-	-	126 - 105	- -	- +	- +	40%	CGE -	-Sim -	29%
65	55	-	-	+	127 + 106	- -	- +	- +	10%	RCG -	-Não -	30%
66	56	+	-	+	128 - ,	- -	- +	- +	25%	CGE -	-Sim +	34%
67	57	-	-	+	129 + 107	- -	- -	- +	45%	CGE -	-Sim -	89%
68	58	-	-	+	130 + 108	- -	- +	- +	50%	CGE -	-Não -	10%
69	,	-	-	+	131 + 109	- +	- -	- +	50%	CGE -	-Sim -	45%
70	59	+	-	+	132 - ,	- +	- -	- +	55%	CGR -	-Não +	80%
71	60	-	-	+	133 - 110	- -	- -	- +	15%	CGE -	-Sim +	54%
72	61	-	+	+	134 - 111	- -	- +	- +	25%	RCG -	-Não -	15%
73	,	-	-	+	135 - 112	- -	- +	- +	35%	CGE -	-Não +	35%
74	62	-	-	+	136 - 113	- -	- -	- +	25%	CGE -	-Não +	85%
75	63	-	+	+	137 - 114	- -	- +	- +	25%	CGE -	-Não -	35%
76	64	-	-	+	138 + 115	- -	- +	- +	15%	CGE -	-Sim -	19%
77	,	-	-	+	139 + 116	- +	- -	- -	20%	CGE -	-Sim +	55%
78	65	-	+	+	140 - 117	- -	- +	- +	35%	RCG -	-Não +	29%
79	,	-	+	+	141 - 118	- -	- -	- +	15%	Ausentes	-Não -	30%
80	,	-	+	+	142 - ,	- -	- -	- +	45%	RCG -	-Não -	29%
81	,	-	+	+	143 - 119	- -	- +	- +	50%	CGE -	-Não +	29%
82	66	,	,	,	144 , 120	- ,	- ,	- ,	+	CGR -	-Não -	45%
83	67	-	-	+	145 - 121	- -	- +	- +	10%	CGE -	-Não +	29%
84	68	-	-	+	146 - 122	- +	- -	- +	35%	RCG -	-Não +	45%
85	69	+	-	+	147 - 123	- -	- +	- +	75%	Ausentes	-Não +	30%
86	70	-	-	+	148 - 124	- -	- -	- +	40%	Ausentes	-Não -	35%
87	71	-	-	+	149 - 125	- -	- +	- +	35%	CGE -	-Não +	29%
88	,	-	-	-	150 - 126	- -	- -	- +	15%	RCG -	-Não -	5%
89	72	-	+	+	151 - 127	- +	- -	- +	20%	RCG -	-Não +	45%
90	73	-	+	+	152 - 128	- +	- -	- -	10%	Ausentes	-Não -	49%
91	74	-	-	+	153 - 129	- -	- -	- +	35%	CGE -	-Não +	40%
92	,	-	-	-	154 - 130	- -	- +	- +	25%	CGE -	-Sim +	30%
93	,	-	-	-	155 - 131	- -	- -	- +	90%	CGE -	-Sim -	29%
94	75	+	-	-	156 - 132	- -	- -	- +	75%	CGE -	-Sim -	29%
95	76	-	-	-	157 - 133	- -	- +	- +	65%	CGE -	-Sim +	29%
96	77	-	+	+	158 - 134	- +	- -	- -	15%	RCG -	-Sim -	89%
97	78	-	-	+	159 - 135	- +	- -	- +	25%	CGE -	-Não -	89%
98	79	-	+	+	160 - 136	- -	- +	- +	20%	Ausentes	-Não -	25%
99	,	-	+	+	161 - 137	- -	- -	- +	20%	RCG -	-Não -	29%
100	80	-	-	+	162 - 138	- +	- -	- +	5%	CGR -	-Sim -	19%
101	,	-	-	+	163 - 139	- -	- -	- +	5%	CGR -	-Sim -	59%
102	81	-	-	+	164 - 140	- -	- +	- +	65%	RCG -	-Não -	10%
103	82	-	-	+	165 - 141	- -	- -	- +	90%	RCG -	-Não +	50%
104	83	-	-	+	166 + 142	- -	- -	- -	35%	CGE -	-Não -	80%
105	84	+	-	+	167 - 143	- +	- -	- -	35%	CGE -	-Sim -	19%
106	85	-	+	+	168 - 144	- +	- -	- +	25%	RCG -	-Não -	39%
107	86	+	-	+	169 - 145	- -	- -	- +	35%	CGE -	-Sim -	29%
108	87	+	-	+	-	-	-	-	65%	Ausentes	Não	Não
108	88	-	-	+	-	-	-	-	85%	CGE	Não	Não
110	89	-	-	+	-	-	-	-	5%	CGE	Sim	Não
111	90	+	-	+	-	-	-	-	15%	CGE	Sim	Não
112	91	-	-	+	+	-	-	-	55%	CGR	Sim	Não
113	92	-	+	+	-	-	-	-	10%	Ausentes	Não	Sim
114	93	-	-	+	+	-	-	-	35%	CGE	Sim	Não
115	94	-	-	+	+	-	-	-	10%	CGE	Sim	Não
116	95	+	-	-	-	-	-	-	45%	CGE	Sim	Não
117	96	-	-	+	+	-	-	+	35%	CGE	Não	Não
118	97	-	-	+	+	-	-	-	75%	CGE	Sim	Não
119	98	-	-	+	+	-	-	-	40%	CGE	Sim	Não
120	99	+	-	+	-	-	-	+	50%	CGE	Sim	Não
121	100	+	-	+	-	-	-	-	15%	CGE	Sim	Não
122	101	+	-	+	-	-	-	-	15%	CGE	Sim	Não
123	102	-	-	+	+	-	-	-	15%	CGE	Sim	Não
124	103	+	-	+	-	-	-	-	55%	CGE	Sim	Não
125	104	-	+	+	-	-	-	-	20%	CGR	Não	Sim
"continua"												

"continua"

"conclu"

Anexo 1 - Continuação

No.	Caso	Fibrose	Prol.Vasc.	Estad.	Época	Quimiot.	Resp. Inic.	Evolução	T. Evol.
1	1	Não	Não	Não	Pré-T	,	Sem T	Óbito<3a	0
2	2	Não	Não	IV	Pré-T	Sim	Sem H	Óbito<3a	1
3	3	Não	Sim	III	Pré-T	Sim	Sem H	Sem H	4
4	4	Não	Não	I	Pré-T	Não	RC	Óbito>3a	40
5	,	Sim	Sim	Pós-T	Pós-T	,	,	,	,
6	5	Não	Não	Não	Pré-T	Sem H	Sem T	Óbito<3a	2
7	6	Não	Sim	IV	Pós-T	Não	RP	Óbito>3a	120
8	7	Não	Sim	IV	Pré-T	Sem H	Sem H	Óbito<3a	11
9	8	Não	Não	IV	Pré-T	Não	Sem T	Óbito<3a	1
10	9	Não	Não	IV	Pré-T	Sim	RC	Estável	66
11	10	Não	Não	IV	Pré-T	Não	RP	Sem H	49
12	11	Não	Sim	IV	Pré-T	Sim	RP	Óbito<3a	31
13	12	Não	Sim	IV	Pré-T	Sim	RC	Óbito>3a	59
14	,	Não	Sim	Pós-T	Pós-T	,	,	,	,
15	13	Sim	Sim	IV	Pré-T	Sim	RP	Progressão	48
16	,	Sim	Não	Pós-T	Pós-T	,	,	,	,
17	14	Não	Não	IV	Pré-T	Não	Sem T	Estável	53
18	15	Não	Não	IV	Pós-T	Sim	RC	Estável	120
19	16	Não	Não	III	Pré-T	Não	Sem T	Estável	49
20	17	Não	Não	IV	Pós-T	Sim	RP	Estável	68
21	18	Não	Não	IV	Pós-T	Sim	RP	Estável	35
22	19	Não	Sim	IV	Pré-T	Sim	RP	Óbito<3a	22
23	20	Sim	Sim	Não	Pré-T	Não	Sem T	Óbito<3a	2
24	21	Não	Não	Não	Pré-T	Sem H	Sem H	Óbito<3a	1
25	22	Sim	Sim	IV	Pós-T	Não	RP	Óbito>3a	72
26	23	Não	Sim	IV	Pós-T	Não	RP	Óbito>3a	54
27	24	Não	Não	IV	Pós-T	Sim	RP	Óbito>3a	59
28	25	Não	Sim	IV	Pré-T	Não	Sem T	Estável	20
29	26	Não	Não	IV	Pós-T	Sim	RP	Progressão	55
30	27	Sim	Sim	IV	Pré-T	Não	RC	Progressão	28
31	28	Não	Não	IV	Pós-T	Sim	RP	Óbito<3a	22
32	,	Não	Não	Pós-T	Pós-T	,	,	,	,
33	29	Não	Não	IV	Pré-T	Não	RP	Sem H	12
34	30	Não	Não	IV	Pré-T	Não	RC	Óbito<3a	31
35	31	Não	Não	Não	Pré-T	Sem H	Sem H	Sem H	34
36	32	Sim	Sim	Não	Pré-T	Não	Sem T	Óbito<3a	1
37	33	Não	Não	Não	Pré-T	Não	RC	Óbito<3a	34
38	34	Não	Sim	Não	Pré-T	Sem H	Sem H	Sem H	4
39	35	Não	Não	IV	Pós-T	Não	RC	Óbito>3a	72
40	36	Não	Não	IV	Pré-T	Não	RC	Estável	120
41	37	Não	Não	IV	Pré-T	Sim	RP	Estável	56
42	38	Não	Sim	IV	Pré-T	Não	RP	Sem H	1
43	39	Não	Sim	III	Pré-T	Sim	RC	Estável	28
44	,	Não	Sim	IV	Pós-T	,	,	,	,
45	40	Não	Não	IV	Pré-T	Não	Sem T	Óbito<3a	0
46	,	Não	Não	IV	Pré-T	,	,	,	,
47	41	Não	Sim	IV	Pré-T	Sim	RP	Progressão	57
48	42	Não	Não	IV	Pré-T	Não	RP	Estável	120
49	43	Não	Sim	IV	Pré-T	Sem H	Sem H	Óbito>3a	64
50	44	Não	Não	Não	Pré-T	Sem H	Sem H	Óbito>3a	37
51	,	Não	Não	Não	Pós-T	,	,	,	,
52	45	Não	Não	IV	Pré-T	Sim	RP	Óbito<3a	6
53	46	Não	Sim	IV	Pré-T	Sim	RC	Estável	72
54	47	Sim	Sim	Não	Pré-T	Sim	RC	Estável	120
55	48	Sim	Sim	IV	Pré-T	Não	RC	Óbito>3a	38
56	49	Não	Não	IV	Pré-T	Sim	RP	Óbito<3a	32
57	50	Sim	Sim	IV	Pré-T	Não	RC	Progressão	72
58	51	Não	Sim	IV	Pré-T	Sim	RP	Progressão	7
59	52	Não	Sim	IV	Pré-T	Sim	RP	Sem H	6
60	53	Não	Não	III	Pré-T	Sim	RP	Óbito>3a	62

"continua"

"continuação"									
No.	Caso	Fibrose	Prol.Vasc.	Estad.	Época	Quimiot.	Resp. Inic.	Evolução	T. Evol.
61	,	Não	Sim	Pós-T	Pós-T	,	,	,	,
62	,	Não	Não	Pós-T	Pós-T	,	,	,	,
63	,	Não	Não	Pós-T	Pós-T	,	,	,	,
64	54	Sim	Sim	IV	Pré-T	Sim	RC	Estável	114
65	55	Não	Sim	IV	ies deterri	Sem H	Sem H	Óbito>3a	41
66	56	Não	Não	IV	Pré-T	Sim	RP	Estável	120
67	57	Não	Sim	IV	Pré-T	Sim	Progressão	Sem H	9
68	58	Sim	Sim	IV	Pré-T	Sim	RP	Óbito<3a	35
69	,	Não	Não	Pós-T	Pós-T	,	,	,	,
70	59	Não	Não	IV	Pré-T	Sim	RP	Estável	10
71	60	Não	Não	IV	Pré-T	Sim	RP	Óbito<3a	14
72	61	Não	Não	IV	Pré-T	Sim	RC	Progressão	70
73	,	Não	Não	Pós-T	Pós-T	,	,	,	,
74	62	Não	Sim	IV	Pré-T	Não	RP	Estável	49
75	63	Não	Não	IV	Pré-T	Não	Progressão	Óbito<3a	18
76	64	Não	Não	IV	Pós-T	Sim	RP	Óbito>3a	63
77	,	Não	Não	Pós-T	Pós-T	,	,	,	,
78	65	Não	Sim	IV	Pré-T	Sim	RC	Óbito>3a	84
79	,	Não	Não	Pós-T	Pós-T	,	,	,	,
80	,	Não	Sim	Pós-T	Pós-T	,	,	,	,
81	,	Não	Sim	Pós-T	Pós-T	,	,	,	,
82	66	Não	Não	III	Pré-T	Não	RC	Estável	107
83	67	Não	Não	IV	Pré-T	Não	Sem T	Estável	45
84	68	Não	Não	IV	Pré-T	Sem H	Sem H	Sem H	0
85	69	Sim	Sim	Não	Pré-T	Sem H	Sem H	Óbito<3a	19
86	70	Não	Não	Não	Pré-T	Sem H	Sem H	Sem H	1
87	71	Sim	Sim	IV	Pré-T	Sim	RP	Progressão	47
88	,	Não	Sim	IV	Pré-T	,	,	,	,
89	72	Não	Sim	IV	Pré-T	Não	RC	Óbito>3a	72
90	73	Não	Sim	IV	Pré-T	Sim	RP	Óbito<3a	36
91	74	Sim	Sim	IV	Pós-T	Sim	RP	Progressão	72
92	,	Sim	Sim	Pós-T	Pós-T	,	,	,	,
93	,	Sim	Sim	Pós-T	Pós-T	,	,	,	,
94	75	Sim	Não	IV	Pós-T	Sim	RP	Estável	114
95	76	Sim	Sim	Não	Pré-T	Não	Sem H	Sem H	12
96	77	Não	Sim	IV	Pós-T	Sim	RP	Progressão	55
97	78	Sim	Não	IV	Pós-T	Não	RC	Estável	84
98	79	Não	Sim	IV	Pré-T	Sim	RP	Estável	110
99	,	Sim	Sim	Pós-T	Pós-T	,	,	,	,
100	80	Não	Não	IV	Pré-T	Não	Progressão	Estável	54
101	,	Sim	Sim	Pós-T	Pré-T	,	,	,	,
102	81	Sim	Não	Não	Pré-T	Sim	RC	Estável	99
103	82	Não	Não	Não	Pré-T	Sim	RC	Estável	44
104	83	Sim	Sim	IV	Pré-T	Sim	RP	Óbito<3a	30
105	84	Não	Não	IV	Pré-T	Sim	RP	Óbito>3a	69
106	85	Não	Sim	Não	ies deterri	Sem H	Sem H	Progressão	33
107	86	Sim	Sim	Não	Pré-T	Sem H	Sem H	Sem H	2
108	87	Não	Sim	Não	Pré-T	Sem H	Sem H	Sem H	1
108	88	Sim	Sim	II	Pré-T	Sim	RC	Óbito<3a	36
110	89	Não	Não	IV	Pré-T	Sem H	Sem H	Estável	24
111	90	Não	Não	IV	Pré-T	Sim	RC	Estável	95
112	91	Sim	Sim	IV	Pré-T	Sem H	Sem H	Sem H	11
113	92	Sim	Não	IV	Pré-T	Sem H	Sem H	Progressão	90
114	93	Sim	Sim	IV	Pré-T	Sim	RP	Progressão	57
115	94	Sim	Não	IV	Pré-T	Não	Sem T	Estável	7
116	95	Sim	Sim	IV	Pré-T	Sim	RC	Estável	97
117	96	Não	Não	IV	Pré-T	Sim	Progressão	Óbito<3a	14
118	97	Não	Sim	IV	Pré-T	Não	Sem T	Óbito<3a	0
119	98	Sim	Sim	IV	Pré-T	Sim	RP	Sem H	9
120	99	Não	Sim	IV	Pré-T	Sim	RC	Sem H	3
121	100	Sim	Sim	IV	Pré-T	Sim	RP	Estável	24
122	101	Não	Não	IV	Pré-T	Sim	RP	Progressão	18
123	102	Sim	Sim	IV	Pré-T	Sim	RP	Sem H	3
124	103	Não	Sim	IV	Pré-T	Não	RP	Óbito<3a	15
125	104	Não	Sim	IV	Pré-T	Sim	RP	Estável	70
"continua"									

"continuação"									
No.	Caso	Fibrose	Prol.Vasc.	Estad.	Época	Quimiot.	Resp. Inic.	Evolução	T. Evol.
126	105	Sim	Sim	IV	Pré-T	Sim	RP	Estável	45
127	106	Sim	Sim	IV	Pré-T	Sim	RP	Sem H	11
128	,	Sim	Sim	Pós-T	Pós-T	,	,	,	,
129	107	Não	Não	IV	Pré-T	Sim	RC	Óbito<3a	15
130	108	Não	Sim	IV	Pré-T	Sim	Progressão	Sem H	5
131	109	Sim	Sim	III	Pré-T	Sim	RP	Óbito<3a	9
132	,	Sim	Sim	Pós-T	Pós-T	,	,	,	,
133	110	Não	Sim	IV	Pré-T	Sim	RP	Óbito<3a	21
134	111	Não	Sim	IV	Pré-T	Sim	RP	Estável	62
135	112	Não	Não	IV	Pré-T	Não	Sem T	Sem H	1
136	113	Sim	Sim	Não	Pré-T	Sem H	Sem H	Sem H	0
137	114	Não	Sim	III	Pré-T	Sim	RP	Sem H	72
138	115	Não	Sim	IV	Pré-T	Não	Sem T	Sem H	3
139	116	Não	Não	II	Pré-T	Sim	RC	Estável	59
140	117	Não	Sim	IV	Pré-T	Sim	RP	Óbito>3a	39
141	118	Sim	Sim	IV	Pré-T	Sim	Progressão	Sem H	3
142	,	Sim	Sim	IV	Pré-T	,	,	,	,
143	119	Não	Sim	Não	Pré-T	Não	Sem T	Óbito<3a	5
144	120	Sim	Não	IV	Pré-T	Sem H	Sem H	Óbito<3a	1
145	121	Não	Não	IV	Pré-T	Sim	Progressão	Sem H	7
146	122	Sim	Sim	IV	Pré-T	Sim	RP	Estável	59
147	123	Não	Não	IV	Pré-T	Sim	Progressão	Óbito>3a	40
148	124	Não	Não	IV	Pré-T	Sim	RP	Estável	31
149	125	Não	Sim	Pós-T	Pré-T	Não	RC	Estável	56
150	126	Não	Não	II	Pré-T	Sim	RP	Estável	54
151	127	Não	Não	Pós-T	Pré-T	Sim	RC	Estável	30
152	128	Sim	Não	II	Pré-T	Sim	RC	Estável	52
153	129	Não	Não	IV	des deter	Sem H	Sem H	Sem H	19
154	130	Não	Não	IV	Pré-T	Não	RC	Estável	37
155	131	Não	Não	IV	Pré-T	Sem H	Sem H	Sem H	0
156	132	Não	Não	IV	Pré-T	Sim	Progressão	Óbito<3a	3
157	133	Sim	Sim	IV	Pré-T	Sim	RP	Estável	60
158	134	Não	Não	Pós-T	Pré-T	Não	RP	Progressão	26
159	135	Não	Não	III	Pré-T	Sim	Progressão	Sem H	5
160	136	Não	Não	Pós-T	Pré-T	Não	RP	Estável	108
161	137	Não	Sim	IV	Pré-T	Sem H	Sem H	Sem H	2
162	138	Não	Não	III	Pré-T	Não	RC	Estável	69
163	139	Não	Sim	IV	Pré-T	Não	RP	Óbito<3a	2
164	140	Sim	Não	IV	Pré-T	Sim	RP	Estável	61
165	141	Não	Não	II	Pré-T	Não	RP	Estável	40
166	142	Sim	Não	II	Pré-T	Não	RC	Estável	43
167	143	Não	Sim	Não	Pós-T	Sem H	Sem H	Sem H	0
168	144	Não	Não	Não	Pré-T	Sem H	Sem H	Sem H	0
169	145	Não	Não	Não	Pré-T	Sem H	Sem H	Sem H	0

"conclusão"

Legenda do Anexo 1

-	negativo
+	positivo
a	anos
CGE	centros germinativos expandidos
CGR	centros germinativos residuais
F	feminino
H	histórico
L	linfoma
LB	linfoma B rico em T
LBi	linfoma blastóide
LF	linfoma folicular
LGC	linfoma de grandes células
LGCB	linfoma de grandes células B
LH	linfoma de Hodgkin
LLC	linfoma linfocítico/LLC
LLp	linfoma linfoplasmocítico
LLT	linfoma linfoblástico T
LM	linfoma do manto
LMA	leucemia mielóide aguda
LPC	linfoma de pequenas células
LPCB	linfoma de pequenas células B
LTP	linfoma T periférico
LZM	linfoma da zona marginal
M	masculino
R	reacional
RC	resposta completa
RCG	resquícios de centros germinativos
RP	resposta parcial
T	tratamento

Anexo 2 – Estudo piloto mostrando que não ocorreram divergências significativas entre os linfonodos pré e pós-tratamento segundo estes 5 itens

ASPECTO NODULAR

	SIM	NÃO	TOTAL
PRÉ-TRATAMENTO	45	85	130
PÓS-TRATAMENTO	12	24	36
INDEFINIDO	1	2	3
TOTAL	58	111	169

$\chi^2=0,022$; $p=0,989$

CENTROS DE PROLIFERAÇÃO

	SIM	NÃO	TOTAL
PRÉ-TRATAMENTO	30	100	130
PÓS-TRATAMENTO	11	25	36
INDEFINIDO	1	2	3
TOTAL	42	127	169

$\chi^2=0,962$; $p=0,618$

FIBROSE

	SIM	NÃO	TOTAL
PRÉ-TRATAMENTO	37	93	130
PÓS-TRATAMENTO	11	25	36
INDEFINIDO		3	3
TOTAL	48	121	169

$\chi^2=1,272$; $p=0,529$

PROLIFERAÇÃO VASCULAR

	SIM	NÃO	TOTAL
PRÉ-TRATAMENTO	66	64	130
PÓS-TRATAMENTO	17	19	36
INDEFINIDO	2	1	3
TOTAL	85	84	169

$\chi^2=0,469$; $p=0,791$

CÉLULAS DENDRÍTICAS

	AUSENTES	RESQUÍSCIOS	RESIDUAIS	EXPANDIDOS	TOTAL
PRÉ-TRATAMENTO	24	23	20	63	130
PÓS-TRATAMENTO	10	7	2	17	36
INDEFINIDO	0	2	0	1	3
TOTAL	34	32	22	81	169

$\chi^2=12,323$; $p=0,264$

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. *Cancer* 1982;49(10):2112-35.

A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood* 1997;89(11):3909-18.

Andriko JA, Swerdlow SH, Aguilera NI, Abbondanzo SL. Is lymphoplasmacytic lymphoma/immunocytoma a distinct entity? A clinicopathologic study of 20 cases. *Am J Surg Pathol*. 2001;25(6):742-51.

Arber DA. Molecular diagnostic approach to non-Hodgkin's lymphoma. *J Mol Diagn*. 2000;2(4):178-90.

Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ, Horsman DE, Gascoyne RD. Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood* 1997;89(6):2067-78.

Bagdi E, Krenacs L, Krenacs T, Miller K, Isaacson PG. Follicular dendritic cells in reactive and neoplastic lymphoid tissues: a reevaluation of staining patterns of CD21, CD23, and CD35 antibodies in paraffin sections after wet

heat-induced epitope retrieval. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2001;9(2):117-24.

Bahloul M, Asnafi V, Macintyre E. Clinical impact of molecular diagnostics in low-grade lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2005;18(1):97-111.

Baliga BC, Kumar S. Role of Bcl-2 family of proteins in malignancy. *Hematol Oncol*. 2002;20(2):63-74.

Banks PM, Chan J, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Gatter K, et al. Mantle cell lymphoma. A proposal for unification of morphologic, immunologic, and molecular data. *Am J Surg Pathol*. 1992;16(7):637-40.

Barcus ME, Karageorge LS, Veloso YL, Kornstein MJ. CD10 expression in follicular lymphoma versus reactive follicular hyperplasia: evaluation in paraffin-embedded tissue. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2000;8(4):263-6.

Belaud-Rotureau MA, Parrens M, Dubus P, Garroste JC, de Mascarel A, Merlio JP. A comparative analysis of FISH, RT-PCR, PCR, and immunohistochemistry for the diagnosis of mantle cell lymphomas. *Mod Pathol*. 2002;15(5):517-25.

Bonato M, Pittaluga S, Tierens A, Criel A, Verhoef G, Wlodarska I, et al. Lymph node histology in typical and atypical chronic lymphocytic leukemia. *Am J Surg Pathol*. 1998;22(1):49-56.

Bosch F, Lopez-Guillermo A, Campo E, Ribera JM, Conde E, Piris MA, et al. Mantle cell lymphoma: presenting features, response to therapy, and prognostic factors. *Cancer* 1998;82(3):567-75.

-
- Breslow N. :A generalized Kruskal-Wallis test for comparing K samples subject to unequal patterns of censorship. *Biometrika* 1970;57:579-94.
- Campo E, Raffeld M, Jaffe ES. Mantle-cell lymphoma. *Semin Hematol.* 1999;36(2):115-27.
- Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DDW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res.* 1971;31(11):1860-1.
- Cattoretti G, Chang CC, Cechova K, Zhang J, Ye BH, Falini B, et al. BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood* 1995;86(1):45-53.
- Cerny T, Gillessen S. Advances in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol.* 2002;13(Suppl 4):211-6.
- Chan JK. The new World Health Organization classification of lymphomas: the past, the present and the future. *Hematol Oncol.* 2001;19(4):129-50.
- Chan JK, Banks PM, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms proposed by the International Lymphoma Study Group. A summary version. *Am J Clin Pathol.* 1995;103(5):543-60.
- Chan JK, Miller KD, Munson P, Isaacson PG. Immunostaining for cyclin D1 and the diagnosis of mantle cell lymphoma: is there a reliable method? *Histopathology* 1999;34(3):266-70.
- Chen CC, Raikow RB, Sonmez-Alpan E, Swerdlow SH. Classification of small B-cell lymphoid neoplasms using a paraffin section immunohistochemical panel. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2000;8(1):1-11.

-
- Cheuk W, Wong KO, Wong CS, Chan JK. Consistent immunostaining for cyclin D1 can be achieved on a routine basis using a newly available rabbit monoclonal antibody. *Am J Surg Pathol*. 2004;28(6):801-7.
- Chu PG, Chang KL, Weiss LM, Arber DA. Immunohistochemical detection of CD10 in paraffin sections of hematopoietic neoplasms: a comparison with flow cytometry detection in 56 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2000;8(4):257-62.
- Coiffier B, Thieblemont C, Felman P, Salles G, Berger F. Indolent nonfollicular lymphomas: characteristics, treatment, and outcome. *Semin Hematol*. 1999;36(2):198-208.
- Cordone I, Masi S, Mauro FR, Soddu S, Morsilli O, Valentini T, et al. p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. *Blood* 1998;91(11):4342-9.
- de Boer CJ, Schuurin E, Dreef E, Peters G, Bartek J, Kluin PM, et al. Cyclin D1 protein analysis in the diagnosis of mantle cell lymphoma. *Blood* 1995;86(7):2715-23.
- de Leon ED, Alkan S, Huang JC, Hsi ED. Usefulness of an immunohistochemical panel in paraffin-embedded tissues for the differentiation of B-cell non-Hodgkin's lymphomas of small lymphocytes. *Mod Pathol*. 1998;11(11):1046-51.
- DiRaimondo F, Albitar M, Huh Y, O'Brien S, Montillo M, Tedeschi A, et al. The clinical and diagnostic relevance of CD23 expression in the chronic lymphoproliferative disease. *Cancer* 2002;94(6):1721-30.

-
- Dogan A, Bagdi E, Munson P, Isaacson PG. CD10 and BCL-6 expression in paraffin sections of normal lymphoid tissue and B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(6):846-52.
- Dorfman RF. Letter: Classification of non-Hodgkin's lymphomas. *Lancet* 1974;1(7869):1295-6.
- Dorfman DM, Pinkus GS. Distinction between small lymphocytic and mantle cell lymphoma by immunoreactivity for CD23. *Mod Pathol*. 1994;7(3):326-31.
- Dorfman DM, Shahsafaei A. Usefulness of a new CD5 antibody for the diagnosis of T-cell and B-cell lymphoproliferative disorders in paraffin sections. *Mod Pathol*. 1997;10(9):859-63.
- Dunphy CH. Applications of flow cytometry and immunohistochemistry to diagnostic hematopathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2004;128(9):1004-22.
- Dunphy CH, Perkins SL. Large cell variants of CD5+, CD23- B-cell lymphoma/leukemia. *Arch Pathol Lab Med*. 2001;125(4):513-8.
- Escalon MP, Liu NS, Yang Y, Hess M, Walker PL, Smith TL, et al. Prognostic factors and treatment of pacientes with T-cell non-Hodgkin lymphoma: the M.D. Anderson Cancer Center experience. *Cancer* 2005;103(10):2091-8.
- Fong D, Kaiser A, Spizzo G, Gastl G, Tzankov A. Hodgkin's disease variant of Richter's syndrome in chronic lymphocytic leukaemia patients previously treated with fludarabine. *Br J Haematol*. 2005;29(2):199-205.
- Franco V, Florena AM, Iannitto E. Splenic marginal zone lymphoma. *Blood* 2003;101(7):2464-72.
- Giles FJ, O'Brien SM, Keating MJ. Chronic lymphocytic leukemia in (Richter's) transformation. *Semin Oncol*. 1998;25(1):117-25.

-
- Glass AG, Karnell LH, Menck HR. The National Cancer Data Base report on non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer* 1997;80(12):2311-20.
- Gong JZ, Lagoo AS, Peters D, Horvatinovich J, Benz P, Buckley PJ. Value of CD23 determination by flow cytometry in differentiating mantle cell lymphoma from chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2001;116(6):893-7.
- Greiner TC, Moynihan MJ, Chan WC, Lytle DM, Pedersen A, Anderson JR, et al. p53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood* 1996;87(10):4302-10.
- Hankin RC, Hunter SV. Mantle cell lymphoma. *Arch Pathol Lab Med*. 1999;123(12):1182-8.
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994;84(5):1361-92.
- Harris NL, Stein H, Coupland SE, Hummel M, Favera RD, Pasqualucci L, et al. New approaches to lymphoma diagnosis. Hematology. *Am Soc Hematol Educ Program*. 2001:194-220.
- Henry K, Bennett MH, Farrer-Brown G. Morphological classification of non-Hodgkin's lymphomas. *Recent Results Cancer Res*. 1978;64:38-56.
- Hsi ED, Yegappan S. Lymphoma immunophenotyping: a new era in paraffin-section immunohistochemistry. *Adv Anat Pathol*. 2001;8(4):218-39.
- Isaacson P, Wright DH. Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. *Cancer* 1983;52(8):1410-6.

-
- Izban KF, Alkan S, Singleton TP, Hsi ED. Multiparameter immunohistochemical analysis of the cell cycle proteins cyclin D1, Ki-67, p21WAF1, p27KIP1, and p53 in mantle cell lymphoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124(10):1457-62.
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press; 2001.
- Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Amer Stat Assoc*. 1958;53:457-81.
- Kodet R, Mrhalova M, Krskova L, Soukup J, Campr V, Neskudla T, et al. Mantle cell lymphoma: improved diagnostics using a combined approach of immunohistochemistry and identification of t(11;14)(q13;q32) by polymerase chain reaction and fluorescence in situ hybridization. *Virchows Arch*. 2003;442(6):538-47.
- Korin HW, Schwartz MR, Chirala M, Younes M. Optimized cyclin D1 immunoperoxidase staining in mantle cell lymphoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2000;8(1):57-60.
- Kumar S, Green GA, Teruya-Feldstein J, Raffeld M, Jaffe ES. Use of CD23 (BU38) on paraffin sections in the diagnosis of small lymphocytic lymphoma and mantle cell lymphoma. *Mod Pathol*. 1996;9(9):925-9.
- Kurtin PJ, Hobday KS, Ziesmer S, Caron BL. Demonstration of distinct antigenic profiles of small B-cell lymphomas by paraffin section immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol*. 1999;112(3):319-29.
- Kurtin PJ. Mantle cell lymphoma. *Adv Anat Pathol*. 1998;5(6):376-98.

-
- Lai R, Arber DA, Chang KL, Wilson CS, Weiss LM. Frequency of bcl-2 expression in non-Hodgkin's lymphoma: a study of 778 cases with comparison of marginal zone lymphoma and monocytoid B-cell hyperplasia. *Mod Pathol*. 1998;11(9):864-9.
- Lai R, Weiss LM, Chang KL, Arber DA. Frequency of CD43 expression in non-Hodgkin lymphoma. A survey of 742 cases and further characterization of rare CD43+ follicular lymphomas. *Am J Clin Pathol*. 1999;111(4):488-94.
- Lennert K, Stein H, Kaiseling E. Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata. *Br J Cancer*. 1975;31(suppl.2):29-43.
- Lennert K. Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, 1978.
- Leoncini L, Delsol G, Gascoyne RD, Harris NL, Pileri SA, Piris MA, et al. Aggressive B-cell lymphomas: a review based on the workshop of the XI Meeting of the European Association for Haematopathology. *Histopathology* 2005;46(3):241-55.
- Lister TA, Crowther D, Stculiffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, et al. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol*. 1989;7(11):1630-6.
- Liu Z, Dong HY, Gorczyca W, Tsang P, Cohen P, Stephenson CF, et al. CD5-mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2002;118(2):216-24.
- Louie DC, Offit K, Jaslow R, Parsa NZ, Murty VV, Schluger A, et al. p53 overexpression as a marker of poor prognosis in mantle cell lymphomas with t(11;14)(q13;q32). *Blood* 1995;86(8):2892-9.

-
- Lukes RJ. The immunologic approach to the pathology of malignant lymphomas. *Am J Clin Pathol.* 1979;72(4 Suppl):657-69.
- Lukes RJ, Collins RD. Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer* 1974;34(4 Suppl):1488-503.
- Maes B, De Wolf-Peeters C. Marginal zone cell lymphoma--an update on recent advances. *Histopathology* 2002;40(2):117-26.
- Martin AR, Weisenburger DD, Chan WC, Ruby EI, Anderson JR, Vose JM, et al. Prognostic value of cellular proliferation and histologic grade in follicular lymphoma. *Blood* 1995;85(12):3671-8.
- Mathe G, Rappaport H, O'Connor GT, et al. Histological and cytological typing of neoplastic diseases of hematopoietic and lymphoid tissues. In: *WHO International Histological Classification of Tumours*, N°. 14. Geneva, World Health organization, 1976.
- McCall RB. Fundamental Statistics for Psychology, New York: Harcourt, Brace & World Eds., 1970, p. 284-293.
- McIntosh GG, Lodge AJ, Watson P, Hall AG, Wood K, Anderson JJ, et al. NCL-CD10-270: a new monoclonal antibody recognizing CD10 in paraffin-embedded tissue. *Am J Pathol.* 1999;154(1):77-82.
- Miranda RN, Briggs RC, Kinney MC, Veno PA, Hammer RD, Cousar JB. Immunohistochemical detection of cyclin D1 using optimized conditions is highly specific for mantle cell lymphoma and hairy cell leukemia. *Mod Pathol.* 2000;13(12):1308-14.

-
- Mollejo M, Lloret E, Menarguez J, Piris MA, Isaacson PG. Lymph node involvement by splenic marginal zone lymphoma: morphological and immunohistochemical features. *Am J Surg Pathol*. 1997;21(7):772-80.
- Montillo M, Hamblin T, Hallek M, Montserrat E, Morra E. Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica* 2005;90(3):391-9.
- Nathwani BN. A critical analysis of the classifications of non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer* 1979;44(2):347-84.
- O'Malley DP, Vance GH, Orazi A. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma with trisomy 12 and focal cyclin d1 expression: a potential diagnostic pitfall. *Arch Pathol Lab Med*. 2005;129(1):92-5.
- Onciu M, Berrak SG, Medeiros LJ, Katz RL, Huh YO. Discrepancies in the immunophenotype of lymphoma cells in samples obtained simultaneously from different anatomic sites. *Am J Clin Pathol*. 2002;117(4):644-50.
- Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, Glide S, Davis ZA, Ibbotson RE, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 2002;100(4):1177-84.
- Ott MM, Ott G, Kuse R, Porowski P, Gunzer U, Feller AC, et al. The anaplastic variant of centrocytic lymphoma is marked by frequent rearrangements of the bcl-1 gene and high proliferation indices. *Histopathology* 1994;24(4):329-34.
- Paes RAP, Vassallo J, Alves AC, Menezes Y, Siqueira SAC, Aldred VL, et al. Classificação da Organização Mundial de Saúde para as neoplasias dos tecidos hematopoiético e linfóide: proposta de padronização terminológica

-
- em língua portuguesa do grupo de hematopatologia da Sociedade Brasileira de Patologia. *J Bras Patol Med Laborat.* 2002;38(3):237-9.
- Palestro G, Ponti R, Chiusa L, Chiarle R, Geuna M, Novero D, et al. Cell proliferation, bcl-2, c-myc, p53 and apoptosis as indicators of different aggressiveness in small lymphocytic lymphoma (SLL). *Eur J Haematol.* 1997;59(3):148-54.
- Pangalis GA, Krytsonis MC, Kontopidou FN, Siakantaris MP, Dimopoulou MN, Vassilakopoulos TP, et al. Differential diagnosis of Waldenstrom's macroglobulinemia and other B-cell disorders. *Clin Lymphoma.* 2005;5(4):235-40.
- Pangalis GA, Vassilakopoulos TP, Dimopoulou MN, Siakantaris MP, Kontopidou FN, Angelopoulou MK. B-chronic lymphocytic leukemia: practical aspects. *Hematol Oncol.* 2002;20(3):103-46.
- Pich A, Ponti R, Valente G, Chiusa L, Geuna M, Novero D, et al. MIB-1, Ki67, and PCNA scores and DNA flow cytometry in intermediate grade malignant lymphomas. *J Clin Pathol.* 1994;47(1):18-22.
- Pileri SA, Ascani S, Sabattini E, Fraternali-Orcioni G, Poggi S, Piccioli M, et al. The pathologist's view point. Part I--indolent lymphomas. *Haematologica* 2000;85(12):1291-307.
- Piris MA, Orradre JL, Rivas C. Monocytoid B-cell lymphoma--a MALT tumour? *Histopathology* 1990;17(3):287-8.
- Pittaluga S, Ayoubi TA, Wlodarska I, Stul M, Cassiman JJ, Mecucci C, et al. BCL-6 expression in reactive lymphoid tissue and in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *J Pathol.* 1996;179(2):145-50.

-
- Pittaluga S, Bijmens L, Teodorovic I, Hagenbeek A, Meerwaldt JH, Somers R, et al. Clinical analysis of 670 cases in two trials of the European Organization for the Research and Treatment of Cancer Lymphoma Cooperative Group subtyped according to the Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: a comparison with the Working Formulation. *Blood* 1996;87(10):4358-67.
- Raible MD, Hsi ED, Alkan S. Bcl-6 protein expression by follicle center lymphomas. A marker for differentiating follicle center lymphomas from other low-grade lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol*. 1999;112(1):101-7.
- Rappaport H. Tumours of the hematopoietic system. In: Atlas of Tumor Pathology, Section 3, Fascicle 8. Washington, D.C., US Armed Forces Institute of Pathology, 1966
- Raty R, Franssila K, Jansson SE, Joensuu H, Wartiovaara-Kautto U, Elonen E. Predictive factors for blastoid transformation in the common variant of mantle cell lymphoma. *Eur J Cancer*. 2003;39(3):321-9.
- Raty R, Franssila K, Joensuu H, Teerenhovi L, Elonen E. Ki-67 expression level, histological subtype, and the International Prognostic Index as outcome predictors in mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol*. 2002;69(1):11-20.
- Said J. Transformation to aggressive B-cell lymphoma: morphology, immunophenotype, and molecular characteristics. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2003;11(3):199-205.

-
- Sander CA, Yano T, Clark HM, Harris C, Longo DL, Jaffe ES, et al. p53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas. *Blood* 1993;82(7):1994-2004.
- Schlette E, Fu K, Medeiros LJ. CD23 expression in mantle cell lymphoma: clinicopathologic features of 18 cases. *Am J Clin Pathol*. 2003;120(5):760-6.
- Schlette E, Lai R, Onciu M, Doherty D, Bueso-Ramos C, Medeiros LJ. Leukemic mantle cell lymphoma: clinical and pathologic spectrum of twenty-three cases. *Mod Pathol*. 2001;14(11):1133-40.
- Shiozawa E, Yamochi-Onizuka T, Yamochi T, Yamamoto Y, Naitoh H, Kawakami K, et al. Disappearance of CD21-positive follicular dendritic cells preceding the transformation of follicular lymphoma: immunohistological study of the transformation using CD21, p53, Ki-67, and P-glycoprotein. *Pathol Res Pract*. 2003;199(5):293-302.
- Siegel S, Castellan NJ. Non-parametric statistics for the behavioral sciences, ed 2 New York, 1988, McGraw-Hill.
- Singh N, Wright DH. The value of immunohistochemistry on paraffin wax embedded tissue sections in the differentiation of small lymphocytic and mantle cell lymphomas. *J Clin Pathol*. 1997;50(1):16-21.
- Swerdlow SH, Williams ME. From centrocytic to mantle cell lymphoma: a clinicopathologic and molecular review of 3 decades. *Hum Pathol*. 2002;33(1):7-20.
- Tatsuoka MM. Discriminant analysis: the study of group differences, Champaign, Ill, Institute for Personality and Ability Testing; 1970.

-
- Treon SP, Dimopoulos M, Kyle RA. Defining Waldenstrom's macroglobulinemia. *Semin Oncol.* 2003;30(2):107-9.
- Turner JJ, Hughes AM, Kricker A, Milliken S, Grulich A, Kaldor J, et al. Use of the WHO lymphoma classification in a population-based epidemiological study. *Ann Oncol.* 2004;15(4):631-7.
- Tworek JA, Singleton TP, Schnitzer B, Hsi ED, Ross CW. Flow cytometric and immunohistochemical analysis of small lymphocytic lymphoma, mantle cell lymphoma, and plasmacytoid small lymphocytic lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 1998;110(5):582-9.
- Vega F, Medeiros LJ. Chromosomal translocations involved in non-Hodgkin lymphomas. *Arch Pathol Lab Med.* 2003;127(9):1148-60.
- Watson P, Wood KM, Lodge A, McIntosh GG, Milton I, Piggott NH, et al. Monoclonal antibodies recognizing CD5, CD10 and CD23 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue: production and assessment of their value in the diagnosis of small B-cell lymphoma. *Histopathology* 2000;36(2):145-50.
- Weisenburger DD, Vose JM, Greiner TC, Lynch JC, Chan WC, Bierman PJ, et al. Mantle cell lymphoma. A clinicopathologic study of 68 cases from the Nebraska Lymphoma Study Group. *Am J Hematol.* 2000;64(3):190-6.
- Wilson WH, Teruya-Feldstein J, Fest T, Harris C, Steinberg SM, Jaffe ES, et al. Relationship of p53, bcl-2, and tumor proliferation to clinical drug resistance in non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1997;89(2):601-9.
- Yang WI, Zukerberg LR, Motokura T, Arnold A, Harris NL. Cyclin D1 (Bcl-1, PRAD1) protein expression in low-grade B-cell lymphomas and reactive hyperplasia. *Am J Pathol.* 1994;145(1):86-96.

-
- Ye H, Dogan A, Karran L, Willis TG, Chen L, Wlodarska I, et al. BCL10 expression in normal and neoplastic lymphoid tissue. Nuclear localization in MALT lymphoma. *Am J Pathol*. 2000;157(4):1147-54.
- Zhang A, Ohshima K, Sato K, Kanda M, Suzumiya J, Shimazaki K, et al. Prognostic clinicopathologic factors, including immunologic expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Pathol Int*. 1999;49(12):1043-52.
- Zinzani PL. Lymphoma: diagnosis, staging, natural history, and treatment strategies. *Semin Oncol*. 2005;32(1 Suppl.):S4-10.
- Zinzani PL, Magagnoli M, Ascani S, Ricci P, Poletti V, Gherlinzoni F, et al. Nongastrointestinal mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphomas: clinical and therapeutic features of 24 localized patients. *Ann Oncol*. 1997;8(9):883-6.
- Zukerberg LR, Medeiros LJ, Ferry JA, Harris NL. Diffuse low-grade B-cell lymphomas. Four clinically distinct subtypes defined by a combination of morphologic and immunophenotypic features. *Am J Clin Pathol*. 1993;100(4):373-85.
- Zukerberg LR, Yang WI, Arnold A, Harris NL. Cyclin D1 expression in non-Hodgkin's lymphomas. Detection by immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol*. 1995;103(6):756-60.

APÊNDICE

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

D A

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAIXA POSTAL, 3671

SÃO PAULO - BRASIL

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 23.05.02, **APROVOU** o protocolo de Pesquisa nº **358/02**, intitulado: "A importância da imunohistoquímica na classificação dos linfomas não hodgkin de pequenas células B", do Departamento de PATOLOGIA.

Pesquisador(a) Responsável: **PROF. DR. VENANCIO AVANCINI FERREIRA ALVES**

Pesquisador(a) Executante: **DRA. SHEILA APARECIDA COELHO SIQUEIRA**

CAPPesq, 23 de maio de 2002.

PROF. DR. JORGE KALIL FILHO

Presidente da Comissão Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").