CELSONO ABDON LOPES DE MELLO

**Análise de CD10, BCL-6 e MUM1 em linfomas não
Hodgkin de células B primários de mediastino**

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

Área de concentração: Oncologia

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

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Mello, Celso Abdon Lopes de
Análise de CD10, bcl-6 e MUM1 em linfomas não Hodgkin de células B primários
de mediastino / Celso Abdon Lopes de Mello. -- São Paulo, 2010.

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

Departamento de Radiologia.
Área de concentração: Oncologia.
Orientador: Fernando Augusto Soares.

Descritores: 1.Linfoma não Hodgkin 2.Prognóstico 3.Centro germinativo
4.Sobrevida

USP/FM/SBD-030/10

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares pelo incentivo e orientação desta tese.

Ao Dr Victor Piana de Andrade, pela enorme contribuição na orientação e análise das reações imunoistoquímicas.

Ao Dr Vladimir Claudio Cordeiro de Lima, pelas sugestões no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr André Lopes Carvalho, pela disponibilidade em analisar os dados e pelas sugestões que sempre enriqueceram a condução da tese.

Aos meus colegas do Departamento de Oncologia Clínica, que fazem do lugar de trabalho um ambiente familiar, especialmente à Dra Ludmilla Chinen.

À Dra Inês Nishimoto pelo auxílio com as análises estatísticas.

Aos Técnicos do Laboratório de Anatomia Patológica pela presteza e agilidade com as reações de imunoistoquímicas, em especial ao Cesar Nascimento Braga.

À Dra Claudia Malheiros Coutinho pelos auxílios e demais colegas do departamento de Anatomia Patológica.

À Suely e Francyne da Biblioteca do hospital A C Camargo pelo grande auxílio na preparação do manuscrito.

Aos pacientes do hospital AC Camargo que disponibilizaram as informações e material para análise.

Aos meus pais, meus irmãos e minha família, que são as pessoas mais importantes para mim.

Enfim a todos que de certa forma contribuíram para que o resultado fosse atingido.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Lista de abreviações

Resumo

Summary

1	Introdução.....	1
1.1	Linfoma Não Hodgkin de células B Primário de Mediastino.....	2
1.1.1	Aspectos Epidemiológicos e clínicos do LBPM.....	2
1.1.2	Morfologia	6
1.1.3	Origem do LBPM versus Timo.....	8
1.1.4	Alterações Genéticas.....	10
1.1.5	Alterações Moleculares: LBPM x LDGCB.....	12
1.1.6	Linfoma de Mediastino versus Linfoma de Hodgkin Clássico.....	14
1.2	Origem do Linfoma de Células B: centro germinativo x pós-centro germinativo.....	19
1.3	Marcadores de Diferenciação do Linfócito B: BCL-6, CD10 e MUM1	23
2	Objetivos.....	29
3	Métodos.....	31
3.1	Casuística	32
3.2	Questões Éticas.....	33
3.3	Análise de fatores clínicos e anatomopatológicos.....	33
3.4	Reações Imunoistoquímicas.....	35
3.5	Métodos Estatísticos.....	37
4	Resultados.....	39
4.1	Variáveis Clínicas.....	40
4.2	Marcadores Imunoistoquímicos.....	42
4.3	Sobrevida.....	47

5	Discussão.....	55
6	Conclusões.....	66
7	Anexos.....	68
	Anexo 1. Variáveis clínicas e demográficas	69
	Anexo 2. Variáveis de tratamento	70
	Anexo 3. Variáveis imunoistoquímicas	71
8	Referências.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Linfoma não-Hodgkin de célula B Primário de Mediastino com esclerose (HE).....	8
Figura 2	Caracterização do LBPM através de análise de expressão gênica.	13
Figura 3	Relação entre o perfil de Expressão Gênica do Linfoma de Hodgkin Clássico e o LBPM	19
Figura 4	Relação de BCL-6 e diferenciação do linfócito B	24
Figura 5	Diferenciação Linfocitária Mediada por IRF-4 (MUM1)	26
Figura 6	Mecanismo de ação de CD10	27
Figura 7	Reações de Imunoistoquímica.	43
Figura 8	Classificação de acordo com algoritmo de Hans	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Índice Prognóstico Internacional (IPI)	5
Tabela 2	Distribuição da casuística de acordo com as variáveis clínicas e de tratamento	41
Tabela 3	Frequência dos marcadores imunoistoquímicos e modelo prognóstico	45
Tabela 4	Distribuição das variáveis de acordo com Tipo de Resposta à Quimioterapia de Primeira Linha	46
Tabela 5	Probabilidade de Sobrevida Global em 5 anos de acordo com as variáveis clínicas	49
Tabela 6	Probabilidade de Sobrevida Global em 5 anos de acordo com os marcadores imunoistoquímicos	50
Tabela 7	Análise Univariada e Multivariada para as variáveis clínicas e patológicas.	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Curva de Sobrevida Global	52
Gráfico 2	Sobrevida Global e variáveis clínicas	53
Gráfico 3	Sobrevida Global e Expressão de MUM1	54

LISTA DE ABREVIações

AKT	Protein kinase B
BCG	Linfoma B semelhante ao linfócito do centro germinativo
BCL2	B-Cell CLL/Lymphoma 2
BCL6	B-cell lymphoma 6 protein
CD	Cluster of differentiation
CG	Centro germinativo
<i>c-REL</i>	Reticuloendoteliosis gene
ECOG	Estern Cooperative Oncology Group Index
IgH e IgL	Cadeia pesada e cadeia leve de Imunoglobulina
IPI	Índice Prognóstico Internacional
LA	Linfócito ativado
LBPM	Linfoma B primário de Mediastino
LDGCB	Linfoma Não-Hodgkin Difuso de Grandes Células B
LDH	Desidrogenase Láctica
MAL	Myelin and lymphocyte protein
MUM1	Multiple myeloma 1
NF κ B	Nuclear factor Kappa B
RCB	Receptor de Célula B
TRAF	Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 1

RESUMO

Mello CAL **Análise de CD10, BCL-6 e MUM1 em Linfomas não-Hodgkin B Primários de Mediastino** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 82p.

INTRODUÇÃO: Os linfomas B atualmente podem ser agrupados de acordo semelhanças moleculares e imunoistoquímicas com o linfócito do centro germinativo (CG) ou linfócito ativado (LA/pós CG), sendo este de pior prognóstico. O objetivo deste trabalho foi analisar a expressão de CD10, BCL-6 e MUM1 em pacientes portadores de LBPM e correlacionar com prognóstico. **MÉTODOS:** análise retrospectiva das variáveis clínicas e de tratamento de 44 pacientes portadores de LBPM. Estudo imunoistoquímico de CD10, BCL-6 e MUM1 em 29 pacientes com material disponível. **RESULTADOS:** idade mediana foi de 28 anos e 70% eram do sexo feminino. A positividade para CD10, BCL-6 e MUM1 foi de: 24%, 65% e 58%. De acordo com o modelo de Hans, 38% foi classificado como CG e 62% como pós CG. A sobrevida global em 5 anos e sobrevida livre de doença foi de 47% e 81%, respectivamente. Resposta Completa após quimioterapia de primeira linha ($p=0,0001$), radioterapia de mediastino ($p=0,004$) e IPI (0,039) tiveram associação com a sobrevida. A positividade para MUM1 esteve associado a pior sobrevida global ($p=0,014$). Aplicando o modelo de Hans não foi observada nenhuma associação com sobrevida. Na análise multivariada apenas Resposta (RR 4,28 (IC 95% 1,3-13,6) e MUM1 (RR 3,54 (1,1-11,5) correlacionaram com a sobrevida. **CONCLUSÃO:** Para este grupo de pacientes com características clínicas homogêneas, resposta completa e expressão de MUM1 estiveram associados à sobrevida. A classificação deste linfoma em CG e pós-CG utilizando CD10, BCL-6 e MUM1 não se correlacionou com evolução. Estudos futuros com casuística maior são necessários para melhor definir os fatores prognósticos do LBPM.

Descritores: 1- Linfoma não Hodgkin/ terapia. 2-Prognóstico. 3-Centro Germinativo. 4-Sobrevida

SUMMARY

Mello CAL Analysis of CD10, BCL-6 and MUM1 in Primary Mediastinal Large B Cell Lymphomas [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009. 82p.

INTRODUCTION: Primary Mediastinal Large B Cell Lymphoma (PMLBCL) is a distinct clinico-pathologic entity that differs from other Diffuse Large B Cell Lymphomas (DLBCL). Classification of DLBCL in GC and post-GC according can identify two subgroups of lymphomas with distinct prognosis. The aim of this study is to analyze the expression of CD10, BCL-6 and MUM1 in PMLBCL and correlate with prognosis. **METHODS:** retrospective analysis of clinical variables of 44 patients with PMLBCL and expression of CD10, BCL-6 and MUM1 in 29 patients with available tissue. **RESULTS:** median age was 28 years and 70% of the patients were female. CD10, BCL-6 and MUM1 was positive in 24%, 65% and 58%, respectively. According to Hans classification, 38% were classified as GC and 62% as post-GC. Five year OS and DFS was 47% and 81%, respectively. In univariate analysis Complete Response ($p=0.0001$), Radiation therapy ($p=0.004$), IPI (0.039), and MUM1 expression (0.014) correlated with OS. No correlation was seen with Hans classification and survival. **CONCLUSION:** for this group of patients with homogeneous clinical features, response to therapy and MUM1 expression were associated with prognosis. The Hans algorithm proposed for aggressive lymphomas was not a predictive tool for survival in PMLBCL. Further studies are necessary to validate our finding and identify better prognostic variable for PMLBCL.

Descriptors: 1-Non Hodgkin Lymphoma/Therapy. 2- Prognosis. 3-Germinal center. 4- Survivorship

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Linfoma Não-Hodgkin Difuso de Grandes Células B Primário de Mediastino (LBPM)

O Linfoma não-Hodgkin Difuso de Células B Primário de Mediastino (LBPM) é um subtipo específico dos Linfomas não-Hodgkin agressivos (1). A distinção entre o LBPM e o Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB) de acometimento nodal pode ser feita tanto pelo comportamento clínico, bem como por características histomorfológicas e biomoleculares. As evidências apontam para uma origem tímica desta neoplasia, com provável desenvolvimento a partir de uma célula B da zona medular do timo. Estudos mais recentes têm demonstrado semelhança entre o LBPM e o linfoma de Hodgkin clássico por análise da expressão gênica destas duas patologias.

1.1.1 Aspectos epidemiológicos e clínicos do LBPM

O linfoma B de mediastino representa cerca de 5% de todos os linfomas agressivos, com incidência similar a do linfoma de Burkitt e do linfoma linfoblástico. O linfoma de mediastino acomete preferencialmente mulheres adultas jovens, com mediana de idade de 30-35 anos(2).

Clinicamente os pacientes apresentam-se com massas em mediastino anterior de crescimento rápido. A síndrome da veia cava superior ocorre com frequência, sendo que cerca de 30% dos pacientes apresentam sintomas relacionados com esta síndrome. Acompanham também outros sintomas

como dispnéia, rouquidão, disfagia, e mesmo paralisia do nervo frênico com consequente insuficiência respiratória (2, 3). Ao diagnóstico muitos pacientes apresentam disseminação locorregional com invasão pulmonar, pleural, ou pericárdica. Entretanto o acometimento de medula óssea ou outros sítios extratorácicos é infrequente ao diagnóstico(3). As recidivas geralmente apresentam-se com envolvimento visceral de trato gastrointestinal, hepático, renal e sistema nervoso central. O diagnóstico muitas vezes é realizado através de mediastinoscopia ou toracotomia com biópsia, uma vez que linfonodos superficiais geralmente não são acometidos(2, 3).

Por ser infrequente, não existem estudos prospectivos controlados avaliando as diversas estratégias empregadas para o tratamento do LBPM. No entanto, as análises retrospectivas fornecem informações importantes sobre variáveis que afetam a sobrevida global e sobrevida livre de doença e o impacto de determinadas intervenções na evolução desta patologia (4-10). As modalidades terapêuticas empregadas para o LBPM são a quimioterapia, radioterapia e quimioterapia de altas doses com transplante de medula óssea. Estudos iniciais apontavam taxas de cura inferiores às taxas de outros linfomas difusos B, no entanto, trabalhos mais recentes mostram que o LBPM apresenta taxas de controle semelhantes com sobrevida em 5 anos superiores a 70% (11, 12). O esquema de quimioterapia classicamente utilizado é o CHOP (Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina e Prednisona). O esquema CHOP ou esquemas CHOP-símiles são ditos esquema de primeira geração.(6) A maior série até hoje publicada sobre o LBPM é a de Zinzani *et al.* (7). Neste estudo retrospectivo e multicêntrico, os autores demonstraram que esquemas denominados de terceira geração são superiores ao CHOP. Para os 426 pacientes avaliados, a taxa de

sobrevida global projetada em 10 anos para os esquemas de primeira geração (CHOP, CHOP-símiles), terceira geração (MACOP-B, ProMACE-CytaBOM) e terapia de altas doses com transplante de medula óssea foi de 44%, 71% e 77%, respectivamente ($p > 0,001$ entre os três grupos e $p = 0,0001$ entre primeira geração e terceira geração)(7).

Não existe consenso na literatura sobre a superioridade de uma estratégia sobre a outra para o tratamento do LBPM. Alguns estudos apontam superioridade dos esquemas mais intensos sobre os esquemas de primeira geração, ou CHOP-símiles(4, 7, 13), no entanto deve-se considerar que estes esquemas de quimioterapia são mais tóxicos. Outro fator de confusão ainda não totalmente esclarecido é sobre o emprego do Rituximabe associado aos esquema de quimioterapia. Para os linfomas não-Hodgkin difusos de grandes B, CD20 positivos, o emprego deste anticorpo monoclonal aumentou significativamente as taxas de resposta e sobrevida dos pacientes(9). Os estudos com linfomas de mediastino não avaliam o papel do Rituximabe em combinação com esquemas de primeira geração. Tendo em vista esta disparidade de resultados em relação a eficácia de um esquema sobre o outro e maior toxicidade dos esquemas de terceira geração em relação aos de primeira, na prática o LBPM é tratado na maioria dos centros com CHOP e Rituximabe.

Atualmente, o Índice Prognóstico Internacional (IPI) é a ferramenta mais importante para predizer resposta à terapia para os LDGCB e para classificar os pacientes em subgrupos de prognóstico distintos(14). As variáveis necessárias para se calcular o score de IPI são clínicas e laboratoriais: idade (acima ou abaixo de 60 anos), Performance Status (ECOG 0 e 1 versus >1), LDH (normal ou elevada), número de sítios

extranodais acometidos (0-1 versus >1) e estadio (I e II versus III e IV). A reunião dos cinco fatores acima descritos pode classificar os pacientes em baixo risco (0 ou 1 fator), risco intermediário baixo (2 fatores), risco intermediário alto (3 fatores) e alto risco (4 ou 5 fatores), com sobrevida global em 5 anos de 73%, 51%, 43%, 26%, respectivamente(14), Tabela 1. Esta classificação de risco é de fácil aquisição e aplicação para os linfomas agressivos. No entanto, mesmo dentro destes grupos de riscos com IPI semelhantes pode-se observar uma variação substancial na evolução de alguns indivíduos.

Tabela 1 - Índice Prognóstico Internacional (IPI). Correlaciona as variáveis clínicas e laboratoriais com o prognóstico, baseado no aumento do risco relativo (RR). PS = Performance status (ECOG).

Variável	Categoria	RR	p
Idade	≤ 60 vs > 60 anos	1.96	< 0,001
DHL	≤ 1 x LSN vs > 1x LSN	1.85	< 0,001
PS	0 + 1 vs 2 a 4	1.80	< 0,001
Estadio	I + II vs III + IV	1.47	< 0,001
Sítio Extranodal	≤ 1 sítio vs > 1 sítio	1.48	< 0,001

O envolvimento extenso de estruturas intratorácicas no LBPM é frequente, com isto o estadiamento destes linfomas de acordo com o sistema Ann Arbor em estadio II ou IV torna-se difícil e muitas vezes impreciso(6). Consequentemente, o Índice Prognóstico Internacinal (IPI), de maior poder preditivo e prognóstico para o os LDGCB tem se mostrado de valor limitado nos LBPM e outros parâmetros têm sido estudados quanto ao potencial valor prognóstico(6). A validação de novos fatores prognósticos nos LBPM fica prejudicada, pois na maioria das vezes são derivados de séries com casuísticas pequenas. *Performance status*, acometimento pericárdico, resposta parcial à terapia inicial (2, 6) e positividade na cintilografia com gálio após tratamento foram associados com prognóstico adverso (15). Jacobson et al. (12) mostraram que a presença de massa mediastinal Bulky afetou adversamente a sobrevida livre de recorrência (89% x 40%, $p=0,05$) em LBPM. Outros fatores como idade, elevação de desidrogenase láctica (DHL), acometimento de sítios extranodais, estadio avançado, menor uso de regimes dose-intensos ou de terceira geração apresentaram valor prognóstico conflitante em diversos estudos (2, 10, 16).

1.1.2 Morfologia

O LBPM foi recentemente descrito como uma entidade clinico-patológica distinta. As primeiras descrições de um tumor de mediastino distinto de sarcomas, carcinoma tímico ou linfoma linfoblástico de células T foram publicadas por volta de 1980 (17, 18). Apesar de haver crescente acúmulo de dados clínicos, imunológicos, citogenéticos e moleculares nas

últimas décadas sobre o linfoma não-Hodgkin de mediastino apenas recentemente foi reconhecido como um subtipo específico de linfoma(1).

É codificado como 9679/3 pela nova classificação de linfomas malignos da Organização Mundial da Saúde (OMS) (19). Esta classificação foi baseada no conceito da classificação REAL de 1994 (20) e utiliza elementos morfológicos, clínicos e moleculares para definir entidades clínico-patológicas distintas.

Morfolologicamente as células do LBPM apresentam grande variedade no tamanho. Podem atingir até 20 vezes o tamanho de linfócitos normais. Microscopicamente existe uma proliferação difusa de células B de médio a grande tamanho(21). Na classificação da Working Formulation a maioria dos casos eram classificados como linfomas de grandes células difusos não clivados e na classificação de Kiel como linfomas centroblásticos (19-21). As células do linfoma estão envoltas em um estroma com formação alveolar e eventualmente esta doença apresenta vários graus de esclerose. Uma característica observada com frequência nos LBPM é o aspecto de compartimentalização das células tumorais pelas fibras de colágeno (8, 10, 22) (figura 1).

Figura 1. Linfoma não-Hodgkin de célula B Primário de Mediastino com esclerose (HE). Aumento de 400 x.

Embora apresente diversidade morfológica, o espectro citomorfológico dentro de determinado LBPM é limitado. No trabalho do Grupo Internacional de Estudo de Linfomas Extranodais (IELSG), as características citológicas observadas foram: células grandes pleomórficas, com grau variado de pleomorfismo nuclear e citoplasma claro ou discretamente basofílico. Invasão vascular, remanescentes tímicos, células gigantes multinucleadas também foram observadas (23).

1.1.3 Origem do LBPM x Timo

Apesar da estreita relação do LBPM com o timo, o linfoma de mediastino é uma doença linfoproliferativa de células B(22). Isso é indicado pelo rearranjo clonal de genes de imunoglobulinas (Ig), pela expressão de

moléculas de superfície específicas da linhagem B como CD19, CD20, CD22, CD79a, e negatividade para antígenos de linhagem T(22). A expressão de imunoglobulinas de superfície (IgS) e citoplasmáticas é geralmente ausente. A expressão de CD21 e de moléculas de histocompatibilidade classe I e/ou II também é tipicamente ausente(22). A ausência de produtos de HLA classe I pode justificar baixa concentração de beta- 2-microglobulina no soro de pacientes portadores de LBPM. A expressão de CD30 pode ser positiva, porém geralmente é fraca, ao contrário do que ocorre no linfoma de Hodgkin ou linfoma de grandes células anaplásico (10).

A origem do LBPM a partir de uma célula B ativada da zona medular do timo tem sido defendida por vários autores (24, 25). O estudo de Copie-Bergman et al. (26) acrescentou dados importantes sobre a origem deste subtipo de linfoma ao mostrar elevada taxa de expressão da proteína MAL nos LBPM. O RNA mensageiro de MAL foi inicialmente identificado durante o desenvolvimento das células T. MAL é uma proteína de membranas e está presente nos estágios intermediários e avançados da diferenciação intratímica do linfócito T(25). Este estudo avaliou a expressão protéica de MAL em linfócitos T, linfócitos B em situação fisiológica e comparou com linfomas B e T. Observou-se elevada expressão de MAL nos linfócitos T CD4+ de indivíduos saudáveis (65 a 90%) e nenhuma expressão em linfócitos B (0 a 0,6%). Nos tecidos tímicos avaliados o padrão de expressão mostrou duas zonas distintas: córtex, com intensa positividade e medula, com poucos linfócitos positivos Estes autores observaram também que os linfomas B primários do mediastino e mielomas hiper-expressavam MAL em 70% e 60% dos casos, respectivamente (26). Por outro lado foi observada nenhuma ou

muito pequena expressão de MAL nos linfomas B (foliculares 0/10; manto 0/6; linfócito 0/6; DGCB não mediastinal 1/33) (26).

A análise imunoistoquímica da expressão de CD23 nos LBPM também contribuiu de forma significativa com a teoria da origem tímica destes linfomas (27). Este antígeno parece ser amplamente expresso por linfócitos B situados na zona medular do timo. Esta população de linfócitos, aglomeradas em torno dos corpúsculos de Hassal, foi inicialmente descrita por Isaacson et al. (28) em 1987. Estes linfócitos B foram identificadas como grandes células dendríticas (células asteróides) com intensa expressão de CD23 e foram considerados possíveis candidatos às células precursoras normais das células dos linfomas B primários de mediastino.

A molécula de CD23 é um receptor de IgE de baixa afinidade, geralmente expressa em linfócitos B maduros e células dendríticas foliculares (29). A função de CD23 está relacionada com os processos de proliferação de células B, maturação de timócitos, apresentação de antígenos e resgate das células B do centro germinativo da apoptose (29). Calaminici et al. (27) mostraram positividade para CD23 em 70% dos LBPM, contra apenas 15% para LDCGB nodal e 9% para LDGCB extranodais. Estes autores concluíram também que a ausência de expressão dos antígenos CD10 e CD21 e a positividade para CD23, CD 20 e CD30 pode ser um indicativo de origem pós-centro germinativo para esta neoplasia (27).

1.1.4 Alterações Genéticas

Dentre os linfomas nodais e extranodais, o LBPM é caracterizado por anormalidades genéticas específicas (30, 31). Algumas alterações moleculares e cromossômicas têm sido reconhecidas como marcadores do

linfoma de mediastino. Através da análise de hibridização genômica comparativa, Bentz et al. (30) puderam constatar que 70% dos casos de LBPM apresentavam ganho do braço curto do cromossomo 9. Além disso, esta aberração cromossômica foi detectada esporadicamente (6/308) em linfomas nodais e extranodais analisados. Merece atenção o fato de que o único subtipo de linfoma que apresenta esta alteração em até 25% dos casos é o Linfoma de Hodgkin Clássico - LHC(30). A pesquisa de potenciais genes nesta região cromossômica mostrou amplificação do gene *Janus Kinase 2 (JAK2)*, cuja função está relacionada com a via de transdução de sinal dependente de citocinas (31).

Outra alteração genética encontrada com frequência nos LBPM é a amplificação do proto-oncogene *REL*, localizado no braço curto do cromossomo 2 (30). c-REL faz parte de uma classe de proteínas de transcrição gênica compondo subunidades de fatores de transcrição, incluindo o complexo NF κ B, que se ligam a sequências gênicas envolvidas com a diferenciação de células B (32). A expressão de c-REL é predominante em células hematopoiéticas e atua na diferenciação de linfócitos. REL frequentemente combina-se com outras proteínas relacionadas (NF κ B, I-kappa B, α -REL) para formar heterodímeros que regulam a transcrição. Rearranjo ou super-expressão de c-REL podem levar à tumorigênese. Dessa forma, o conhecimento da função da proteína c-REL permitiu concluir que o gene *REL* é um possível candidato envolvido na tumorigênese dos linfomas B de mediastino (32). Rodig et al. (32) compararam a expressão nuclear de cREL em combinação com a expressão de TRAF1 (Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 1) em LBPM e LDGCB nodais e demonstraram maior expressão de cREL no LBPM (65%

X18%). O emprego da expressão imunoistoquímica de cREL e TRAF1 pode distinguir o LBPM dos demais linfomas difusos, com sensibilidade de mais de 98%(32).

Mais recentemente, pesquisadores do Grupo de Caracterização Molecular dos Linfomas e Leucemias publicaram um estudo das alterações genéticas presentes nos linfomas não-Hodgkin difusos através da técnica de hibridização in situ comparativa (33). Este estudo mostrou que os linfomas difusos diferem significativamente na frequência de alterações cromossômicas específicas. Classificando os linfomas em similares ao linfócito do centro germinativo (CG) e linfócito ativado (LA) e em LBPM com base no perfil de expressão gênica, estes autores identificaram que os linfomas difusos de células B do tipo LA apresentavam mais frequentemente trissomia do 3, ganho de 3q and 18q21-q22 e perdas de 6q21-q22, enquanto linfomas difusos de células B do tipo CG tinham frequentemente ganho de 12q12 e os LBPM tinham ganho de 9p21 e 2p14 (33).

1.1.5 Alterações Moleculares : LBPM x LDGCB

O emprego recente das técnicas de microarray de cDNA tem contribuído de forma substancial para caracterização e melhor compreensão das doenças linfoproliferativas, particularmente os linfomas não-Hodgkin de células B (34-37).

Dando continuidade a estudos prévios de caracterização da assinatura molecular dos linfomas não-Hodgkin difuso de grandes células B (34,35), dois trabalhos publicados por Rosenwald et al. (36) e Savage et al. (35) foram capazes de identificar um terceiro subtipo distinto de LDGCB, o

linfoma B primário de mediastino (LBPM). Estes dois estudos encontraram padrões de expressão gênica distintos e confiáveis capazes de diagnosticar o LBPM e demonstraram de forma surpreendente que este padrão de expressão gênica está mais próximo do perfil de expressão gênica dos linfoma de Hodgkin clássico do que dos próprios LDGCB.

Figura 2. Caracterização do LBPM através de análise de expressão gênica. A. Modelo preditor de LBPM baseado em 46 genes (adaptado de Rosenwald et al. (36))

No estudo de Rosenwald et al. (36), um modelo molecular preditor de LBPM foi desenvolvido a partir da análise de expressão gênica de 35 casos de linfomas com acometimento mediastinal que tiveram diagnóstico de LBPM. Para diferenciar o LBPM de outros LDGCB que acometem o mediastino, 25 casos de LBDGC foram empregados. Para o estudo da expressão gênica empregou-se o Lymphochip de cDNA microarray e foi observado a hiperexpressão de alguns genes que se agrupavam de forma

bastante expressiva no LBPM. Este “cluster” de genes inclui dois genes, *MAL* e *FIG1*, expressos nos LBPM conforme demonstrado por estudos previos(26). Um modelo de “clusterização” hierárquica foi empregado para organizar os casos de acordo com a expressão de genes da assinatura do LBPM, resultando em dois grupos de casos. Um grupo composto por 21 amostras designadas de LBPM e outro grupo que não expressava estes genes. Em resumo, 35 genes mais expressos no LBPM e 11 genes mais expressos no LDGCB foram empregados para criar o modelo preditor do LBPM (Figura 2). Em outra etapa, foram analisados parâmetros clínicos de pacientes classificados como LBDGC e LBPM pelo modelo preditor. O grupo de pacientes diagnosticados como LBPM eram mais jovens e predominava o sexo feminino. Analisando dados de sobrevida, o grupo designado de LBPM apresentou sobrevida em 5 anos de 64% superior à sobrevida do grupo de LBDGC, 46% ($p=0.0067$). Quando os LDGBC foram subdivididos em linfoma similares ao LA e CG, a sobrevida em 5 anos do LBPM foi semelhante à do grupo de CG (64% x 59%, respectivamente, $p=0,18$)(36).

1.1.6 Linfoma de Mediastino versus Linfoma de Hodgkin Clássico

O LBPM, quando caracterizado a partir do perfil de expressão gênica, mostra aspectos clínicos e moleculares distintos dos demais linfomas: 1) acometimento de adultos jovens e envolvimento mediastinal com invasão frequente de estruturas torácicas; 2) prognóstico mais favorável, com maior sobrevida dos pacientes diagnosticados como sendo LBPM em relação a pacientes com linfoma não-Hodgkin de grandes células B com padrão de LA e CG, 64%, 30% e 59% em 5 anos, respectivamente (36); 3) expressão de

genes da assinatura molecular dos LBPM como *FIG* e *MAL* e 4) frequente amplificação da região cromossômica 9p24 (30). Desta forma, critérios moleculares podem definir de maneira mais precisa os LBPM do que os métodos diagnósticos empregados atualmente.

Além disso, estes estudos demonstraram de forma notória semelhanças entre o perfil de expressão gênica entre o LBPM e o Linfoma de Hodgkin Clássico (LHC) (35, 36). Uma característica compartilhada por estes dois tipos distintos de linfomas é a baixa expressão de componentes do receptor de células B (BCR – *B cell receptor*) e da cascata de sinalização deste receptor(38) como receptor de IgM de superfície, fator nuclear de células T ativadas – NFATc, alvos moléculares da enzima fosfatidilinositol-3 quinase (PI-3K) incluindo AKT e FOXP1(38).

Por outro lado, estas duas neoplasias apresentam elevada expressão de componentes da via das citocinas, membros da família do Fator de Necrose Tumoral (TNF) e elementos da matrix extra-celular(35) (Figura 3). A ativação da via do TNF pode levar tanto à apoptose quanto a ganho de vantagem de sobrevivência celular através da ativação de NFκB(39). Os estudos de Rosenwald et al. (36) e Savage et al. (35) demonstraram haver expressão constitutiva de NFκB nos LBPM. Como no linfoma de Hodgkin Clássico, o LBPM mostrou elevada expressão de receptor alfa-1 de Interleucina-13 (IL-13) e NFκB. Proteínas reguladas por estes elementos, STAT1 e TRAF1, respectivamente, puderam ser identificadas através de imunohistoquímica em quase todos os casos de LBPM e LHC(35).

Estes achados sugerem haver uma sobreposição entre os mecanismos envolvidos na patogênese destas duas patologias. A ativação

da via de NF κ B nas células de Reed-Sternberg do linfoma de Hodgkin tem sido descrita e tem sido associada com aumento da sobrevivência das células neoplásicas(40). A ativação desta via tanto nos LBPM e no Linfoma de Hodgkin Clássico pode constituir em um mecanismo de bloqueio da apoptose compartilhado por estas doenças. Mecanismos de resistência à apoptose fazem parte da oncogênese de outros linfomas. Outros tipos de linfomas não-Hodgkin de células B usam esta estratégia como vantagem de proliferação e o fazem através da hiperexpressão de BCL2 e/ou BCL-6(38).

Estudo realizado por Pileri et al. (41), demonstrou alta frequência de mutações no gene BCL-6 e constante ativação de fatores de transcrição como BOB1, Oct-2 e PU.1. Neste estudo a expressão de Oct-2 e BOB-1 foi encontrada em todos os casos de LPMB analisados. Ao contrário dos linfomas de Hodgkin em que a ausência de expressão de imunoglobulina de superfície parece estar relacionada com a expressão defectiva destes fatores de transcrição, isto não ocorre com os linfomas de mediastino (41).

Baseado nas semelhanças moleculares encontradas entre o LBPM e o linfoma de Hodgkin Clássico, Savage et al. (35) propuseram a teoria de que estes dois tipos de linfomas surgem de um precursor comum e a ativação da via de NF κ B confere vantagem de proliferação e de sobrevivência para as células neoplásicas.

A evolução do LBPM e do Linfoma de Hodgkin Clássico a partir desta célula primitiva comum pode resultar da aquisição de eventos secundários distintos – teoria de “second hits”. Outros autores (42) defendem ainda que estas duas patologias representam entidades distintas em extremos opostos de um *continuum* de evolução biológica e que os linfomas da “zona cinzenta”

do mediastino, que possuem diversas características de ambos os linfomas de Hodgkin Clássicos e LBPM, pode representar uma forma intermediária neste *continuum* (42). Existem dados demonstrando semelhanças entre o LHC e outras formas de linfoma não-Hodgkin de Células B (38, 42)

Figura 3. Relação entre o perfil de Expressão Gênica do Linfoma de Hodgkin Clássico e o LBPM. Painele de genes da assinatura molecular do LBPM que estão também tem alta expressão nas linhagens celulares de Linfoma de Hodgkin em comparação com linhagens de LDGCB (Adaptado de Rosenwald et a (36)).

1.2 Origem do Linfoma de Células B: centro germinativo versus pós-centro germinativo

Modelos prognósticos robustos como o IPI podem ser usados para identificar pacientes com LDGCB que apresentam menor chance de cura com a terapia convencional. No entanto, estes modelos empregam variáveis clínicas e não fornecem dados específicos sobre a biologia tumoral e potenciais alvos terapêuticos. Estudos iniciais sugeriam que uma parcela dos LDGCBs pudessem diferir com respeito à célula normal de origem da neoplasia, além de alterações genéticas envolvidas na linfogênese e também na evolução clínica.

O LDGCB parece surgir de um linfócito B normal exposto a antígeno. O desenvolvimento do linfócito B depende de várias etapas, se inicia na medula óssea e se completa no centro germinativo do linfonodo. Esse processo tem grande dependência da aquisição do receptor de célula B (RCB), responsável pela transmissão dos sinais externos que permitem sua sobrevivência, diferenciação e ativação. O RCB é composto por duas imunoglobulinas de cadeia pesada (IgH) idênticas e duas imunoglobulinas de cadeia leve (IgL) kappa ou lambda idênticas. Existem ainda moléculas acessórias acopladas ao RCB (CD79a e CD79b) com domínios intracitoplasmáticos que auxiliam na transmissão intra-celular dos sinais recebidos nos RCB. Através do processo de rearranjo dos genes da IgH e IgL, os linfócitos B são capazes de produzir uma diversidade de imunoglobulinas muito superior aos genes existentes. Esta etapa da maturação do linfócito B encerra-se na medula com este rearranjo dos genes

da IgH e IgL e a aquisição de RCB na superfície do linfócito. As células B que adquirirem um RCB eficiente deixarão a medula óssea e diferenciarão em células B naive, ou seja, ainda sem exposição antigênica. As células B naive podem ser ativadas por antígenos que se liguem aos RCB e participar das respostas imunes. As células B portadoras de RCB ineficientes ou auto-reativos são induzidas à apoptose (43).

O processo que se segue acontece no linfonodo. Nesta fase da maturação, o RCB pode sofrer outras modificações nos genes das Igs pela hipermutação somática e troca de classes. Cada etapa da maturação do linfócito no centro germinativo tem uma estrutura em evolução do RCB peculiar com diferentes marcadores moleculares de diferenciação. Estes perfis moleculares estão associados com determinadas regiões da microanatomia do centro germinativo. Uma neoplasia de células B maduras representa um clone com um rearranjo V(D)J específico, diferente de uma hiperplasia linfóide onde é possível determinar a presença de diversos clones pela presença de diferentes combinações V(D)J (43).

Um dos principais conceitos na patogênese dos linfomas não-Hodgkin se baseia na observação de semelhanças morfológicas e moleculares dos linfomas com determinadas etapas da maturação. Podem ser agrupados em LDGCB derivados do linfócito que se origina em alguma etapa da maturação dentro do centro germinativo ou derivados do linfócito pós-centro germinativo. Nos linfomas difusos de grandes células B há um grupo com perfil molecular mais semelhante com o linfócito do centro germinativo (CG) e outro com perfil mais semelhante com o linfócito B ativado ou pós-centro germinativo (LA) (37).

A técnica de “cDNA microarrays” permite uma avaliação quantitativa comparativa de milhares de genes usando microarray de DNA complementar. Esta metodologia tem sido empregada para avaliar a variação de expressão gênica em diversos tipos de tumores. Para usar este método no estudo de processos da biologia do linfócito normal e maligno foi contruído um *microarray* específico - o Lymphochip- selecionando mais de 17.000 genes que são preferencialmente expressos em células linfóides e genes com papel importante na gênese dos linfomas. Estudo de Alizadeeh et al. (37) publicado em 2000 identificou a existência de dois subgrupos de LDGCB com expressão gênica indicativa de diferentes estágios de maturação dos linfócitos B. Um tipo expressava genes característicos de células B do centro germinativo (BCG) e o outro tipo caracterizava-se pela expressão de genes normalmente induzidos durante a ativação *in vitro* de linfócitos B periféricos (célula B ativada). Este estudo mostrou que os pacientes com perfil de expressão semelhante a CG apresentavam sobrevida significativamente superior ao grupo de pacientes com perfil de LA, 76% versus 16%, respectivamente, $p < 0,001$. Este modelo também foi capaz de identificar dois subgrupos com prognóstico distinto para pacientes com IPI baixo. A sobrevida em 5 anos para o grupo de IPI baixo foi de aproximadamente 60%, sendo que para indivíduos com IPI baixo e perfil CG foi de 80% e para indivíduos com IPI baixo e perfil LA foi de 40% (37). Isso possibilitaria pacientes com IPI baixo serem tratados com terapias mais intensas e efetivas.

Embora esta classificação baseada na assinatura molecular seja um modelo prognóstico robusto, sua aplicação não é fácil. Além do mais, esta técnica requer amostras congeladas frescas e com adequada quantidade de

RNA. Para o diagnóstico dos tumores de mediastino, cada vez mais tem-se utilizado biópsias por agulha guiadas por tomografia computadorizada, resultado em fragmentos escassos de material biológico. Recentemente, Hans et al. (44) publicaram estudo mostrando a viabilidade de se empregar a técnica de imunoistoquímica e tissue micro-array como instrumento capaz de dividir os LDGCB em subgrupos prognósticos distintos. Esta técnica mostrou-se superior à técnica de cDNA microarray em correlacionar expressão gênica com prognóstico em 139 casos de linfomas não-Hodgkin difusos de células B analisados. O painel de marcadores utilizados por estes autores que mostrou capaz de dividir os linfomas em GC e LA e correlacionar com prognóstico foi: BCL-6, CD10 e MUM-1. A partir destes marcadores foi construído um algoritmo capaz de se correlacionar com os padrões de expressão gênica em 71% dos casos de CG e 88% dos casos pós-CG(44). Este estudo mostrou que a imunoistoquímica pode ser usada para classificar os subtipos de linfomas não-Hodgkin em CG e LA e ser utilizado como fator prognóstico similar ao modelo de microarray de cDNA.

Em resumo, uma nova classificação dos LDGCB foi desenvolvida a partir do perfil de expressão gênica. Dois grupos com prognósticos distintos puderam ser reconhecidos, um com características do linfócito do centro germinativo (CG) e outro com perfil gênico semelhante ao linfócito ativado (LA). Através da análise imunoistoquímica e empregando apenas 3 marcadores, Hans et al. (44) puderam agrupar os LNH difusos em LA e CG com poder prognóstico significativo. Ainda empregando a técnica de *microarray* de cDNA, Rosenwald et al. (36) e Savage et al. (35) forneceram uma assinatura molecular para o LBPM. Além de apresentar um conjunto de genes diferencialmente expressos distinto dos linfomas difuso de grandes

células B, estes estudos mostraram que o perfil de expressão gênica do LBPM é mais próximo do linfoma de Hodgkin clássico. Apesar desta importante contribuição para o entendimento dos linfomas de mediastino, muitos pontos acerca da origem destes linfomas e a relação com os linfomas de Hodgkin ainda necessitam ser esclarecidos.

1.3 Marcadores de Diferenciação do Linfócito B - BCL-6, MUM1 e CD10

BCL-6 - o gene *BCL-6* tem 26 kb, contem 10 exons e age como um fator regulador da transcrição de genes relacionados à proliferação e diferenciação celular. BCL-6 promove estimula a proliferação do linfócito bloqueando a expressão do inibidor de ciclo celular p27KIP1. Outro mecanismo que estimula a proliferação e diferenciação da célula B é a inibição da expressão de BLIMP1, que é um grande regulador da diferenciação da célula plasmática (45). A expressão gênica constitutiva de BCL-6 está restrita aos linfócitos B do centro germinativo (centroblastos e centrócitos). A ausência de transcrição de BCL-6 impede a formação de centros germinativos nos linfonodos estimulados, conforme ilustrado na Figura 4.

Figura 4. Relação de BCL-6 e diferenciação do linfócito B. A super-expressão de BCL-6 leva a estimulação da proliferação celular, além de inibir a proteína BLIMP1, que é um grande inibidor da diferenciação do plasmócito. Este esquema mostra que a desregulação de BCL-6 pode levar a um desequilíbrio destas redes de sinalização resultando no bloqueio da diferenciação do plasmócito e promovendo a proliferação neoplásica (adaptado de Shaffer et al. (46)).

A expressão proteica de BCL-6 está presente também nos linfomas, principalmente no linfoma de Burkitt, folicular e parte dos LDGCB, com padrão similar ao do centro germinativo (46). O rearranjo gênico de BCL-6 é um dos mais frequentes nos LDGCB (30-40%). A translocação mais comum é a t(3:14)(q27:q32), envolvendo geralmente o gene da IgH. Isso leva a ativação contínua do gene BCL-6 bloqueando a progressão da diferenciação, inibindo a apoptose e facilitando a proliferação pela modulação das proteínas p27, p53 e ciclina D2 (46). A translocação de BCL-6 não é um evento suficiente para transformação linfomatoso, sendo que também pode ser observada em linfócitos do centro germinativo de indivíduos saudáveis (47). O rearranjo de BCL-6 foi inicialmente associado a melhor prognóstico em pacientes portadores de LDGCB, porém estes resultados não foram confirmados por outros estudos (48-50). No LBPM a hiper-expressão de BCL-6 foi detectada em cerca de 46% dos casos, além disso foi encontrada elevada taxa de mutação somática de Ig, reforçando a

tese de que este linfoma deriva de uma célula do CG(41). Os autores concluem que a isoladamente BCL-6 não deve ser utilizado como marcador de linfomas oriundos de células do centro germinativo, pois neste estudo havia casos que apresentavam mutação em BCL-6 e ausência de mutações no gene da Ig. Outro estudo demonstrou elevada expressão de BCL-6 em 19 dos 19 casos de linfoma B primário de mediastino(51).

BCL-6 tem sido utilizado como um marcador de células do centro germinativo. O papel da expressão isolada de BCL-6 como fator prognóstico para os LBDGC é controverso segundo os trabalhos mais recentes (44, 50) e não foi correlacionado com aspectos clínicos nos LBPM (41, 51).

MUM1 (Multiple Myeloma Oncogene 1) – O produto do gene MUM1 ou IRF4 é um membro da família do fator regulador de Interferon (IRF), com importante papel na regulação da expressão gênica da resposta a sinalização por Interferons e outras citocinas. A translocação do gene MUM1 com o gene da cadeia pesada da Ig, t(6;14) (p25;q24) resulta na hiperexpressão de MUM1 fazendo com que este gene exerça atividade proliferativa no processo de linfogênese(52, 53), conforme ilustrado na Figura 5.

Figura 5. Diferenciação Linfocitária Mediada por IRF-4 (MUM1). Após estímulo celular pela Interleucina 4 (IL-4), ocorre aumento de expressão de IRF4, que interage com STAT6 no citoplasma e forma complexos heterodímeros de IRF4/STAT6. Este complexo entra no núcleo e induz expressão GATA3 que atua no promotor de IL4, elevando sua expressão que finalmente regula a hiper-expressão de IL4, responsável pela diferenciação do linfócito. No citoplasma a formação de heterodímeros entre STAT6/IRF4 pode ser bloqueada pela ação de BCL-6. (adaptado de Lohoff M et al. (53))

MUM1 está expresso mais frequentemente expresso em linfócitos T ativados e linfócitos B pós-centro germinativo ou plasmócitos (52), ou seja, é encontrado em células que deixaram o centro germinativo ou células ativadas. Em função disto, MUM1 tem sido reconhecida como um marcador de linfócitos pós-centro germinativo ou linfócitos ativados. Nos LBPM expressão de MUM1 pode chegar a 75% e, ao contrários dos linfócitos normais em que a expressão de MUM1 e BCL-6 são excludentes, a maioria dos casos de LBPM co-expressam MUM1 e BCL-6 (41).

CD10 – CD10 é uma molécula transmembrana tipo II que tem atividade de metalo-peptidase dependente de zinco. Mais especificamente, CD10 cliva aminoácidos 1-3 aminoterminal de diversos peptídeos com preferência por aminoácidos neutros. A expressão é encontrada em diversos tecidos normais como epitélio renal e intestinal, mas predomina em células

do centro germinativo de tecido linfóide reacional. Diversos estudos correlacionam estas enzimas de superfície celular com importantes processos da biologia de células hematopoiéticas normais e malignas(54). Estas metalo-proteinases de membrana funcionam como parte da alça regulatória negativa, limitando a resposta celular a determinados peptídeos.(Figura 6)

Figura 6. Mecanismo de ação de CD10. Esquema mostra a localização de CD10 e a degradação de peptídeos pelas metaloproteinases, levando a diminuição da atividade do Receptor para Peptídeos localizados na membrana (adaptado de Shipp et al. (55)

O antígeno de CD10 é expresso por linfócitos imaturos e por células B do centro germinativo, além de granulócitos e células de leucemia linfoblástica aguda B (LLA-B), sendo que CD10 ou CALLA é um importante marcador desta leucemia. É reconhecida como um marcador relacionado com etapas de maturação dos linfócitos que ocorrem dentro do centro germinativo(55). A expressão desta molécula em certas neoplasias linfóides A positividade para CD10 nos LDGCB foi encontrada em 21% dos casos e esteve associada a pior sobrevida no estudo de Colomo et al.(51). Por outro lado, no estudo de Hans et al. (44), a expressão de CD10 foi observada em

28% dos pacientes e esteve correlacionada com maior sobrevida ($p=0,019$). Diante destes dados discordantes, o papel isolado de CD10 como fator prognóstico nos LDGCB ainda não está totalmente definido. Estes estudos foram muito importantes em determinar a função de CD10 na classificação destes linfomas em CG e LA e correlacionar com prognóstico. Nos LBPM a expressão de CD10 foi encontrada em 21 a 30% dos casos (41, 51).

Em suma, a caracterização das neoplasias linfóides baseada na semelhança com o linfócito do centro germinativo ou pós centro germinativo tem significado prognóstico. A combinação de CD10 e BCL-6 como marcadores de centro germinativo e MUM1 como molécula expressa nas etapas finais do processo de diferenciação do linfócito B permite classificar os linfomas difusos em dois subgrupos de evolução distinta. Para os LBPM, os fatores prognósticos clássicos como o IPI podem não ser a melhor ferramenta para se estimar o risco e outras variáveis moleculares não são robustas como preditoras de resultado e evolução após tratamento.

O modelo de Hans et al. (44) é uma ferramenta prognóstica confiável e de fácil execução para o estudo dos linfomas difusos de grandes células B. A combinação de CD10, BCL-6 e MUM1 ainda não foi validada em conjunto como instrumento prognóstico nos LBPM, ao contrário dos demais linfomas difusos nodais. Desta forma, o presente estudo tem como objetivo estudar variáveis clínicas e moleculares no LBPM e correlacionar com o prognóstico desta neoplasia.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

- Avaliar os aspectos clínico-patológicos e do tratamento dos pacientes portadores de LBPM tratados no Hospital A. C. Camargo.
- Avaliar através de imunoistoquímica a expressão das proteínas BCL-6, CD10 e MUM1 em pacientes portadores de Linfoma B Primário de Mediastino tratados no Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer AC Camargo, correlacionando a expressão destas proteínas com variáveis clínico-patológicas e sobrevida.

MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram analisados retrospectivamente 44 pacientes portadores de LPMB atendidos no hospital do Câncer AC Camargo no período de 1989 a 2007. A busca dos casos foi feita a partir dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica deste hospital. A pesquisa foi realizada a partir do diagnóstico de linfoma não-Hodgkin e topografia mediastino. Os dados clínicos foram coletados dos prontuários arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatístico do hospital e sumarizados em formulários padronizados.

Todos os casos possuíam arquivadas lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina. Uma parcela dos casos não continham blocos de parafina disponíveis. Todos os casos foram revistos em conjunto com dois patologistas (VPA e FAS) quanto ao diagnóstico. Casos anteriormente classificados pela proposição de Kiel ou Work Formulation foram devidamente identificados e reclassificados de acordo com a classificação atual da OMS (1). Os casos cujo diagnóstico foram compatíveis com linfoma linfoblástico e linfoma folicular foram excluídos. Os blocos de parafina foram identificados, novas lâminas cortadas e coradas com HE e revistos em relação à presença de material suficiente para o estudo.

Crítérios de Elegibilidade

Foram incluídos neste estudo apenas pacientes portadores de linfoma não-Hodgkin Primário de Mediastino, imunofenótipo B.

Demais critérios de inclusão são:

- doença predominantemente em mediastino;
- pacientes com idade superior a 16 anos
- ausência de tratamento prévio
- sorologia para HIV negativa
- disponibilidade de dados clínicos e anatomopatológicos.
- positividade para CD20

Pacientes com idade abaixo de 16 anos foram excluídos devido à diferença na padronização dos protocolos de tratamento da instituição para esta faixa etária. Os pacientes abaixo de 16 anos seguiam os protocolos de quimioterapia e radioterapia do Departamento de Pediatria.

3.2. Questões Éticas

O projeto contendo informações sobre o estudo, bem como dados da casuística, foi submetido à Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital AC Camargo e à comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMUSP, tendo sido aprovado em ambas instituições. O termo de consentimento foi dispensado por se tratar de estudo retrospectivo envolvendo material de arquivo parafinado. O anonimato e o sigilo sobre a identidade dos pacientes foram preservados em todas as etapas do estudo.

3.3 Análise de Fatores Clínicos e Anatomopatológicos

As variáveis clínicas analisadas foram: idade, gênero, raça, estadió clínico (Classificação de Ann Arbor), acometimento de sítios extranodais, Índice de Prognóstico Internacional (International Prognostic Index, IPI) (14), dados laboratoriais (DHL), presença de sintomas B (febre, sudorese e perda de peso). Com relação ao tratamento, os pacientes que receberam quimioterapia foram divididos em três grupos: 1) os que receberam o esquema CHOP ou similares ao CHOP, 2) os que receberam outros tratamentos contendo antraciclinas (MACOP-B/VACOP-B/ProMACE-CytaBOM) e 3) demais tratamentos. Foram identificados os casos submetidos à radioterapia complementar, subdividido em radioterapia com intuito de consolidação ou radioterapia paliativa. Estes dados foram coletados dos prontuários médicos e catalogados em fichas padronizadas.

Resposta completa foi estabelecida se após o término do tratamento de primeira linha não havia doença clinicamente detectável por pelo menos 3 meses. Os pacientes que apresentavam redução de mais de 50% do tumor foram classificados como resposta parcial, persistência de doença ou doença estável se houve redução de menos de 50% da massa e progressão de doença se houve aumento nas dimensões do tumor ou surgimento de novas lesões. A sobrevida livre de doença foi calculada pela subtração da data do término da quimioterapia para os pacientes com resposta completa até a recidiva da doença. O IPI foi estabelecido segundo o modelo adaptado de Biasoli et al.(56).

Aplicando o algoritmo proposto por Hans et al. (44), os casos foram classificados em CG se apresentassem CD10 positivo. Os casos CD10 negativo e BCL-6 negativos foram classificados como LA, se BCL-6 positivo

e MUM1 positivo foram classificados como LA e MUM1 negativo classificados como CG.

3.4 Reações Imunoistoquímicas

Os tecidos conservados em bloco de parafina e identificados como tumor foram submetidos a cortes seriados de 3 μ m de espessura e montados em lâminas previamente tratadas com 3-aminopropil-trietoxil-silano (Sigma, St Louis, MO, USA).

O estudo imunoistoquímico foi realizado em 17 passos: 1) desparafinação dos cortes histológicos: 3 banhos em Xilol (5 minutos cada), 4 banhos de álcool, lavagem por 5 minutos em água corrente; 2) recuperação antigênica na câmara de Pascal (Câmara de Pressão) em solução Citrato pH 6,0 à 125°C (30 segundos após atingir 125°C e pressão entre 20 e 25 psi); 3) lavagem em água corrente por 5 minutos; 4) bloqueio da peroxidase endógena: 5 minutos com Peróxido de Hidrogênio 10 volumes; 5) lavagem em PBS; 6) bloqueio de proteínas: 20 minutos com bloqueador de proteínas (DAKO); 8) lavagem em PBS; 9) incubação com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer, Novocastra, Newcastle, UK) por 30 minutos; 10) lavagem em PBS; 11) Incubação com NovoLink Polymer por 30 minutos; 12) lavagem em PBS; 13) revelação com cromógeno diaminobenzedine (DAB) em 5 minutos (Kit Liquid DAB + Substrate Chromogen System; Dako, Carpinteria, CA, USA); 14) lavagem em água corrente; 15) contracoloração com hemotoxilina de Harris por 2 minutos; 16)

lavagem em água corrente por 5 minutos; 17) desidratação em álcool, Xilo, montagem com Entellan (Merck, Darmstadt, Germany).

Para as reações imunoistoquímicas os seguintes anticorpos foram empregados: proteínas associadas às diferentes etapas de diferenciação linfóide, CD10 (clone 56C6, Novocastra, diluição 1:50), BCL-6 (PG-B6p, DAKO, diluição 1:50) e MUM1 (MUM1p, DAKO, diluição 1:100).

Em cada análise, cortes de tonsila palatina e linfonodos reacionais foram utilizados como controle positivo das reações de imunoistoquímica. Os controles negativos de todas as reações foram estabelecidos pela retirada do anticorpo primário e sua substituição por imunoglobulina do mesmo idiótipo.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum e os resultados foram graduados de acordo com a porcentagem de células positivas. Para CD10 e BCL-6, os casos foram considerados positivos se nas áreas mais representativas do tecido analisado, em aumento de 400 vezes, pelo menos 10% das células foram coradas, de acordo com critérios previamente estabelecidos (50, 51, 55, 57). Este ponto de corte foi eleito em concordância com a maioria dos estudos(50, 51). Nestas áreas também foi avaliada a intensidade da marcação, embora não tenha sido utilizada para definir como positivo ou negativo. Os casos foram graduados segundo a % de células positivas em 0 (< 10%), 1 (de 10 a 50%), 2 (de 51 a 90%) e 3 (> 90%), e intensidade da marcação em 0 (ausência de marcação), 1 (fraca), 2 (moderada), 3 (forte).

A expressão de MUM1 foi classificada de acordo com a média das células coradas (<10%, 10-30%, 30-70% e >70%). A escolha dos pontos de

corte de 30% e 70% foi baseado nos estudos de Hans et al. (44) e van Imhoff et al. (57) que detectaram maior significância com estes valores. Para tanto, a análise de MUM1 foi feita através do Sistema Automatizado de Imagem Celular (ACIS III DAKO, Carpinteria, CA, EUA), disponível no serviço de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo, a fim de se precisar a graduação e dividir as reações de acordo com o ponto de corte escolhido.

Em resumo, os componentes do ACIS consistem de um microscópio digital automatizado (escaneador de lâminas) e de um computador com janela para captura de imagens e um sistema de processamento de imagens. Cada lâmina corada por imunohistoquímica é digitalizada e as imagens capturadas são revisadas pelo patologista na tela do computador. Um mínimo de seis campos de maior aumento são selecionados pelo patologista. O ACIS é capaz de detectar, contar, e classificar células baseadas na cor, tamanho e formato. Este sistema reconhece 256 níveis de intensidade da coloração imunohistoquímica que são convertidos para um escore fracionado da área selecionada. Uma média do escore de todas as áreas também é calculada. Detalhes sobre o hardware e software do ACIS são avaliáveis nos trabalhos de Bauer et al. (58) e Wang et al. (59). Para a análise da expressão de MUM1 foi utilizado o programa computacional cytoplasma_histo, residente no sistema e que mede a intensidade de reação no citoplasma. Foi analisada a média porcentagem de células coradas, a mediana da porcentagem, desvio padrão.

3.5 Métodos Estatísticos

A distribuição de frequências foi utilizada para descrever as variáveis categóricas e as medidas de tendência central e de variabilidade para as

variáveis numéricas. Para verificar a associação entre as variáveis categóricas e Resposta, Modelo de Hans, em tabelas 2x2, o teste de freqüências do qui-quadrado foi adotado e quando observado que pelo menos uma freqüência esperada foi menor do que 5, o teste exato de Fisher foi aplicado. A técnica de Kaplan-Meier foi utilizada para estimar as probabilidades de sobrevida global e livre de doença. O teste de logrank foi aplicado para verificar as diferenças entre as curvas de sobrevida. O nível de significância de 5% foi considerado em todos os testes estatísticos. O modelo de regressão de COX foi usado para estimar os riscos relativos para morte (RR) e respectivos intervalos de confiança de 95%. Para a seleção das variáveis candidatas a possíveis fatores prognósticos, a técnica *stepwise (forward)* foi adotado. O pacote estatístico Stata, versão 7.0 foi usado para a realização das análises estatísticas.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Variáveis Clínicas

Este estudo partiu da avaliação inicial de 45 casos matriculados na instituição, sendo que 44 pacientes foram incluídos na análise de frequência das variáveis clínicas. Um caso foi excluído por perda de seguimento pois teve tempo de seguimento menor que 2 anos, sendo que a data da última visita foi superior a 5 anos. Destes 44 casos, apenas 29 pacientes possuíam material em bloco de parafina adequado para as reações de imunoistoquímica. O tempo de seguimento variou de 0,4 meses a 220,3 meses, com mediana de 30,7 meses e média de 47,6 meses.

As frequências das variáveis demográficas estão sumarizadas na tabela 2. A idade dos pacientes variou de 16 anos a 82 anos, com mediana de idade de 28 anos e 70% dos pacientes eram do sexo feminino. Apenas dois casos apresentaram acometimento de medula óssea. Dez pacientes tinham acometimento extra-nodal, 6 com acometimento pleural e/ou pericárdico, 2 com acometimento pleural e pulmonar, 1 com acometimento pulmonar e gástrico, 1 com acometimento pancreático. Em 10 pacientes o valor de DHL não foi identificado. Em relação ao IPI, 84% dos casos apresentavam de 0 a 2 variáveis desfavoráveis e 16% apenas apresentavam mais que 3 variáveis desfavoráveis. A maioria dos pacientes (85%) apresentavam doença Bulky, com lesões maiores que 6 a 10 cm de diâmetro. A maioria dos casos (65%) tinham índice de *performance status* (ECOG) menor ou igual a 1.

Tabela 2. Distribuição da casuística de acordo com as variáveis clínicas e de tratamento.

Variável	Categoria	N	(%)
Idade (anos)	n	44	
	Variação	16 – 82	
	Mediana	28	
	Média (DP)	37,6 (17,7)	
Sexo	Feminino	31	(70,4)
	Masculino	13	(29,6)
Estadio Ann Arbor	I-II	21	(47,7)
	III-IV	23	(52,3)
Bulky	Presente	37	(88,1)
	Ausente	5	(11,9)
ECOG	0	8	(18,2)
	1	25	(56,8)
	2	10	(22,7)
	3	1	(2,3)
IPI (fatores)	0-2	37	(84,1)
	3-5	7	(15,9)
Medula Óssea	Sim	2	(4,6)
	Não	41	(95,4)
Acometimento Extranodal	Sim	10	(22,7)
	Não	34	(77,3)
Sintomas B	Sim	17	(39,5)
	Não	26	(60,5)
Qt 1ª linha	CHOP*	34	(77,3)
	Outros	10	(22,7)
Rituximabe	Sim	8	(18,2)
	Não	36	(81,8)
Radioterapia Mediastino	Sim	26	(59,1)
	Não	18	(40,9)
Resposta	Completa	25	56,8
	Não Completa	19	43,1

DP (desvio padrão). * Qt 1 linha 1- CHOP/CHOP-símile, 2 – Outros esquemas

Com relação à terapia, 77% (34/44) dos pacientes foram tratados com esquema de CHOP, sendo que 23% (10/44) receberam outro esquema, destes 2 casos receberam regimes não contendo antraciclinas, 4 casos receberam Promace-Cytabom, 3 casos protocolos pediátricos contendo antraciclina e 1 caso CODOX/IVAC. Radioterapia de mediastino foi empregada em 26 pacientes (56%), destes 18 após terem atingido resposta completa, 4 após terem atingido resposta parcial, 1 após progressão de doença após esquema de primeira linha. Dos 44 pacientes 18% receberam terapia com Rituximabe, combinado ao esquema CHOP, sendo que todos foram tratados a partir de 2004.

4.2 Marcadores Imunoistoquímicos

Para a análise de CD10 e BCL-6, foram considerados positivos os casos com presença de mais de 10% das células com expressão destas proteínas (Figura 7). Dos 29 casos, 7 foram positivos e 22 negativos para CD10. A maioria dos casos foram positivos para BCL-6, 19/29 positivos e 10/29 negativos. Para a interpretação de MUM1, foi utilizado o sistema automatizado de leitura de imunoistoquímica. Para a positividade de MUM1 foi considerado o ponto de corte de 10%. Além disso, os casos foram avaliados também levando em conta outros valores de corte dependendo da intensidade de colocação pelo método automatizado (ponto de corte de 30% e 70%). Dos 29 pacientes analisados, 17 foram positivos e 12 negativos para MUM1 com *cutoff* de 10%, 14 positivos e 15 negativos para *cutoff* de 30% e 5 positivos e 24 negativos para *cutoff* de 70%. A co-expressão de BCL-6 e

MUM1 (>10%) foi vista em 13/16 dos pacientes BCL-6+. E a co-expressão de CD10 e MUM1 (>10%) ocorreu em 4 pacientes CD10+ e em 2 pacientes com *cutoff* de 30% para MUM1 (Tabela 3)

Figura 7. Reações de Imunoistoquímica. Coloração mostrando resultados positivos. 1 – CD10 (mais que 70% das células coradas). 2 – amplificação da coloração por CD10, mostrando distribuição do antígeno predominantemente em membrana das células neoplásicas. 3 – visualização da expressão de BCL-6, predominantemente padrão nuclear. 4. Padrão de expressão de MUM1, marcação nuclear. Aumento de 400 X.

Aplicando o modelo de Hans para os 29 casos, considerando o valor de positividade para CD10 e BCL-6 e MUM1 acima de 10% , 18 casos apresentaram padrão de expressão semelhante ao perfil do linfócito ativado (LA) e 11 casos padrão de linfócito do centro germinativo (CG) como visto na Figura 8.

Figura 8. Classificação de acordo com algoritmo de Hans et al (44). Divisão dos linfomas baseado na expressão de CD10, BCL-6 e MUM1 e distribuição dos 29 casos neste modelo.

A Tabela 4 mostra a distribuição das variáveis clínicas e moleculares com relação à resposta à quimioterapia de primeira linha. Nenhuma variável clínica ou de tratamento mostrou associação com a resposta ao tratamento.

Com relação aos marcadores, somente MUM1 com marcação acima de 70% mostrou associação com resposta. Todos os 17 casos com resposta completa apresentaram MUM1 < 70% e todos os 5 casos que foram positivos para MUM1 >70% não tiveram resposta completa ($p=0,015$),

Tabela 4. Nenhuma associação foi observada entre o algoritmo de Hans et al. e as variáveis clínicas e patológicos.

Tabela 3. Frequência dos marcadores imunoistoquímicos e modelo prognóstico

Variável	Categoria	N	(%)
CD10	Negativo	22	(75,9)
	Positivo	7	(24,1)
BCL-6	Negativo	10	(34,5)
	Positivo	19	(65,5)
MUM1 $\geq 10\%$	Negativo	12	(41,3)
	Positivo	17	(58,6)
MUM1 $\geq 30\%$	Negativo	15	(52,2)
	Positivo	14	(47,8)
MUM1 $\geq 70\%$	Negativo	24	(82,4)
	Positivo	5	(17,6)
Modelo HANS	CG	11	(37,9)
	LA	18	(62,1)

* MUM1 > 10%; CG – perfil do linfócito do centro germinativo, LA, perfil do linfócito ativado

Tabela 4. Distribuição das variáveis de acordo com Tipo de Resposta à Quimioterapia de Primeira Linha

Variável	Categorias	Resposta				p
		Não Completa	Completa	n	%	
Faixa etária (anos)	≤ 28	9	(47,4)	14	(56,0)	0,570
	>28	10	(52,6)	11	(44,0)	
Sexo	Feminino	12	(63,2)	19	(76,0)	0,355*
	Masculino	7	(36,8)	6	(24,0)	
Estadio Ann Arbor	I-II	12	(63,2)	17	(68,0)	0,737
	III-IV	7	(36,8)	8	(32,0)	
Bulky	Presente	16	(88,9)	21	(87,5)	>0,999*
	Ausente	2	(11,1)	3	(12,5)	
IPI (Fatores)	0-2	14	(73,7)	23	(92,0)	0,210*
	3-5	5	(26,3)	2	(8,0)	
Infiltração Medula Óssea	Sim	0	(,0)	2	(8,0)	0,502*
	Não	18	(100,0)	23	(92,0)	
Acometimento Extranodal	Sim	4	(21,1)	6	(24,0)	0,817
	Não	15	(78,9)	19	(76,0)	
Sintomas B	1	6	(33,3)	11	(44,0)	0,480
	2	12	(66,7)	14	(56,0)	
Qt 1 linha	1	13	(68,4)	21	(84,0)	0,287*
	2	6	(31,6)	4	(16,0)	
Rituximabe	Sim	2	(10,5)	6	(24,0)	0,433*
	Não	17	(89,5)	19	(76,0)	
CD10	Negativo	11	(78,6)	11	(73,3)	>0,999*
	Positivo	3	(21,4)	4	(26,7)	
BCL-6	Negativo	6	(42,9)	4	(26,7)	0,450*
	Positivo	8	(57,1)	11	(73,3)	
MUM1 > 10%	Negativo	5	(42,9)	7	(46,7)	0,837
	Positivo	9	(57,1)	8	(53,3)	
MUM1 > 30%	Negativo	6	(37,5)	10	(71,4)	0,198
	Positivo	10	(62,5)	4	(28,5)	
MUM1 > 70%	Negativo	10	(66,7)	14	(100,0)	0,015*
	Positivo	5	(33,3)	0	(0,0)	
Modelo HANS **	CG	4	(33,4)	7	(41,1)	0,573
	LA	8	(66,5)	10	(58,8)	

p-valor obtido pelo teste do qui-quadrado * p-valor obtido pelo teste exato de Fisher
NA: Não avaliável estatisticamente; ** MUM1 > 30%

4.3 Sobrevida

A sobrevida mediana para os 44 casos foi de 37 meses. A sobrevida global aos 5 e 10 anos foi de 47,0% e 47% (Gráfico 1).

A sobrevida global em 5 anos para as variáveis clínicas está descrita na tabela 5 e para os marcadores imunoistoquímicos na tabela 6. A análise univariada mostrou pior sobrevida para IPI 3-5 em relação a IPI 0-2, (50,4 versus 28,6, $p=0,035$) tratamento com radioterapia complementar correlacionou com maior sobrevida global em 5 anos (65,6 x 22,2%, $p=0,003$) (Figura 10). Os pacientes que atingiram resposta completa tiveram melhor evolução em relação aos pacientes classificados como resposta não completa, 67,3% versus 21%, $p=0,0001$ (Gráfico 2).

As taxas de sobrevida global em 5 anos para os marcadores imunoistoquímicos estão sumarizadas na Tabela 6. A positividade para MUM1 esteve associada com pior sobrevida (Gráfico 3). Classificando os casos de acordo com o algoritmo proposto por Hans et al, não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa quanto à sobrevida global em 5 anos. A expressão de MUM1 este relacionada com pior sobrevida mesmo empregando dois outros pontos de corte de positividade (30% e 70% das células).

A sobrevida livre de doença (SLD) foi calculada para 25 casos que completaram tratamento e obtiveram resposta completa. Destes 25 casos, 7 (28%) apresentaram recidiva. O tempo para ocorrência de recidivas variou de 5,8 a 130,3 meses com mediana de 15,0 meses e média de 28,8 meses, calculado entre a data de final de tratamento e data do diagnóstico da

recidiva. A sobrevida livre de doença em 5 e 10 anos foi de 81,7% e de 81,7% respectivamente. Nenhuma associação foi verificada entre a SLD e as variáveis clínicas e moleculares. MUM1 positivo apresentou pior sobrevida livre de doença em 5 anos comparado com MUM1 negativo (92% versus 57%), com tendência à significância estatística, $p=0,051$.

A análise univariada foi realizada para as variáveis que mostrarem significância estatística pelo Método de Kaplan-Meier. O modelo multivariado, através da técnica stepwise no modelo de regressão de COX foi calculado para os 29 casos com dados sobre clínicos e de MUM1 disponíveis, mostrou que somente as variáveis resposta e MUM1 foram fatores prognósticos (tabela 7). Pacientes que não apresentaram resposta completa tiveram risco para morte 5 vezes maior do que os com resposta completa, assim como os pacientes com MUM1 positivo tiveram risco de morte 4 vezes maior do que aqueles com MUM1 negativo.

Tabela 5. Probabilidade de Sobrevida Global em 5 anos de acordo com as variáveis clínicas (n=44).

Variável	Categorias	SG 5 anos (%)	p
Estadio	Ann		
Arbor	I-II	52,6	0,1991
	III-IV	35,8	
Bulky	Presente	47,8	0,6884
	Ausente	40,0	
ECOG	0	72,9	0,5172
	1	40,8	
	2	50,0	
IPI (Fatores)	0-2	50,4	0,0356
	3-5	28,6	
Medula Óssea	Sim	50,0	0,8229
	Não	48,3	
Extranode	Sim	37,7	0,5894
	Não	50,0	
Sintomas B	Sim	48,8	0,9576
	Não	47,9	
Qt 1 linha *	CHOP	45,9	0,8191
	Outros	50,0	
Rituximabe	Sim	47,2	0,9244
	Não	41,6	
Radioterapia	Sim	65,6	0,0047
Mediastino	Não	22,2	
Resposta	Não Completa	21,0	<0,0001
	Completa	67,3	

p-valor obtido pelo teste de *Logrank*. Qt 1 linha (quimioterapia de primeira linha): CHOP = CHOP/CHOP-símile, Outros- outros esquemas

Tabela 6. Probabilidade de Sobrevida Global em 5 anos de acordo com os marcadores imunoistoquímicos (n=29)

Variável	Categoria	SG 5 anos (%)	p
CD10	-	44,4	0,9267
	+	44,9	
BCL-6	-	50,0	0,6858
	+	39,7	
MUM1 > 10%	-	66,7	0,0147
	+	24,8	
MUM1 > 30%	-	62,5	0,0010
	+	15,0	
MUM1 > 70%	-	53,6	<0,0001
	+	0,0 (2- anos)	
Modelo Hans	CG	11	0,1560
	LA	18	
		34,0	

p-valor obtido pelo teste de Logrank; (+ positivo, - negativo).

Tabela 7. Análise Univariada e Multivariada para as variáveis clínicas e patológicas. RR (Risco Relativo). IC – intervalo de confiança de 95%; (n=29)

Característica	RR	IC 95%
Análise Univariada		
<i>IPI</i>		
0-2 x 3-5	2.78	1.0 - 7.6
<i>Resposta</i>		
RC x não-RC	5.38	2.2 – 13.4
<i>Radioterapia</i>		
Sim x Não	3.17	1.4 – 7.4
<i>MUM1</i>		
≥ 10% versus <10%	3.92	1.2 – 12.6
≥ 30% versus <30%	5.68	1.8 – 17.8
≥ 70% versus < 70%	8.99	2.7 – 30.5
Análise Multivariada		
<i>Resposta</i>		
RC versus não-RC	4.28	1.3 – 13.6
<i>MUM1 cutoff 10%</i>		
Positivo x Negativo	3,54	1.1 – 11.5

Gráfico 1. Curva de Sobrevida Global (n= 44 pacientes)

Gráfico 2. Sobrevida Global e variáveis clínicas (n=44 pacientes). A – resposta completa x não resposta completa. B. IPI alto (3-5) x IPI baixo (0-2). C. Tratamento com Radioterapia x sem Radioterapia.

Gráfico 3. Sobrevida Global e Expressão de MUM1 (n=29 pacientes). Curvas de sobrevida para diferentes valores de corte para positividade de MUM1. A. cutoff de 10% B. Cutoff de 30% . C cutoff de 70%.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O LBPM foi reconhecido como uma entidade clínica e patológica distinta desde 1980(1). Embora exista dificuldade em se distinguir o LBPM dos LDGCB, o linfoma do mediastino atualmente pode ser caracterizado tanto pelo comportamento clínico uniforme quanto pela assinatura molecular recentemente identificada.

No presente trabalho, confirmamos os dados epidemiológicos característico do LBPM. Nesta amostra de 44 pacientes estudados, a mediana de idade foi de 28 anos, com predominância do sexo feminino, 70%. Apenas 7 pacientes (15%) tinham idade superior a 60 anos.

A despeito de ser um estudo retrospectivo, as informações clínicas obtidas para este grupo de 44 foram coincidentes com as características dos pacientes portadores de LBPM previamente descritas (4, 7, 8, 10, 15, 16). Com relação ao estadiamento clínico, 65% dos casos tiveram estadiamento I e II pela classificação de Ann Arbor. A maioria dos pacientes (6/8) que apresentavam estadiamento IV possuíam infiltração pleural ou pericárdica (dado não mostrado). A definição de invasão pericárdica ou pleural em pacientes que apresentam extensa massa mediastinal é muitas vezes feita de forma arbitrária, já que estes órgãos estão em íntimo contato. Baseado nisso, a determinação do risco levando em conta o IPI pode ser equivocada.

O acometimento extranodal foi visto em 10 (22%) dos casos e infiltração medular em apenas 2 casos. A presença de grande massa mediastinal ou Bulky foi vista em 88% dos casos. No estudo publicado por

Zinzani et al (7), a maior série relatada com 426 pacientes analisados, observou-se que 83% dos pacientes tinham estadios I-II, 32 % com acometimento extra-nodal, 5% com infiltração de medula óssea 5% e 83% com Bulky mediastinal.

Não existem estudos clínicos randomizados avaliando as diferentes estratégias de tratamento para o LBPM. Quimioterapia, radioterapia e em alguns casos a terapia de altas doses com transplante autólogo de medula óssea são as modalidades de tratamento empregadas. O esquema CHOP é o mais utilizado atualmente, associado ao Rituximabe, anti-corpo monoclonal anti-CD20 (CHOP-R). Este esquema é denominado de primeira geração, em oposição aos esquemas de terceira geração mais intensos (MACOP-B, VACOP-B e ProMACE CytaBOM). O uso de regimes de primeira geração levou à impressão inicial de que o prognóstico dos LBPM era pior do que o dos outros linfomas difusos. Com o emprego dos regimes de terceira geração a sobrevida dos pacientes portadores de LBPM tem se equiparado a de pacientes com outros LDGCB (11, 12). No estudo retrospectivo de Zinzani et al. (6), a sobrevida em 10 anos foi de 71% para o grupo tratado com esquemas de terceira geração contra apenas 44% para o grupo tratado com CHOP. Estudo recente de Savage et al. (13) analisando 153 pacientes mostrou melhor sobrevida para os pacientes com LBPM comparados com os linfomas difusos ($p<0,001$), e novamente houve tendência de superioridade do esquema MACOP-B ao esquema CHOP. No entanto, aparentemente não houve diferença entre MACOP-B e CHOP-Rituximabe.

No presente estudo, a sobrevida global em 5 anos dos 44 pacientes foi de 47% e a sobrevida livre de progressão de 81%. Estes números estão de acordo com os achados da literatura para o LBPM (2-6, 8, 10, 13, 16). Embora a taxa de sobrevida tenha sido inferior às taxas reportadas pelos estudos mais recentes para esta doença, é necessário considerar que apenas 4 casos foram tratados com esquemas de terceira geração ou mais intensos (ProMACE-CytaBOM), e apenas 8 casos receberam Rituximabe associado à quimioterapia.

A adição do Rituximabe ao regime terapêutico está relacionado a maiores taxas de resposta e sobrevida nos pacientes com LDGCB(9), e parece também ser importante nos linfomas do mediastino, conforme os dados de Savage et al. (13). No entanto, o papel do Rituximabe no tratamento dos LBPM ainda deve ser investigado de forma controlada. Neste estudo não houve diferença significativa na sobrevida para os pacientes que receberam CHOP-R. Além de o número de pacientes tratados com Rituximabe ser bastante reduzido, estes pacientes tiveram um tempo de seguimento relativamente curto se comparado com os demais casos. Todos os pacientes receberam Rituximabe a partir de 2004. É possível que com um grupo maior de pacientes para se analisar, o mesmo benefício na sobrevida obtido com o esquema CHOP-R para os LDGCB possa ser visto também nos LBPM com taxas de cura similares às aquelas observadas com regimes mais dose-intensos.

Pacientes que apresentaram resposta completa após o esquema de primeira linha de quimioterapia tiveram evolução mais favorável. A taxa de

sobrevida em 5 anos para resposta completa foi de 67% contra 21% para aqueles que não obtiveram resposta completa ($p<0,0001$). Dos 19 pacientes que não atingiram resposta completa, 15 (78%) faleceram da doença. Pacientes que não atingiram resposta completa tiveram risco 4 vezes maior de morte na análise multivariada.

Os pacientes que falharam ao esquema de primeira linha apresentam pior evolução, mostrando que os esquemas de resgate são pouco efetivos para o LBPM, ao contrário dos outros tipos de linfomas difusos, em que mesmo após falha ao tratamento de primeira linha parte dos pacientes conseguem ser resgatados com quimioterapia de alta dose. Nosso estudo mostrou que a mediana das recidivas ocorreu em aproximadamente 12 meses. Os pacientes que entraram em resposta completa tiveram sobrevida livre de doença em 5 anos de 83%. Avaliando outras variáveis potencialmente relacionadas com resposta à quimioterapia, nenhuma associação foi identificada. Outro ponto que merece comentário é a definição de resposta completa. Com exceção de 4 pacientes, todos os demais tiveram avaliação de doença realizada por meio de exames de imagem convencionais com Tomografias Computadorizada e Cintilografia com Gálio. Atualmente existem métodos mais sensíveis para detectar atividade de linfoma. A positividade da cintilografia de corpo inteiro com FDG (Flúo-Desoxiglicose), ou PET scan após quimioterapia para linfoma de Hodgkin tem se correlacionado com pior evolução (60). No entanto, na nossa casuística a combinação de tomografia e cintilografia com Gálio foi capaz de

de diferenciar os pacientes em respondedores e não respondedores com correlação com a sobrevida.

O papel da radioterapia na redução do risco de recidiva ainda não está totalmente esclarecida nos LBPM. Massas residuais mediastinais após quimioterapia podem representar tecido fibrótico ou tumor viável. Alguns estudos têm sugerido benefício em se empregar radioterapia de consolidação para lesões iniciais extensas (11). No entanto são análises retrospectivas com pequeno grupo de pacientes. No presente estudo, a taxa de sobrevida para pacientes tratados com radioterapia foi de 65% versus 22% para não irradiados ($p=0,0039$). Deve-se levar em conta que radioterapia foi empregada em 4/14 (28%) dos pacientes que tiveram progressão após quimioterapia, portanto de pior prognóstico. Dentre os 25 pacientes que obtiveram resposta completa 7 não receberam radioterapia, tendo ocorrido 4 óbitos neste subgrupo. Não é possível afirmar que a radioterapia esteve associada com melhores resultados devido à pequena casuística deste estudo e ao fato de a maior parte dos pacientes terem recebido radioterapia após resposta completa. Mesmo assim, estes dados apontam para maior controle da doença com radioterapia. Uma melhor seleção de pacientes que possam se beneficiar desta terapia deve ser realizada.

O IPI é a ferramenta prognóstica mais utilizada para os LDGCB (14). Foi originalmente desenvolvido para os linfomas agressivos, mas sua utilidade para os LBPM é questionável. Dados discordantes sobre o valor prognóstico do IPI nos LBPM têm sido reportados na literatura. (6,9, 13, 17).

Um dos problemas de se empregar o IPI para estes linfomas é a dificuldade de se diferenciar estádios iniciais de estádios avançados com acometimento pleural e pulmonar (estádio I-II x IV) , situação relativamente comum nestes linfomas. No presente estudo, IPI esteve associado com a sobrevida global na análise univariada. Devemos ressaltar que os valores de DHL não estavam disponíveis para um número considerável de pacientes, o que pode comprometer a formulação precisa do IPI.

A maioria dos fatores prognósticos identificados para os LBPM são clínicos. IPI, radioterapia de mediastino, DHL, presença de massa Bulky e resposta completa são variáveis que estão associados com sobrevida na maioria dos estudos(6,9,13,15). A análise imunoistoquímica e molecular forneceram importantes informações para caracterização deste tipo específico de linfoma e puderam diferenciá-lo dos outros tipos de linfomas agressivos. No entanto, a correlação destes achados com prognóstico é escassa (35, 36, 61)

O presente estudo focou na análise de CD10, BCL6 e MUM1 em 29 pacientes portadores de LBPM bem como na validação do algoritmo de Hans et al. (44) para este linfoma. Em concordância com achados prévios (41, 51), encontramos que apenas 25% dos casos eram CD10 positivos. A expressão de CD10 é reconhecida como um marcador de linfócito do centro germinativo (55) e tem associado a melhor prognóstico (44) Por outro lado, a expressão de BCL-6 foi encontrada em 66% dos pacientes. Nenhuma correlação entre a expressão de CD10 e BCL-6 com sobrevida foi observada.

Não existe consenso sobre a classificação dos LBPM de acordo com a similaridade com o linfócito B do centro germinativo. Na análise de CD10 BCL6 em 19 pacientes portadores de LBPM de Leval et al. encontraram um predomínio de CG. Por outro lado, baseando-se na expressão de CD10, BCL6 e na presença de mutação somática na região variável da cadeia pesada do gene de imunoglobulina (IgVH) e de BCL6, Pileri et al. (41) demonstraram que uma parte destes linfomas derivam de células B ativas ou pós CG. Utilizando a classificação descrita por Hans et al. (44), 65% dos casos foram classificados como pós CG na presente série. Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa na sobrevida global para os dois grupos CG versus pos CG, 65% x 34%, $p=0,15$, respectivamente.

Os achados do presente estudo sugerem a classificação imunoistoquímica dos LBPM em CG e pós CG não é uma ferramenta prognóstica confiável. Esta é mais uma informação que reforça as diferenças entre este tipo de linfoma e os LDGCB já observadas pelos estudos de expressão gênica (35-37)). Outro problema na adoção deste sistema de classificação é o fato de até 80% de co-expressão de BCL6 e MUM1, um fenômeno observado em até 50% dos LDGCB e que não corresponde ao padrão mutuamente exclusivo encontrado em células normais do CG. Mais estudos são necessários para esclarecer o papel da expressão e de mutações de *BCL6* e a relação com os diferentes estágio de maturação em linfomas B. Além do mais, a positividade de CD10 é fator determinante no modelo de Hans et al. (44). Nos linfomas do mediastino a expressão de CD10 é relativamente baixa, variando de 21 a 32% (41,52). Desta forma, a

classificação em CG ou LA depende da expressão de BCL-6 para os casos CD10 negativos. O valor de BCL-6 como marcador de linfócitos do centro germinativo tem sido motivo de discussão. No estudo de Hans et al. (44), uma parcela dos casos classificados como CG expressavam MUM1. No nosso estudo, a co-expressão de CD10 e MUM1 ocorreu em 4 dos 7 casos positivos para CD10, embora seja proporcionalmente grande este valor, devemos considerar o limitado poder estatístico deste grupo, não permitindo chegar a uma conclusão precisa sobre este padrão de expressão.

Por outro lado, MUM1 mostrou ser um fator prognóstico independente no presente estudo para os LBPM. MUM1/IRF4 é um regulador importante da expressão gênica mediada por Interferons e outras citocinas (⁵²). A presença de MUM1 caracteriza os estágios finais da diferenciação intra-CG e os subsequentes passos na maturação em direção ao plasmócito e é utilizado para identificar os LDGCB pós-CG ou ativados. A presença de MUM1 está associada com prognóstico adverso nos LDGCB em muitos estudos (44, 62, 63). Este é o primeiro trabalho a demonstrar que a expressão de MUM1 correlaciona-se com prognóstico desfavorável e menor sobrevida nos LBPM. Pacientes com MUM1 positivos tiveram quase 4 vezes maior risco de morte comparados com MUM1 negativos (RR 3,92, IC 95% 1,2 -12,6).

A expressão de MUM1 com diferentes pontes de corte de positividade também correlacionou-se inversamente com a sobrevida. A sobrevida em 5 anos para MUM1 positivo e negativo foi de 12% versus 68% ($p=0,001$) e 53% versus zero ($p=0,0001$), utilizando pontos de corte de células positivas

de 30% e 70%, respectivamente. Todos os pacientes com positividade para MUM1 em mais de 70% das células foram a óbito pela doença. Os pontos de corte descritos para MUM1 na literatura e que se correlacionam com prognóstico variam de 20 (44, 50, 62, 63) a 80% (57, 61). Apesar dos achados de van Imhoff et al. (61) mostrando que valores de ponto de corte inferiores a 20% não se correlacionam com prognóstico nos LDGCB, nossos dados demonstram que o valor de 10% de células positivas é capaz de identificar dois grupos com prognóstico distinto. Esta divergência pode ser decorrente de problemas relacionados às reações de imunoistoquímica e a interpretação das mesmas ou então representar uma real diferença molecular entre estas duas neoplasias.

Os estudos de expressão gênica revelaram uma inesperada semelhança entre o LBPM e o linfoma de Hodgkin clássico. Em ambas neoplasias ocorre a ativação da via de NFkB e frequentemente é encontrada a expressão de MUM1 (22,42). Na presente série, 58% dos pacientes foram positivos para MUM1 e este é mais um dado que aproxima estas duas neoplasias do ponto de vista de desenvolvimento e caracterização imunoistoquímica. Levando em consideração as semelhanças clínicas e moleculares do LH e LBPM acumuladas até o presente, uma abordagem terapêutica alternativa para os linfomas de mediastino de células B pode resultar em melhores resultados, pelo menos para o subgrupo de maior risco de recidiva. As células de Reed-Sternberg do LH clássico apresentam ativação constitutiva de NFkB, o que leva a resistência à quimioterapia convencional. In vitro, a inibição de NFkB leva as células de Reed-Sternberg

para apoptose (64). Estudos clínicos preliminares mostram que os inibidores de proteassoma que bloqueiam NFkB parecem ser promissores no tratamento do linfoma de Hodgkin (65). No futuro, a combinação de quimioterapia com estes agentes podem ser uma alternativa a ser explorada em estudos clínicos para pacientes com LBPM.

Em conclusão, este estudo fornece informações clínicas e biológicas sobre o LBPM. A classificação em CG e pós-CG tem relevância prognóstica nos LDGCB, tanto pelo perfil de expressão gênica como por imunoistoquímica. No entanto, a classificação de acordo com o linfócito do CG de acordo com o algoritmo de Hans et al. não se correlacionou com prognóstico nesta série. Por outro lado, na análise multivariada a expressão de MUM1 e Resposta Completa correlacionaram com a sobrevida. Apesar de alguns estudos apontarem para prognóstico mais favorável dos LBPM em relação aos LDGCB nodais, uma parcela destes tumores apresentam maior agressividade. Assim, são necessários mais estudos para confirmarem estes achados e identificarem os indivíduos em maior risco de recaída e óbito.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

O presente estudo de 44 indivíduos com diagnóstico de LBPM tratados no Hospital A C Camargo permitiu concluir que:

- A amostra estudada apresentou características clínicas uniformes e semelhantes à maioria dos pacientes diagnosticados com esta doença quando comparado com a literatura.
- A sobrevida global e a sobrevida livre de doença deste grupo foram concordantes com as taxas relatadas na literatura quando tratados com esquema de primeira geração (CHOP/CHOP-símbles).

Em relação ao estudo imunoistoquímico com CD10, BCL-6 e MUM1 nos 29 pacientes da mostra permitiu concluir que:

- A positividade para MUM1 esteve associada à pior sobrevida global;
- A classificação dos LBPM em Centro Germinativo ou Linfócito Ativado utilizando modelo de Hans et al. (44) não se correlacionou com prognóstico.

ANEXOS

7 Anexos

	Data Nasc	Idade	Sexo	Data Diagnostico	ESTADIO	Bulky	ECOG	IPI	Extranodal
1	24/11/1976	24	1	17/08/01	2	1	2	2	1
2	21/10/1974	26	1	01/10/99	1	1	1	1	2
3	15/10/1947	53	2	25/04/01	1	1	1	1	1
4	3/11/1936	62	2	18/08/98	2	1	1	2	2
5	29/05/1974	22	1	12/05/97	1	9	1	1	2
6	22/06/1977	25	1	04/07/98	2	1	2	1	2
7	6/7/1973	25	1	28/10/98	2	1	1	1	2
8	6/2/1966	33	1	11/06/99	1	1	1	1	2
9	25/08/1927	71	1	26/03/99	2	2	2	2	2
10	3/1/1957	42	1	22/06/99	1	2	1	1	2
11	21/10/1964	33	2	03/09/98	1	2	0	1	2
12	21/6/1982	17	2	19/01/00	2	1	1	2	1
13	15/10/1977	17	2	02/02/95	2	1	1	1	2
14	23/7/1966	30	2	26/10/95	2	1	1	1	2
15	6/9/1938	57	2	10/10/92	1	1	2	1	1
16	8/5/1939	60	2	25/02/00	1	2	1	1	2
17	15/4/1947	42	1	20/06/89	1	1	1	1	2
18	9/6/1969	23	2	14/09/92	1	1	0	1	2
19	11/8/1973	27	1	01/12/00	1	1	2	1	2
20	1/11/1978	21	1	13/11/98	2	1	1	1	2
21	14/8/1976	25	1	26/11/01	2	1	1	1	2
22	21/1/1974	28	1	22/08/02	2	1	1	1	2
23	12/3/1972	26	1	23/04/98	1	1	0	1	2
24	20/9/1990	21	1	22/12/01	2	1	2	1	2
25	3/8/1915	82	1	26/08/97	2	1	2	1	1
26	17/8/1939	58	1	21/05/98	2	1	3	2	1
27	13/1/1946	46	1	09/06/92	1	1	1	1	2
28	25/1/1920	75	1	07/11/95	2	1	1	2	1
29	25/3/1933	55	1	05/12/98	2	1	1	1	2
30	24/2/1976	28	1	01/09/04	1	1	2	1	2
31	8/1/1967	36	1	01/10/03	1	1	0	1	2
32	15/5/1977	27	1	05/11/04	2	1	1	1	1
33	2/10/1945	53	2	18/03/99	2	1	2	1	2
34	22/12/1975	26	2	14/08/02	1	1	0	1	2
35	25/7/1943	54	2	02/02/98	2	9	2	2	1
36	30/5/1976	28	1	13/09/04	1	1	1	1	2
37	10/7/1946	58	1	15/03/04	2	2	1	1	1
38	3/4/1919	65	1	24/07/92	2	1	1	1	2
39	14/3/1977	24	1	16/03/01	1	1	1	1	2
40	10/9/1985	16	1	26/02/02	1	1	1	1	2
41	14/10/1979	27	2	01/12/06	2	1	0	1	2
42	29/7/1982	22	1	01/09/04	1	1	0	1	2
43	1/12/1979	26	1	03/08/06	2	1	1	2	1
44	1/1/1967	38	1	01/06/07	2	1	0	1	2
			1 - F		1 - I/II	1 - SIM		1 - 0-2	1 - sim
			2 - M		2 - III/IV	2 - NÃO		2 - > 2	2 - não

Anexo 1 – Tabela com as variáveis clínicas e de tratamento

	Data Nasc	Qt 1 linha	Data término qt	Rituxim abe	Radioter pia	Respost a	Reci diva	data recidiva	data ult seg	status ult seg	obito	data obito
1	24/11/1976	1	24/12/01	1	1	3	2	0	28/3/07		2	0
2	21/10/1974	1	9/9/00	1	1	3	1	17/7/2001	4/4/02	3	1	4/4/02
3	15/10/1947	1	29/10/01	1	1	2	9	0	7/11/03	3	1	7/11/03
4	3/11/1936	1	17/9/98	1	1	2	9	0	6/6/99	3	1	6/6/99
5	29/05/1974	1	19/11/97	1	2	3	2	0	13/4/07	1	2	0
6	22/06/1977	1	14/12/98	1	1	1	9	0	10/11/07	1	2	0
7	6/7/1973	1	22/7/98	1	2	2	9	0	13/12/99	3	1	13/2/99
8	6/2/1966	1	13/10/99	1	1	3	2	0	8/4/04	1	2	0
9	25/08/1927	1	26/6/99	1	2	2	9	0	2/9/99	3	1	2/9/99
10	3/1/1957	1	14/9/99	1	1	3	2	0	1/9/06	1	2	0
11	21/10/1964	1	1/12/98	1	1	3	2	0	1/11/07	1	2	0
12	21/6/1982	2	3/5/00	1	2	3	2	0	26/12/06	1	2	0
13	15/10/1977	2	1/8/95	1	2	3	1	1/11/1996	3/3/98	3	1	3/3/98
14	23/7/1966	1	1/2/96	1	1	3	2	0	9/12/96	3	1	9/12/96
15	6/9/1938	1	14/7/93	1	2	3	1	1/1/1995	9/12/95	3	1	9/12/95
16	8/5/1939	1	21/8/00	1	1	1	9	9	4/4/01	3	1	4/4/01
17	15/4/1947	2	27/4/90	1	2	3	2	0	6/11/07	1	2	0
18	9/6/1969	1	21/12/92	1	2	2	9	0	19/5/93	3	1	19/5/93
19	11/8/1973	1	10/4/01	1	1	3	1	5/12/2001	9/5/02	3	1	9/5/02
20	1/11/1978	1	6/6/99	1	1	3	1	1/12/1999	4/6/02	3	1	4/6/02
21	14/8/1976	2	1/7/02	1	1	2	9	0	27/7/07	1	2	0
22	21/1/1974	1	1/1/03	1	1	3	2	0	1/9/07	1	2	0
23	12/3/1972	1	21/7/98	1	1	3	2	0	17/11/07	1	2	0
24	20/9/1990	1	8/4/02	1	1	3	2	0	24/10/07	1	2	0
25	3/8/1915	1	30/4/98	1	2	3	2	0	19/1/05	1	2	0
26	17/8/1939	1	19/10/98	1	2	2	2	0	10/11/98	3	1	10/11/98
27	13/1/1946	2	1/6/93	1	1	1	9	0	29/9/03	1	2	0
28	25/1/1920	0	0/1/00	1	2	0	9	0	28/11/95	3	1	28/11/95
29	25/3/1933	1	22/3/89	1	1	3	1	26/1/2000	6/9/00	3	1	6/9/00
30	24/2/1976	1	20/4/05	2	1	3	2	0	1/10/07	1	2	0
31	8/1/1967	2	23/2/04	1	1	3	2	0	26/10/07	1	2	0
32	15/5/1977	1	7/5/05	2	1	3	2	0	24/7/07	1	2	0
33	2/10/1945	2	20/4/99	1	2	2	9	0	5/5/99	3	1	5/5/99
34	22/12/1975	1	26/12/02	1	1	1	9	0	25/9/07	1	2	0
35	25/7/1943	1	3/5/98	1	2	2	9	0	20/8/98	3	1	20/8/98
36	30/5/1976	1	5/2/05	2	1	3	2	0	14/6/05	1	2	0
37	10/7/1946	1	27/11/04	2	2	3	2	0	13/12/06	3	1	13/12/06
38	3/4/1919	2	4/1/93	1	2	2	9	0	22/6/93	3	1	22/6/93
39	14/3/1977	1	23/8/01	1	2	2	9	0	23/1/02	3	1	23/1/02
40	10/9/1985	2	19/7/02	1	2	2	9	0	6/1/03	3	1	6/1/03
41	14/10/1979	1	1/4/07	2	1	3	1	1/7/2008	1/3/08	2	2	0
42	29/7/1982	1	14/3/05	2	2	1	9	0	25/3/06	3	1	25/3/06
43	1/12/1979	1	20/12/06	2	1	2	9	0	27/3/07	3	1	27/3/07
44	1/1/1967	1	20/12/07	2	1	3	2	0	1/8/08	1	2	0

1 = não 1= sim
 2 = sim 2= não
 3 complet
 a (RC)
 2 parcial
 1 estavel
 1 com recidiva
 2 sem recidiva
 9 - sem RC
 1 vivo sem
 doença
 2 vivo c/
 doença
 3 morto pela
 dça
 4 morto
 outras
 causas
 5 perda
 seguimento
 1 obito
 2 vivo

Anexo 2 – Tabela com as variáveis de tratamento

	Data Nasc	CD10	BCL-6	MUM1 (> 10%)	HANS	MUM1 (30%)	HANS (30%)	MUM1 (70%)	HANS (70%)
1	24/11/1976	1	1	0	0	0	0	0	0
2	21/10/1974	1	1	1	0	1	0	0	0
3	15/10/1947	0	1	0	0	0	0	0	0
4	3/11/1936	0	0	0	1	0	1	0	1
5	29/05/1974	1	1	0	0	0	0	0	0
6	22/06/1977	1	0	1	0	1	0	0	0
7	6/7/1973	0	1	1	1	1	1	0	0
8	6/2/1966	9	9						
9	25/08/1927	0	0	1	1	1	1	1	1
10	3/1/1957	0	0	0	1	0	1	0	1
11	21/10/1964	9	9						
12	21/6/1982	9	9						
13	15/10/1977	9	9						
14	23/7/1966	0	1	1	1	0	0	0	0
15	6/9/1938	1	0	0	0	0	0	0	0
16	8/5/1939	0	0	0	1	0	1	0	1
17	15/4/1947	0	1	1	1	0	0	0	0
18	9/6/1969	0	1	1	1	1	1	1	1
19	11/8/1973	0	1	1	1	1	1	0	0
20	1/11/1978	9	9						
21	14/8/1976	9	9						
22	21/1/1974	9	9						
23	12/3/1972	0	1	0	0	0	0	0	0
24	20/9/1990	0	1	0	0	0	0	0	0
25	3/8/1915	9	9						
26	17/8/1939	9	9						
27	13/1/1946	0	1	0	0	0	0	0	0
28	25/1/1920	9	9						
29	25/3/1933	9	9						
30	24/2/1976	0	0	0	1	0	1	0	1
31	8/1/1967	0	0	1	1	0	1	0	1
32	15/5/1977	9	9						
33	2/10/1945	1	1	1	0	1	0	1	0
34	22/12/1975	0	0	0	1	0	1	0	1
35	25/7/1943	9	9						
36	30/5/1976	0	1	1	1	1	1	0	0
37	10/7/1946	9	9						
38	3/4/1919	9	9						
39	14/3/1977	0	0	1	1	1	1	0	1
40	10/9/1985	1	1	1	0	1	0	1	0
41	14/10/1979	0	1	1	1	1	1	0	0
42	29/7/1982	0	1	1	1	1	1	1	1
43	1/12/1979	0	1	1	1	1	1	0	0
44	1/1/1967	0	1	1	1	1	1	0	0
		0 = -	0 = -		0 = CG				
		1 = +	1 = +		1 = LA				
		9 = ND	9 = ND						

Anexo 3. Tabela com as variáveis imunoistoquímicas

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. 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.
2. Cazals-Hatem D, Lepage E, Brice P, Ferrant A, d'Agay MF, Baumelou E, et al. Primary mediastinal large B-cell lymphoma. A clinicopathologic study of 141 cases compared with 916 nonmediastinal large B-cell lymphomas, a GELA ("Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte") study. *Am J Surg Pathol* 1996;20(7):877-88.
3. Bishop PC, Wilson WH, Pearson D, Janik J, Jaffe ES, Elwood PC. CNS involvement in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 1999;17(8):2479-85.
4. Todeschini G, Secchi S, Morra E, Vitolo U, Orlandi E, Pasini F, et al. Primary mediastinal large B-cell lymphoma (PMLBCL): long-term results from a retrospective multicentre Italian experience in 138 patients treated with CHOP or MACOP-B/VACOP-B. *Br J Cancer* 2004;90(2):372-6.
5. Falini B, Venturi S, Martelli M, Santucci A, Pileri S, Pescarmona E, et al. Mediastinal large B-cell lymphoma: clinical and immunohistological findings in 18 patients treated with different third-generation regimens. *Br J Haematol* 1995;89(4):780-9.
6. Zinzani PL, Martelli M, Bendandi M, De Renzo A, Zaccaria A, Pavone E, et al. Primary mediastinal large B-cell lymphoma with sclerosis: a clinical study of 89 patients treated with MACOP-B chemotherapy and radiation therapy. *Haematologica* 2001;86(2):187-91.

7. Zinzani PL, Martelli M, Bertini M, Gianni AM, Devizzi L, Federico M, et al. Induction chemotherapy strategies for primary mediastinal large B-cell lymphoma with sclerosis: a retrospective multinational study on 426 previously untreated patients. *Haematologica* 2002;87(12):1258-64.
8. Abou-Elella AA, Weisenburger DD, Vose JM, Kollath JP, Lynch JC, Bast MA, et al. Primary mediastinal large B-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 43 patients from the Nebraska Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* 1999;17(3):784-90.
9. Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, Solal-Celigny P, Bouabdallah R, Ferme C, et al. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 2005;23(18):4117-26.
10. van Besien K, Kelta M, Bahaguna P. Primary mediastinal B-cell lymphoma: a review of pathology and management. *J Clin Oncol* 2001;19(6):1855-64.
11. Nguyen LN, Ha CS, Hess M, Romaguera JE, Manning JT, Cabanillas F, et al. The outcome of combined-modality treatments for stage I and II primary large B-cell lymphoma of the mediastinum. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;47(5):1281-5.
12. Jacobson JO, Aisenberg AC, Lamarre L, Willett CG, Linggood RM, Miketic LM, et al. Mediastinal large cell lymphoma. An uncommon subset of adult lymphoma curable with combined modality therapy. *Cancer* 1988;62(9):1893-8.
13. Savage KJ, Al-Rajhi N, Voss N, Paltiel C, Klasa R, Gascoyne RD, et al. Favorable outcome of primary mediastinal large B-cell lymphoma in

- a single institution: the British Columbia experience. *Ann Oncol* 2006(1):123-30.
14. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med* 1993;329(14):987-94.
 15. Zinzani PL, Martelli M, Magagnoli M, Pescarmona E, Scaramucci L, Palombi F, et al. Treatment and clinical management of primary mediastinal large B-cell lymphoma with sclerosis: MACOP-B regimen and mediastinal radiotherapy monitored by (67)Gallium scan in 50 patients. *Blood* 1999;94(10):3289-93.
 16. Lazzarino M, Orlandi E, Paulli M, Strater J, Klersy C, Gianelli U, et al. Treatment outcome and prognostic factors for primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma: a multicenter study of 106 patients. *J Clin Oncol* 1997 (4):1646-53.
 17. Levitt LJ, Aisenberg AC, Harris NL, Linggood RM, Poppema S. Primary non-Hodgkin's lymphoma of the mediastinum. *Cancer* 1982;50(11):2486-92.
 18. Isaacson PG, Spencer J, Finn T. Primary B-cell gastric lymphoma. *Hum Pathol* 1986 (1):72-82.
 19. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Verdiman JW. Pathology and genetics of haematologic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2001. Summary of the WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues; p 10-1. (World Health Organization Classification of Tumours, 3).
 20. 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.
21. Lazzarino M, Orlandi E, Paulli M, Boveri E, Morra E, Brusamolino E, et al. Primary mediastinal B-cell lymphoma with sclerosis: an aggressive tumor with distinctive clinical and pathologic features. *J Clin Oncol*;11(12):2306-13.
22. Barth TF, Leithauser F, Joos S, Bentz M, Moller P. Mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma: where do we stand? *Lancet Oncol* 2002 (4):229-34.
23. Pileri SA, Zinzani PL, Gaidano G, Falini B, Gaulard P, Zucca E, et al. Pathobiology of primary mediastinal B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2003;44 Suppl 3:S21-6.
24. Scarpa A, Moore PS, Rigaud G, Menestrina F. Genetic alterations in primary mediastinal B-cell lymphoma: an update. *Leuk Lymphoma* 2001;(1-2):47-53.
25. Hofmann WJ, Momburg F, Moller P. Thymic medullary cells expressing B lymphocyte antigens. *Hum Pathol* 1988 (11):1280-7.
26. Copie-Bergman C, Gaulard P, Maouche-Chretien L, Briere J, Haioun C, Alonso MA, et al. The MAL gene is expressed in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 1999; 94(10):3567-75.
27. Calaminici M, Piper K, Lee AM, Norton AJ. CD23 expression in mediastinal large B-cell lymphomas. *Histopathology* 2004;45(6):619-24.
28. Isaacson PG, Norton AJ, Addis BJ. The human thymus contains a novel population of B lymphocytes. *Lancet* 1987;2(8574):1488-91.

29. Texido G, Eibel H, Le Gros G, van der Putten H. Transgene CD23 expression on lymphoid cells modulates IgE and IgG1 responses. *J Immunol* 1994;153(7):3028-42.
30. Bentz M, Barth TF, Bruderlein S, Bock D, Schwerer MJ, Baudis M, et al. Gain of chromosome arm 9p is characteristic of primary mediastinal B-cell lymphoma (MBL): comprehensive molecular cytogenetic analysis and presentation of a novel MBL cell line. *Genes Chromosomes Cancer* 2001 (4):393-401.
31. Joos S, Otano-Joos MI, Ziegler S, Bruderlein S, du Manoir S, Bentz M, et al. Primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma is characterized by gains of chromosomal material including 9p and amplification of the REL gene. *Blood* 1996;87(4):1571-8.
32. Rodig SJ, Savage KJ, LaCasce AS, Weng AP, Harris NL, Shipp MA, et al. Expression of TRAF1 and nuclear c-Rel distinguishes primary mediastinal large cell lymphoma from other types of diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*;2007 (1):106-12.
33. Bea S, Zettl A, Wright G, Salaverria I, Jehn P, Moreno V, et al. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood* 2005;106(9):3183-90.
34. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, Weng AP, Kutok JL, Aguiar RC, et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2002; (1):68-74.
35. Savage KJ, Monti S, Kutok JL, Cattoretti G, Neuberg D, De Leval L, et al. The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003;102(12):3871-9.

36. Rosenwald A, Wright G, Leroy K, Yu X, Gaulard P, Gascoyne RD, et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med* 2003;198(6):851-62.
37. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403(6769):503-11.
38. Calvo KR, Traverse-Glehen A, Pittaluga S, Jaffe ES. Molecular profiling provides evidence of primary mediastinal large B-cell lymphoma as a distinct entity related to classic Hodgkin lymphoma: implications for mediastinal gray zone lymphomas as an intermediate form of B-cell lymphoma. *Adv Anat Pathol* 2004;11(5):227-38.
39. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104(4):487-501.
40. Kuppers R, Schwering I, Brauninger A, Rajewsky K, Hansmann ML. Biology of Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 2002;13 Suppl 1:11-8.
41. Pileri SA, Gaidano G, Zinzani PL, Falini B, Gaulard P, Zucca E, et al. Primary mediastinal B-cell lymphoma: high frequency of BCL-6 mutations and consistent expression of the transcription factors OCT-2, BOB.1, and PU.1 in the absence of immunoglobulins. *Am J Pathol* 2003;162(1):243-53.
42. Gonzalez CL, Medeiros LJ, Jaffe ES. Composite lymphoma. A clinicopathologic analysis of nine patients with Hodgkin's disease and B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Clin Pathol* 1991;96(1):81-9.

43. Kuppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 1999 ;341(20):1520-9.
44. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004;103(1):275-82.
45. Shaffer AL, Rosenwald A, Staudt LM. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 2002;2(12):920-32.
46. Pasqualucci L, Bereschenko O, Niu H, Klein U, Basso K, Guglielmino R, et al. Molecular pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma: the role of BCL-6. *Leuk Lymphoma* 2003;44 Suppl 3:S5-12.
47. Yang X, Lee K, Said J, Gong X, Zhang K. Association of Ig/BCL6 translocations with germinal center B lymphocytes in human lymphoid tissues: implications for malignant transformation. *Blood* 2006 ;108(6):2006-12.
48. Pescarmona E, De Sanctis V, Pistilli A, Pacchiarotti A, Martelli M, Guglielmi C, et al. Pathogenetic and clinical implications of BCL-6 and Bcl-2 gene configuration in nodal diffuse large B-cell lymphomas. *J Pathol* 1997;183(3):281-6.
49. Offit K, Louie DC, Parsa NZ, Filippa D, Gangi M, Siebert R, et al. Clinical and morphologic features of B-cell small lymphocytic lymphoma with del(6)(q21q23). *Blood* 1994 ;83(9):2611-8.
50. Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, Rives S, Martinez A, Bosch F, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2003 ;101(1):78-84.

51. de Leval L, Ferry JA, Falini B, Shipp M, Harris NL. Expression of BCL-6 and CD10 in primary mediastinal large B-cell lymphoma: evidence for derivation from germinal center B cells? *Am J Surg Pathol* 2001 (10):1277-82.
52. Falini B, Fizzotti M, Pucciarini A, Bigerna B, Marafioti T, Gambacorta M, et al. A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood* 2000;95(6):2084-92.
53. Lohoff M, Mak TW. Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 2005 (2):125-35.
54. Shipp MA, Look AT. Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: cutting is the key! *Blood* 1993 ;82(4):1052-70.
55. 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.
56. Biasoli I, Morais JC, Soares de Jesus P, Pulcheri W, Nucci M, Spector N. Application of an adapted international prognostic index for aggressive non-Hodgkin's lymphomas: good discrimination and lower survival rates in Rio de Janeiro, Brazil. *Oncol Rep* 2001 Mar-Apr;8(2):441-4.
57. van Imhoff GW, Boerma EJ, van der Holt B, Schuuring E, Verdonck LF, Kluin-Nelemans HC, et al. Prognostic impact of germinal center-associated proteins and chromosomal breakpoints in poor-risk diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2006;24(25):4135-42.

58. Bauer KD, de la Torre-Bueno J, Diel IJ, Hawes D, Decker WJ, Priddy C, et al. Reliable and sensitive analysis of occult bone marrow metastases using automated cellular imaging. *Clin Cancer Res* 2000 (9):3552-9.
59. Wang S, Saboorian MH, Frenkel EP, Haley BB, Siddiqui MT, Gokaslan S, et al. Assessment of HER-2/neu status in breast cancer. Automated Cellular Imaging System (ACIS)-assisted quantitation of immunohistochemical assay achieves high accuracy in comparison with fluorescence in situ hybridization assay as the standard. *Am J Clin Pathol* 2001;116(4):495-503.
60. Friedberg JW, Fischman A, Neuberg D, Kim H, Takvorian T, Ng AK, et al. FDG-PET is superior to gallium scintigraphy in staging and more sensitive in the follow-up of patients with de novo Hodgkin lymphoma: a blinded comparison. *Leuk Lymphoma* 2004;45(1):85-92.
61. Choi WW, Weisenburger DD, Greiner TC, Piris MA, Banham AH, Delabie J, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res* 2009;15(17):5494-502.
62. Chang CC, McClintock S, Cleveland RP, Trzpuć T, Vesole DH, Logan B, et al. Immunohistochemical expression patterns of germinal center and activation B-cell markers correlate with prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2004;28(4):464-70.
63. Saez AI, Saez AJ, Artiga MJ, Perez-Rosado A, Camacho FI, Diez A, et al. Building an outcome predictor model for diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol* 2004;164(2):613-22.
64. Emmerich F, Meiser M, Hummel M.. Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I

- kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells. *Blood* 1999; 94:3129–3134.
65. Mendler JH, Kelly J, Voci S, Marquis D, Rich L, Rossi RM et al. Bortezomib and gemcitabine in relapsed refractory Hodgkin's Lymphoma. *Ann Oncol.* 2008; 19 (10): 1759-64.