LUÍS ALBERTO DE PÁDUA COVAS LAGE

Análise do perfil de expressão de genes de proliferação/regulação celular, resposta inflamatória e angiogênese e do padrão de metilação dos genes *p15INK4b* e *p16INK4a* em portadores de linfoma de células T periféricas

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

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do Crescimento
Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Juliana Pereira

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Cláudia N. Zerbini

São Paulo

2017

LUÍS ALBERTO DE PÁDUA COVAS LAGE

Análise do perfil de expressão de genes de proliferação/regulação celular, resposta inflamatória e angiogênese e do padrão de metilação dos genes *p15INK4b* e *p16INK4a* em portadores de linfoma de células T periféricas

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

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do Crescimento
Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Juliana Pereira

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Cláudia N. Zerbini

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Lage, Luís Alberto de Pádua Covas

Análise do perfil de expressão de genes de proliferação/regulação celular, reposta inflamatória e angiogênese e do padrão de metilação dos genes *p15INKb* e *p16INK4a* em portadores de linfoma de células T periféricas / Luís Alberto de Pádua Covas Lage. -- São Paulo, 2017.

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

Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientadora: Juliana Pereira.

Coorientadora: Maria Cláudia Nogueira Zerbini.

Descritores: 1.Linfoma de células T periférico 2.Perfilação da expressão gênica 3.Ciclo celular/regulação 4.Inflamação 5.Angiogênese 6.Metilação de DNA

USP/FM/DBD-001/17

A minha mãe, Mara Aparecida Covas Lage, por abrir mão de seus sonhos em prol dos meus; pelo amor, carinho, apoio e incentivo, incondicionais ao longo de minha vida.

A minha avó, Marina Menezes Caran Covas (*in memoriam*), mulher forte e sábia, exemplo de vida, pelas inestimáveis contribuições para formação de meu caráter.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que acima de todos, rege com maestria nossas vidas, por dar-me forças e condições para elaboração, condução e conclusão desse projeto;

À Profa. Dra. Juliana Pereira, pela valiosa orientação na construção deste trabalho. Por se fazer sempre presente em minha vida acadêmica, pelos grandes ensinamentos, pelo carinho, atenção e por todas as oportunidades oferecidas em minha carreira, hoje muito mais do que mestre, uma grande amiga que reside em meu coração.

À Profa. Dra. Maria Cláudia Nogueira Zerbini, pelas grandes contribuições como co-orientadora nesse projeto e por todos ensinamentos na área de Hematopatologia.

À Dra. Renata de Oliveira Costa, pela qual nutro imenso carinho e admiração, minha grande incentivadora desde os tempos da graduação e por apresentar-me de forma tão simbólica os caminhos da Hematologia.

À Dra. Débora Levy, pela amizade, paciência e pelos valorosos e inestimáveis ensinamentos, além do auxílio essencial na condução dos testes moleculares desse projeto.

Ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski, por disponibilizar as instalações do Laboratório de Genética e Hematologia Molecular (LIM 31) para condução deste trabalho.

Aos professores Dr. Israel Bendit e Dra. Sheila Aparecida Coelho Siqueira, pelas prestimosas contribuições prestadas no exame de qualificação desta tese.

À Dra. Mariane Gonçalves de Castro, pelo grande auxílio na separação dos espécimes patológicos e contribuição na revisão histológica dos casos estudados.

À Linah Fukuya, pelo inestimável auxílio na condução dos testes moleculares.

Às amigas Gisele Gouveia e Kátia Zanquim Santana, pela ajuda prestada em todos assuntos burocráticos que envolveram esse projeto de pesquisa.

Aos amigos Lis Vilela, Carla Rosa Teixeira de Godoy, Renata Foltram Kikuchi, Denise Reis e Hebert Fabrício Culler, pelo auxílio na diagramação desta tese.

Aos meus colegas da Hematologia, particularmente às Dras. Andrezza Bertolacci Medina e Marília Soares e Silva Arcadipane, pela paciência e incentivo para conclusão desse projeto.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela disponibilização de verba necessária para o financiamento desse estudo.

À minha família, representada por meus pais Alberto Lage (*in memorian*) e Mara Aparecida Covas Lage, e minha irmã Ana Luisa A. C. C. Lage, por compreender os momentos de ausência, pelo apoio prestado e por sempre acreditarem em meus sonhos.

Ao meu cunhado, Gonçalo Silva Júnior, pela correção ortográfica e revisão de língua portuguesa.

A todos os pacientes envolvidos neste projeto e futuros pacientes que possam, de alguma maneira, beneficiar-se dos resultados aqui obtidos.

Entre o desejo e o alcance, apenas dois moradores: o esforço e a determinação.

Provérbio chinês

Este trabalho foi realizado com auxílio

FAPESP processo 2012/50495-3

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	
Lista de símbolos	
Lista de figuras	
Lista de gráficos	
Lista de tabelas	
Resumo	
Abstract	
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivo principal.....	11
2.2 Objetivos secundários.....	11
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
3.1 Classificação dos linfomas não-Hodgkin de células T/NK.....	14
3.2 Linfomas de células T periféricas predominantemente linfonodais.....	15
3.2.1 Linfoma de células T periféricas, sem outras especificações (LCTP/SOE).....	16
3.2.1.1 Definição.....	16
3.2.1.2 Epidemiologia.....	16
3.2.1.3 Apresentação clínica.....	17
3.2.1.4 Diagnóstico histopatológico.....	17
3.2.1.5 Caracterização imunofenotípica.....	20
3.2.1.6 Diagnóstico genético-molecular.....	21
3.2.2 Linfoma de células T angiomunoblástico (LCTA).....	22
3.2.2.1 Definição e histórico.....	22
3.2.2.2 Epidemiologia.....	23
3.2.2.3 Apresentação clínica.....	24
3.2.2.4 Diagnóstico histopatológico.....	26
3.2.2.5 Caracterização imunofenotípica.....	29
3.2.2.6 Diagnóstico genético-molecular.....	31
3.2.2.7 Fisiopatologia.....	32
3.2.3 Linfoma de grandes células anaplásicas <i>anaplastic lymphoma</i> <i>kinase</i> (ALK) positivo.....	33
3.2.3.1 Definição.....	33

3.2.3.2 Epidemiologia.....	34
3.2.3.3 Apresentação clínica.....	34
3.2.3.4 Diagnóstico histopatológico.....	35
3.2.3.5 Caracterização imunofenotípica.....	37
3.2.3.6 Diagnóstico genético molecular.....	38
3.2.3.7 Fisiopatologia.....	39
3.2.4 Linfoma de grandes células anaplásicas ALK (<i>anaplastic lymphoma kinase</i>) negativo (LGCA/ALK-).....	42
3.2.4.1 Definição.....	42
3.2.4.2 Epidemiologia.....	42
3.2.4.3 Apresentação clínica.....	43
3.2.4.4 Diagnóstico histopatológico.....	43
3.2.4.5 Caracterização imunofenotípica.....	44
3.2.4.6 Diagnóstico genético-molecular.....	44
3.3 Estadiamento.....	45
3.4 Fatores prognósticos e estratificação de risco.....	48
3.4.1 Estratificação de risco clínica – índices prognósticos.....	48
3.4.2 Estratificação de risco biológica.....	53
3.4.2.1 Papel do perfil de expressão gênica na classificação e estratificação de risco nos LCTP.....	54
3.4.2.2 Estado de metilação do DNA e linfoma de células T.....	61
3.5 Genes selecionados.....	64
3.5.1 Gene <i>TOP2A</i> (DNA topoisomerase II α).....	64
3.5.2 Gene <i>CCNA2</i> (ciclina A2).....	66
3.5.3 Gene <i>CHEK1</i> (<i>Checkpoint kinase 1</i>).....	68
3.5.4 Gene <i>VEGF</i> (Fator de crescimento derivado do endotélio vascular).....	70
3.5.5 Gene <i>NFkB1</i> (Fator nuclear kappa B1).....	72
3.5.6 Gene <i>IKBkB</i> (Quinase do inibidor do fator nuclear <i>NFkB</i>).....	73
3.6 Formas de tratamento.....	74
3.6.1 Quimioterapia.....	74
3.6.2 Radioterapia.....	80
3.6.3 Transplante de células tronco hematopoiéticas.....	81
3.6.4 Novas terapias.....	86

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	90
4.1 Pacientes selecionados.....	91
4.2 Diagnóstico anatomopatológico.....	92
4.3 Reações de imunohistoquímica.....	94
4.4 Estadiamento.....	96
4.5 Tratamento.....	97
4.6 Avaliação de resposta.....	100
4.7 Método molecular.....	103
4.7.1 Extração de RNA.....	103
4.7.2 Preparação do cDNA.....	104
4.7.3 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real.....	105
4.7.4 Extração de DNA.....	107
4.7.5 Metilação das regiões promotoras do DNA dos genes <i>p15INK4b</i> e <i>p16INK4a</i>	108
4.7.5.1 Digestão da amostra com solução proteinase K.....	108
4.7.5.2 Tratamento do DNA com bissulfito de sódio.....	108
4.7.5.3 Análise de metilação.....	109
4.8 Análise estatística.....	111
5. RESULTADOS.....	114
5.1 Casuística.....	115
5.2 Características clínicas e laboratoriais.....	119
5.2.1 Características clínicas e laboratoriais da coorte de LCTP nodais avaliada.....	119
5.2.2 Características clínicas e laboratoriais por subgrupo histopatológico.....	122
5.2.3 Taxas de resposta.....	125
5.3 Curvas de sobrevida.....	127
5.3.1 Sobrevida global de toda a coorte de LCTP.....	127
5.3.2 Sobrevida livre de progressão de toda a coorte de LCTP.....	128
5.3.3 Sobrevida livre de doença de toda a coorte de LCTP.....	128
5.3.4 Sobrevida global por variante histopatológica de LCTP.....	129
5.3.5 Sobrevida livre de progressão por variante histopatológica de LCTP.....	129
5.3.6 Sobrevida livre de doença por variante histopatológica.....	130

5.4 Características moleculares e imunohistoquímicas.....	130
5.4.1 Expressão relativa dos genes.....	130
5.4.2 Expressão relativa dos genes e correlação com desfechos.....	130
5.4.3 Expressão relativa dos genes por variante histopatológica de LCTP e correlação com desfechos.....	134
5.4.4 Estudo de agrupamento gênico e discriminação de variantes histopatológicas em função dos genes estudados.....	142
5.4.5 Perfil de metilação dos genes <i>p15INK4b</i> e <i>p16INK4a</i> e correlação com desfechos clínicos.....	146
5.4.5.1 Perfil metilacional dos genes <i>p15INK4b</i> e <i>p16INK4a</i> e correlação com desfechos clínicos – análise univariada de subgrupos histopatológicos.....	149
5.4.6 Análise da expressão protéica por imunohistoquímica nos LCTP e correlação com desfechos clínicos.....	153
5.5 Fatores de prognóstico para sobrevida global.....	155
5.5.1 Análise univariada.....	155
5.5.1.1 Análise univariada por subgrupo histológico.....	156
5.5.2 Análise multivariada.....	156
5.6 Fatores de prognóstico para sobrevida livre de progressão.....	158
5.6.1 Análise univariada.....	158
5.6.1.1 Análise univariada nos subgrupos histológicos.....	159
5.6.2 Análise multivariada.....	159
5.7 Fatores de prognósticos para sobrevida livre de doença.....	161
5.7.1 Análise univariada de toda a coorte de LCTP.....	161
5.7.1.1 Análise univariada por subgrupos histológicos.....	162
5.7.2 Análise multivariada.....	162
6. DISCUSSÃO.....	163
6.1 Características clínico-laboratoriais e epidemiológicas.....	164
6.2 Marcadores moleculares e de imunohistoquímica.....	175
7. CONCLUSÕES.....	185
8. ANEXOS.....	188
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	215

LISTA DE ABREVIATURAS

ACVBP – Adriblastina, ciclofosfamida, vindesina, bleomicina e prednisona
 AHAI – Anemia hemolítica auto-imune
 Akt – Proteína quinase B
 ALK – Quinase do linfoma anaplásico
 AP1 – Proteína ativadora 1
 ASF1A – Histona chaperona de função anti-silenciadora 1A
 ATIC – 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotídeo
 ATP – Adenosina trifosfato
 BAD – Agonista de morte celular associado ao BCL2
 BCCA – Agência de Câncer da Colúmbia Britânica
 Bcl-6 – *B-cell CLL/Lymphoma 6*
 BCL/XL – *B-cell Lymphoma Extra-Large*
 BRCA2 – *Breast Cancer 2*
 BUB1 – *Budding Uninhibited by Benzimidazoles 1 Homolog*
 CCNA2 – Ciclina A2
 CCNB2 – Ciclina B2
 CCND2 – Ciclina D2
 CCNE2 – Ciclina E2
 CCR7 – *Chemokine (C-C Motif) Receptor 7*
 CD – *Cluster of differentiation*
 CDC2 ou CDK1 – Quinase dependente de ciclina 1
 CDC25 – *Cell Division Cycle 25*
 CDC37 – *Cell Division Cycle 37*
 CDF – Célula dendrítica folicular
 CDK4 – Quinase dependente de ciclina 4
 CDK6 – Quinase dependente de ciclina 6
 cDNA – Ácido desoxirribonucléico complementar
 C/EBP β – *CCATT/enhancer Binding Protein Beta*
 CHEK 1 – Quinase de checagem de ponto 1
 CHOEP – Ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina, etoposídeo e prednisona
 CHOP – Ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona
 CLTCL – Gene de cadeia pesada-símile de clatrina
 CNTFR – Receptor do fator neutrófico ciliar
 COX – ciclo-oxigenase
 5' CpG – Ilhotas 5' citosina pré guanina
 Ct – *Cycle threshold* ou ciclo limiar
 CVP – Ciclofosfamida, vincristina e prednisona
 CXCL-13 – *Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 13*
 CXCR-3 – *Chemokine (C-X-C Motif) Receptor 3*
 CXCR-5 – *Chemokine (C-X-C Motif) Receptor 5*
 DHL – Desidrogenase láctica
 dNTP – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

EBER – RNA pequeno codificado pelo vírus Epstein-Barr
EBNA-1 – Antígeno nuclear 1 do vírus Epstein-Barr
EBV – Vírus Epstein-Barr
EGF – Fator de crescimento epidérmico
EMA – Antígeno de membrana epitelial
EV – Endovenoso
FC – Fludarabina e Ciclofosfamida
FDG – Fluoro-deoxiglicose
FFPE – Fixado em formalina e incluído em parafina
FISH – Hibridização *in situ* por fluorescência
FOXO3A – *Forkhead Box O3A*
GELA – *Group d'Etude des Lymphomes d'Adulte*
GOELAMS - *Group Quest Est d'Etude des Leucemies et Autres Maladies Du Sang*
gpP – Glicoproteína P
GRB2 – Receptor 2 do fator de crescimento derivado de proteínas
GUSB – Glucoronidase beta
HC/FMUSP – Hospital das Clínicas/Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
H&E – Hematoxilina & Eosina
HHV-8 – Herpes vírus humano tipo 8
HIV – Vírus da imunodeficiência adquirida humana
HOXA2 – *Homeobox A2*
HOXC6 – *Homeobox C6*
HTLV1-2 – Vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1-2
ICESP – Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
ICOS – *Inducible T-cell Co-Stimulator*
IFN – Interferon
IGF1 – Fator de crescimento 1 insulina-símile
IHC – Imunohistoquímica
IRIS1 – *Immune Response in Silico 1*
IKkB – *Inhibitor of kappa Light Polypeptide Gene Enhancer in B-Cells*
IKK – Quinase inibidora do fator nuclear kappa B
IL – Interleucina
IMVP-16 – Ifosfamida, metotrexato e etoposídeo
IPI – Índice Prognóstico Internacional
IPTCLP – Índice Prognóstico do Projeto Internacional de Linfoma de Células T
ISH – Hibridização *in situ*
ITK – Quinase de células T induzida por interleucina 2
ITLP – Projeto Internacional de Linfoma de Células T
JAK3/STAT3 – *Janus Kinase 3/ Signal Transducer and Activator of Transcription 3*
KDR – *Kinase Insert Domain Receptor*
LCTA – Linfoma de células T angioimunoblástico
LCTP – Linfoma de células T periféricas

LCTP/SOE – Linfoma de células T periféricas, sem outras especificações
LDGCB – Linfoma difuso de grandes células B
LGCA/ALK+ – Linfoma de grandes células anaplásicas, quinase do linfoma anaplásico positivo
LGCA/ALK- – Linfoma de grandes células anaplásicas, quinase do linfoma anaplásico negativo
LGCAC – Linfoma de grandes células anaplásicas cutâneo primário
LH – Linfoma de Hodgkin
LIM – Laboratório de investigação médica
LMP-1 – Proteína latente de membrana tipo 1
LNH – Linfoma não-Hodgkin
LPS - Lipopolisacarídeo
MALT – Tecido linfoide associado a mucosa
MCL1 – *Myeloid Cell Leukemia 1*
MDR – Multidroga resistente
MHC – Complexo maior de histocompatibilidade
MMP9 – *Matrix Metalloproteinase 9*
MPF – Fator promotor de maturação
MO – Medula óssea
mPIT – Índice Prognóstico para Linfoma de Células T modificado
mTOR – *mammalian Target of Rapamycin*
NEK11 – *NIMA (Never in Mitosis Gene A) Related Kinase 11*
NFATC1 – Fator nuclear de células T ativadas, citoplasmático
NFkB – Fator nuclear kappa B
NFkBIE – *Nuclear Factor of kappa Light Polypeptide Gene Enhancer in B-Cells Inhibitor, Epsilon*
NK – *Natural killer*
NO – Óxido nítrico
NPM/ALK – Nucleofosmina/quinase do linfoma anaplásico
NRP1 – Neurolipina 1
OMS – Organização Mundial de Saúde
PAX-5 – *Paired Box 5*
PCNA – Antígeno nuclear de proliferação celular
PCR – Reação em cadeia de polimerase
PD-1 ou PDCD1 – *Programmed Cell Death 1*
PDGFR α – Receptor α do fator de crescimento derivado de plaquetas
PEG – Perfil de expressão gênica
PET-TC – Tomografia computadorizada com emissão de pósitrons
pH – Potencial de anion hidrogênio
PI3k/Akt – *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase*
PIT – Índice Prognóstico para Linfoma de Células T
PKC – Proteína quinase C
PLC- γ – Fosfolipase C gamma 1

POEMS – Polineuropatia, organomegalia, endocrinopatia, componente monoclonal e lesões cutâneas

PTPN11 – *Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor 11*

PTPN12 – *Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor 12*

p15INK4b ou MTS-2 – Supressor de múltiplos tumores 2

p16INK4a ou MTS-1 – Supressor de múltiplos tumores 1

RAD51 – Recombinase 51

Ras/ERK – *Ras/ Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway*

Rb – produto do gene do retinoblastoma

RC – Resposta completa

RNA – Ácido ribonucléico

RS – Reed-Sternberg

RT-PCR – Reação em cadeia de polimerase em tempo real

SAP – *SLAM-Associated Protein*

SELL – Selectina L

SG – Sobrevida global

SLD – Sobrevida livre de doença

SLF – Sobrevida livre de falência

SLP – Sobrevida livre de progressão

SNC – Sistema nervoso central

SPD – Somatória dos produtos dos diâmetros

STK6 – Quinase serina/treonina 6

SYK – Tirosino-quinase esplênica

TA – Temperatura ambiente

TCR – Receptor de célula T

TE – Tampão estabilizador

TGFβ – Fator de crescimento transformante β

TFG – *TRK Fused-Gene*

THF – T *helper* folicular

TIA-1 – Antígeno 1 intracelular restrito a células T

TLK1 – *Tousled-Like Kinase 1*

TMO – Transplante de medula óssea

TNF – Fator de necrose tumoral

TOP1 – DNA Topoisomerase 1

TOP1MT – DNA Topoisomerase 1 mitocondrial

TOP2α – DNA Topoisomerase 2α

TPM3 – Tropomiosina 3

TP53 – Proteína tumoral p53

VCAM – Molécula de adesão celular vascular

VEA – Vênulas de endotélio alto

VEGF – Fator de crescimento derivado do endotélio vascular

VAP – Vincristina, asparaginase e prednisona

VIP-ABVD – Etoposídeo, ifosfamida, cisplatina, adriblastina, bleomicina, vimblastina e dacarbazina

VO – Via oral

LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha\beta$	Alfa/beta
$\gamma\delta$	Gama/delta
cm	Centímetro
dL	Decilitro
g	Grama
°C	Graus Celsius
xg	Gravidade
Gy	Gray
K	Kappa
λ	Lambda
L	Litro
$\geq$	Maior ou igual a
$>$	Maior que
+/-	Mais ou menos
+	Mais ou positivo
$\leq$	Menor ou igual a
$<$	Menor que
-	Menos ou hífen
m ²	Metro quadrado
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromol
mg	Miligrama
mm ³	Milímetros cúbicos
mM	Milimol
ng	Nanograma
nM	Nanômetro
N	Número absoluto
pmol	Picomol
%	Porcentagem
™	<i>Trademark</i> ou marca registrada
log	Unidade de escala logarítmica
U	Unidades
x	Vezes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspectos morfológicos do linfoma de células T periféricas, sem outras especificações (LCTP/SOE).....	20
Figura 2. Aspectos morfológicos do linfoma de células T angioimunoblástico (LCTA).....	29
Figura 3. Modelo fisiopatogênico do LCTA.....	33
Figura 4. Aspectos morfológicos do linfoma de grandes células anaplásicas ALK1 positivo (LGCA/ALK1+).....	37
Figura 5. Vias moleculares de interação da proteína NPM/ALK.....	42
Figura 6. Representação esquemática do sistema de estadiamento de Ann Arbor modificado por Cotswolds.....	46
Figura 7. Participação de ciclinas no controle/regulação do ciclo celular de eucariontes.....	67
Figura 8. Regulação de angiogênese mediada pela proteína VEGF.....	70
Figura 9. Diagrama de via de sinalização levando a transcrição gênica induzida pelo NFkB.....	74
Figura 10. Curvas de padronização da reação de PCR em tempo real.....	106
Figura 11. Casuística.....	116
Figura 12. Expressão imunohistoquímica das proteínas codificadas pelos genes pesquisados.....	155

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Sobrevida global de LCTP conforme o Índice Prognóstico de Linfomas T.....	51
Gráfico 2. Distribuição dos LCTP de acordo com variantes histopatológicas...	121
Gráfico 3. Percentual de comprometimento extralinfonodal na coorte de LCTP.....	122
Gráfico 4. Distribuição quanto às causas de óbito em portadores de LCTP.....	125
Gráfico 5. Taxa de resposta em toda a corte de LCTP após terapia de primeira linha.....	126
Gráfico 6. Sobrevida global dos portadores de LCTP.....	127
Gráfico 7. Sobrevida livre de progressão dos pacientes com LCTP.....	128
Gráfico 8. Sobrevida livre de doença dos pacientes portadores de LCTP.....	128
Gráfico 9. Sobrevida global dos pacientes incluídos por variante histopatológica de LCTP.....	129
Gráfico 10. Sobrevida livre de progressão por variante histopatológica de LCTP.....	129
Gráfico 11. Sobrevida livre de doença por variante histopatológica de LCTP..	130
Gráfico 12. SG em 5 anos em função da mediana de expressão do gene <i>CCNA2</i> em portadores de LCTP.....	133
Gráfico 13. Padrão de distribuição da intensidade de mediana de expressão dos genes estudados em função das variantes morfológicas de LCTP nodais.....	146
Gráfico 14. Sobrevida global em portadores de LCTP em função do estado de metilação do gene <i>p15INK4b</i>	147
Gráfico 15. Sobrevida global em portadores de LCTP em função do estado de metilação do gene <i>p16INK4a</i>	148
Gráfico 16. Sobrevida livre de progressão em portadores de LCTP em função do estado de metilação do gene <i>p15INK4b</i>	148
Gráfico 17. Sobrevida livre de progressão em portadores de LCTP em função do estado de metilação do gene <i>p16INK4a</i>	149
Gráfico 18. Sobrevida global em pacientes portadores de LGCA/ALK+ de acordo com estado metilacional do gene <i>p15INK4b</i>	150
Gráfico 19. SLD em 5 anos em portadores de LCTP/SOE de acordo com o estado metilacional do gene <i>p16INK4a</i>	151

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista dos linfomas de células T/NK adaptada da Classificação OMS de neoplasias hematopoiéticas e do tecido linfoide.....	15
Tabela 2. Características das proteínas de fusão relacionadas ao LGCA/ALK+.....	39
Tabela 3. Sistema de estadiamento de Ann Arbor/Cotswolds.....	47
Tabela 4. Categorização do Índice Prognóstico Internacional (IPI).....	49
Tabela 5. ECOG PS – <i>Eastern Cooperative Oncology Group performance status</i>	49
Tabela 6. Variáveis usadas para calcular os diferentes índices prognósticos.....	52
Tabela 7. Protocolo CHOP.....	99
Tabela 8. Protocolo CHOEP.....	99
Tabela 9. Definições de resposta ao tratamento.....	101
Tabela 10. Eficiências dos genes avaliados.....	106
Tabela 11. Primers utilizados para análise de metilação do genes <i>p15INK</i> e <i>p16INK</i>	110
Tabela 12. Linhagens celulares utilizadas como controle de amplificação para reação de metilação.....	111
Tabela 13. Características clínicas dos pacientes com LCTP nodais excluídos por falha de extração de RNA.....	117
Tabela 14. Características dos pacientes com LCTP incluídos no estudo.....	120
Tabela 15. Características clínico-laboratoriais por variante histopatológica....	124
Tabela 16. Expressão contínua dos genes e associação com desfechos nos LCTP.....	131
Tabela 17. Análise univariada de SG em portadores de LCTP em função da mediana de expressão dos genes estudados.....	132
Tabela 18. SLP de portadores de LCTP em função da mediana de expressão dos genes estudados.....	133
Tabela 19. SLD de portadores de LCTP em função da mediana de expressão dos genes estudados.....	134
Tabela 20. Expressão contínua dos genes estudados e associação com desfechos em portadores de LGCA/ALK+ em análise univariada..	135
Tabela 21. SG, SLP e SLD em portadores de LGCA/ALK+ em função da mediana de expressão dos genes estudados.....	136
Tabela 22. Expressão contínua dos genes estudados e associação com desfechos em portadores da variante LGCA/ALK-.....	137

Tabela 23. SG e SLP em portadores de LGCA/ALK- em função da mediana de expressão dos genes estudados.....	138
Tabela 24. Expressão contínua dos genes estudados e associação com desfechos em portadores da variante LCTP/SOE.....	139
Tabela 25. SG e SLD em 5 anos para portadores de LCTP/SOE em função da mediana de expressão dos genes pesquisados.....	140
Tabela 26. Expressão contínua dos genes estudados e associação com desfechos em portadores de LCTA.....	141
Tabela 27. Análise de SG, SLP e SLD em 5 anos para portadores de LCTA em função da mediana de expressão dos genes de interesse.....	142
Tabela 28. Mediana de expressão dos seis genes estudados de acordo com as variantes histopatológicas de LCTP nodais.....	143
Tabela 29. Análise discriminatória das variantes histopatológicas de LCTP nodais em função do painel gênico estudado.....	144
Tabela 30. SG, SLP e SLD em LCTP em função do estado de metilação dos genes supressores tumorais <i>p15INK4b</i> e <i>p16INK4a</i>	147
Tabela 31. SG, SLP e SLD em 5 anos para portadores de LGCA/ALK+ em função do perfil metilacional dos genes <i>p15</i> e <i>p16</i>	151
Tabela 32. SG, SLP e SLD para portadores de LGCA/ALK- em função do perfil metilacional dos genes <i>p15</i> e <i>p16</i>	152
Tabela 33. SG, SLP e SLD para portadores de LCTP/SOE em função do perfil metilacional dos genes <i>p15</i> e <i>p16</i>	152
Tabela 34. SG, SLP e SLD para portadores de LCTA em função do perfil metilacional dos genes <i>p15</i> e <i>p16</i>	152
Tabela 35. Fatores de prognósticos independentes associados a pior SG em análise multivariada em portadores de LCTP nodais.....	156
Tabela 36. Fatores de prognóstico de SG independentes do IPI em análise multivariada em portadores de LCTP nodais.....	157
Tabela 37. Fatores de prognósticos independentes do PIT associados a pior SG em análise multivariada.....	158
Tabela 38. Fatores de prognósticos independentes associados a pior SLP em análise multivariada.....	159
Tabela 39. Fatores prognósticos independentes associados a pior SLP em análise multivariada por modelo específico.....	160
Tabela 40. Fatores prognósticos independentes do IPI associados a pior SLP em análise multivariada.....	161

Tabela 41. Fatores prognósticos independentes do PIT associados a pior SLP em análise multivariada.....	161
---	-----

RESUMO

LAGE, LAPC. Análise do perfil de expressão de genes de proliferação/regulação celular, resposta inflamatória e angiogênese e do padrão de metilação dos genes *p15INK4b* e *p16INK4a* em portadores de linfoma de células T periféricas. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Introdução: Os linfomas não-Hodgkin de células T periféricas (LCTP) são neoplasias raras caracterizadas pela proliferação monoclonal de linfócitos T maduros. Correspondem a 15% das malignidades linfoides e têm distribuição geográfica peculiar. Compreendem 22 entidades clínico-patológicas distintas, heterogêneas do ponto de vista clínico-epidemiológico, morfológico, fenotípico e molecular. O grupo de apresentação predominantemente nodal compreende as variantes histológicas LGCA/ALK+, LGCA/ALK-, LCTA e LCTP/SOE. Sua terapêutica se baseia em poliquimioterápicos à base de antraciclina e consolidação com transplante de células tronco hematopoiéticas autólogas (TCTH). Com exceção do LGCA/ALK+, apresentam sobrevida global em cinco anos de 30% a 40%. Devido aos desfechos desfavoráveis, estudos de perfil de expressão gênica e de metilação de genes supressores tumorais têm emergido nos últimos anos para refinar o diagnóstico destas neoplasias, melhorar o conhecimento fisiopatológico e o prognóstico e estabelecer possíveis alvos terapêuticos. Estudos preliminares com LCTP nodais indicam valor prognóstico favorável da hiperexpressão de genes de padrão inflamatório *Nfkb1* e *IKBkb* e desfavorável nos casos de suprerregulação de genes de padrão proliferativo como *CCNA2*, *TOP2A* e *CHEK1* e do fenótipo metilado de *p15INK4b* e *p16INK4a*. **Objetivo:** Avaliar o impacto da expressão relativa dos genes *CCNA2*, *TOP2A*, *CHEK1*, *Nfkb1*, *IKBkb* e *VEGF1* e da metilação dos genes *p15* e *p16* em população brasileira com LCTP nodais tratados com quimioterapia CHOP-símile para os desfechos de sobrevida global, sobrevida livre de progressão e sobrevida livre de doença. **Métodos:** A expressão gênica foi avaliada por qPCR de amostras fixadas em formol e incluídas em parafina de 63 pacientes. A mediana de expressão dos genes foi comparada com variáveis clínicas e desfechos. PCR qualitativa metilação-específico foi usada avaliar a metilação de *p15* e *p16*. **Resultados:** Com mediana de seguimento de vinte meses, as SG, SLP e SLD foram, respectivamente, 45,6%, 34,3% e 63,0% e a resposta completa de 46,0%. Em análise multivariada, ECOG ≥ 2 e a hiperexpressão do gene *CCNA2* foram associadas à pior SG em cinco anos, nos LCTP nodais ($p=0,008$ e $p=0,002$). Em análise univariada os genes *CCNA2*, *TOP2A* e *CHEK1* foram associados ao pior prognóstico nos LCTP/SOE e melhor nos LGCA/ALK-. A hiperexpressão do gene *VEGF1* se associou ao pior prognóstico no LGCA/ALK- e LCTA. Metilação de *p15INK4b* não foi encontrada nos LGCA/ALK+ e em análise multivariada foi associada a pior SLP em 5 anos nos LCTP não-ALK+ (HR: 9,88; $p=0,03$). O painel gênico testado não apresentou poder para discriminar as diferentes variantes histopatológicas de LCTP nodais, porém demonstrou-se associação direta entre a intensidade de mediana de expressão desses genes e agressividade biológica nesse grupo heterogêneo de neoplasias. O significado prognóstico de imunoexpressão da proteína ALK sofreu influência das variáveis constituintes do IPI nessa coorte. **Conclusão:** A hiperexpressão dos genes *CCNA2*, *TOP2A* e *CHEK1* foram associadas a prognóstico desfavorável nos LCTP/SOE e favorável nos LGCA/ALK-. Fenótipo hipermetilado de *p15INK4b* não foi evento observado em LGCA/ALK+, porém foi associado a pior prognóstico nos LCTP nodais não-ALK+.

Descritores: 1. Linfoma de células T periféricas nodais; 2. Perfil de expressão gênica; 3. Proliferação/regulação do ciclo celular; 4. Resposta inflamatória; 5. Angiogênese; 6. Metilação do DNA; 7. Classificação; 8. Fisiopatogênese; 9. Tratamento; e 10. Prognóstico.

ABSTRACT

LAGE, LAPC. Analysis of gene expression profile related to proliferation/ cell regulation, inflammatory response and angiogenesis and the methylation pattern of genes *p15INK4b* and *p16INK4a* in patients with peripheral T-cell lymphoma. Sao Paulo: Medical School, Sao Paulo University; 2016.

Background: Peripheral T-cell non-Hodgkin's lymphomas (PTCL) are rare tumors characterized by monoclonal proliferation of mature T lymphocytes; they correspond to 15% of lymphoid malignancies and have specific geographic distribution. PTCL comprise 22 distinct clinicopathologic entities, heterogeneous from the clinical and epidemiological perspective, as well as morphologic, phenotypic and molecular. The group of presentation predominantly nodal comprises the histological variants ALCL/ALK+, ALCL/ALK-, AITL and PTCL/NOS. Its treatment is based on polychemotherapy with anthracycline and consolidation with autologous hematopoietic stem cell transplantation (ASCT). With the exception of ALCL/ALK+, these tumors show overall survival at 5 years from 30% to 40%. Due to unfavorable outcomes, gene expression profile studies, as well as studies of methylation of tumor suppressor genes, have emerged in recent years in order to refine the pathological diagnosis of these cancers, improve the pathophysiological knowledge and prognosis, and establish possible therapeutic targets. Preliminary studies with nodal PTCLs indicate favorable prognostic value of overexpression of inflammatory pattern genes like *NFkB1* e *IKKB*, and unfavorable in the case of proliferative genes as *CCNA2*, *TOP2A*, *CHEK1* and the methylated phenotype of suppressor genes *p15INK4b* e *p16INK4a*. Objectives: Assess the impact of relative expression of genes *CCNA2*, *TOP2A*, *CHEK1*, *NFkB*, *IKKB* and *VEGF1* and the methylation of the genes *p15* and *p16* in Brazilian population with nodal PTCLs treated with CHOP-like chemotherapy for the outcomes of overall survival, progression-free survival and disease-free survival. Methods: Gene expression was assessed by qPCR of paraffin samples of 63 patients. The median gene expression was compared with clinical variables and outcomes. Qualitative methylation-specific PCR was used to assess the methylation of *p15* and *p16*. Results: With a segment median of 20 months, the OS, PFS and DFS were, respectively, 45,6%, 34,3% and 63,0% and the complete response (CR) was 46,0%. In multivariate analysis, ECOG ≥ 2 and overexpression of the gene *CCNA2* were associated with worse OS at 5 years in nodal PTCLs ($p = 0,008$ and $p = 0,002$). In univariate analysis, the genes *CCNA2*, *TOP2A* and *CHEK1* were associated with worse prognosis in PTCL/NOS and better in ALCL/ALK negative. The overexpression of the gene *VEGF1* was associated with worse prognosis in the variants AITL and ALCL/ALK negative. Methylation of the gene *p15INK4b* was not found in ALCL/ALK+ group, and in multivariate analysis was associated with worse 5-years PFS in the group of PTCL non-ALK+ (HR: 9,88 and $p = 0,03$). The gene panel tested showed no power to discriminate the different histopathology of nodal PTCL, but it showed a direct association between the median intensity of expression of these genes and biological aggressiveness in this heterogeneous group of neoplasms. The prognostic significance of immunostaining of ALK protein was influenced by IPI constituents variables in this cohort. Conclusion: The overexpression of genes *CCNA2*, *TOP2A* e *CHEK1* were associated with poor prognosis in PTCL/NOS and favorable in ALCL/ALK negative. Hypermethylated phenotype of gene *p15INK4b* was not an observed event in ALCL/ALK+, but it was associated with poor prognosis in nodal PTCL non-ALK+.

Descriptors: 1. Nodal peripheral T-cell lymphomas, 2. Gene expression profile, 3. Proliferation/regulation of cell cycle; 4. Inflammatory response, 5. Angiogenesis, 6. DNA methylation, 7. Classification, 8. Physiopathogenesis, 9. Treatment and 10. Prognosis.

1. INTRODUÇÃO

Os linfomas não-Hodgkin (LNH) de células T periféricas (LCTP) constituem um grupo biológica e clinicamente heterogêneo de doenças raras resultantes da proliferação monoclonal de linfócitos T maduros, pós-tímicos e ativados (DEARDEN et al., 2011). Compreendem um universo de 10% a 15% das malignidades linfoides, com variação geográfica característica. São mais frequentemente observados no sudeste da Ásia e nas regiões tropicais da América Central e América do Sul, onde atingem cifras correspondentes a até 20% a 25% dos LNH (ARMITAGE, 2012).

A atual classificação de neoplasias do tecido linfoide e hematopoiético da Organização Mundial de Saúde (OMS) subcategoriza estas neoplasias, de acordo com sua apresentação clínica, em linfomas predominantemente nodais, predominantemente extralinfonodais, cutâneos primários e disseminados ou leucêmicos (SWERDLOW et al., 2008; DEARDEN et al., 2011). Esta classificação reconhece 22 entidades clínico-patológicas distintas e um número variável de entidades provisórias com características morfológicas, fenotípicas, citogenéticas e moleculares típicas.

A despeito de diferenças significantes nos aspectos patológicos e clínicos, as entidades mais comuns - representadas pelo nicho de apresentação predominantemente nodal, compreendendo o linfoma de células T periféricas, sem outras especificações (LCTP/SOE), o linfoma de células T angioimunoblástico (LCTA) e os linfomas de grandes células anaplásicas/quinase do linfoma anaplásico (ALK) positivo e negativo -, que correspondem a 60% a 70% dos casos de LCTP, tendem a ser tratados similarmente. Entretanto, apresentam, taxas de resposta bastante variável, com prognóstico marcadamente distintos (MOSKOWITZ, 2013).

Estatísticas de âmbito nacional são extremamente escassas a respeito da incidência e da prevalência destas neoplasias. No Hospital das Clínicas, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), e no Instituto do Câncer do

Estado de São Paulo (ICESP), os LCTP representam 5% dos LNH (GOUVEIA et al., 2011).

Acredita-se, porém, que este dado esteja subestimado pela dificuldade e retardo diagnóstico destas neoplasias em nosso meio, às quais comumente requerem métodos diagnósticos complexos, de alto custo e pouco disponíveis na realidade brasileira. Por outro lado, em decorrência da alta agressividade clínica destas doenças, é possível que os pacientes evoluam a óbito antes mesmo de acessar os serviços de saúde terciários ou quaternários.

No Brasil, o LNH é a nona (2,7%) e décima (2,4%) neoplasia maligna mais comum em indivíduos do sexo masculino e feminino, respectivamente. Acometeu 4940 homens e 4850 mulheres no ano de 2015. A mortalidade por linfoma, em geral, corresponde à décima terceira (2146 casos) e décima segunda (1767 casos) causa de morte por câncer em homens e mulheres (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2015).

Nos Estados Unidos da América representam a sexta neoplasia maligna mais prevalente e a sétima causa de morte por câncer, com 70.800 casos novos e 18.990 mortes contabilizadas em 2015 (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2015), destacando-se portanto, sua importância epidemiológica.

Os LCTP de apresentação predominantemente nodal, habitualmente afetam adultos, com discreto predomínio no sexo masculino e com média de idade entre 60 e 70 anos, com exceção do LGCA/ALK+, o qual predomina em idade inferior a 40 anos. Clinicamente, manifestam-se em estágios avançados III ou IV, com frequente envolvimento extralinfonodal, elevado *burden* tumoral, altos níveis séricos de desidrogenase láctica (DHL) e *performance status* não ambulatorial. Assim, a maior parte dos pacientes, ao diagnóstico apresenta Índice Prognóstico Internacional (IPI) de

alto risco. Da mesma forma, têm desfechos clínicos reservados com taxas de sobrevida global em cinco anos de 30% (SKARBNIK et al., 2013).

Diferentes estudos recentes demonstraram uma associação entre LCTP predominantemente nodal e uma maior agressividade biológica intrínseca, o que lhes confere prognóstico ruim em comparação aos LNH de linhagem B (KANSARA et al., 2014). Isso decorre, em parte, da elevada expressão de glicoproteína P (gpP) nas células T neoplásicas. Esta proteína está relacionada a fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR), conferindo resistência intrínseca a vários quimioterápicos, incluindo-se antracíclicos e alcalóides da vinca.

Desta forma, estes tumores apresentam frequente quimiorrefratariedade aos esquemas CHOP ou CHOP-símile, que são habitualmente empregados em seu tratamento primário. São frequentes também recidivas precoces e progressão durante a terapia inicial, de modo a impedir não raramente o término da mesma (FOSS, 2013).

A confirmação diagnóstica dos LCTP é frequentemente complexa, exige integração de dados clínicos e histopatológicos, fenotípicos, moleculares e citogenéticos. Para tanto, faz-se necessária uma análise morfológica por hematopatologista experiente e bem treinado, bem como amostras tumorais bem representativas. De tal forma, deve-se ressaltar o papel fundamental da obtenção de amostras por biópsia ampla, preferencialmente excisional.

Nestas amostras consegue-se visualizar o padrão de infiltração das células neoplásicas no microambiente do tecido comprometido, permitindo verificar se houve conservação ou perda da arquitetura linfonodal normal. Permite também, se necessário, a execução de painel imunohistoquímico específico e amplo (JAFFE et al., 2013). Amostras obtidas por biópsia com agulha grossa são, em sua maior parte, insuficientes

para o diagnóstico e a subclassificação definitiva dos linfomas não-Hodgkin de imunofenótipo T.

Nos LNH de fenótipo B, o correspondente celular normal da neoplasia encontra-se, na maioria das vezes, bem estabelecido. Entretanto, o mesmo não é verdadeiro para os LCTP. Porém, estudos para determinação de padrões de assinatura gênica nessas neoplasias têm sido cada vez mais empreendidos (DE LEVAL et al., 2007; DE LEVAL & GAULARD, 2008).

A tecnologia de estudo de perfil de expressão gênica (PEG) contribui para melhorar a classificação, o conhecimento fisiopatológico e propor possíveis abordagens terapêuticas nos LCTP (COSTELLO et al., 2010). No LGCA, um estudo de expressão gênica conduzido por Thompson et al. (2005), com o uso do *lymphochip microarray* contendo 12.196 cDNAs, diferenciou este linfoma de outros LNH e permitiu separá-lo em ALK positivos e ALK negativos.

Lamant et al. (2007) analisaram 32 casos de LGCA usando o *microarray Affymetrix GeneChip Human Genome U133A*. Eles encontraram como genes discriminatórios entre LGCA/ALK+ e ALK negativo o *BCL6*, *PTPN12*, *CEBPβ* e *SERPINA1*. No grupo ALK+, encontrou-se predomínio de hiperexpressão de genes relacionados à resposta imune, à migração transendotelial e adesão focal de leucócitos. Por outro lado, nos ALK negativos predominaram genes relacionados a funções celulares inespecíficas e envolvidas na interação entre citosinas e seus receptores como *CCR7*, *CNTFR*, *IL21* e *IL22*.

Entre portadores de LGCA, identificou-se também como perfil associado a prognóstico favorável à suprarregulação de genes envolvidos em inflamação, resposta imune e migração transendotelial de leucócitos. Em contraposição, associado a um

prognóstico desfavorável, encontrou-se o perfil de expressão gênico relacionado à regulação do ciclo celular e de atividade pró proliferativa.

Estudos de PEG no LCTA conseguiram diferenciar o LCTA de outros LCTP (DE LEVAL et al., 2007). Além disso, identificaram como seu correspondente celular normal a célula T-*helper* folicular (THF). Evidenciaram também o envolvimento da desregulação do gene *VEGF* (*Vascular Endothelial Growth Factor*) em sua fisiopatologia. Atualmente, o VEGF tem sido alvo para intervenção terapêutica com seus inibidores, a exemplo do bevacizumab (PICCALUGA et al., 2007a).

Nos LCTP/SOE, estudos de PEG revelaram vários genes potencialmente implicados em sua fisiopatologia, permitindo inclusive distinção entre essas neoplasias e LCTA, entretanto, tais estudos não foram eficazes em distingui-lo do LGCA (MARTÍNEZ-DELGADO et al., 2005). Estes estudos propuseram a subdivisão dos LCTP/SOE em subgrupos, de acordo com o perfil de expressão gênico, em subtipo NFkB ativado, CD4+ ativado ou CD8+ ativado ou em três agrupamentos (*clusters*) denominados U1, U2 e U3, com base na expressão de genes de diferentes famílias (MARTÍNEZ-DELGADO et al., 2005; BALLESTER et al., 2006; PICCALUGA et al., 2007b).

Identificaram ainda como correspondente normal da célula tumoral os linfócitos T CD4+ ou CD8+ ativados (PICCALUGA et al., 2007b). Tais estudos também delinearam grupos de prognóstico em face do perfil de assinatura gênica predominantemente proliferativo com hiperexpressão dos genes *CCNA2*, *CCNB2*, *STK6*, *TOP2A*, *CHEK1*. Este perfil de expressão gênico foi associado a um prognóstico desfavorável. O perfil de expressão com hiperexpressão de genes associados à inflamação como *NFkB1*, *IKBkB*, *NFkBIE* foi associado à melhor sobrevida (CUADROS et al., 2007).

Com o conhecimento genético-molecular adquirido nas últimas décadas, sabe-se que fenômenos epigenéticos como metilação do DNA têm papel crítico na regulação da expressão gênica e participam do processo de diferenciação celular. A desregulação da metilação pode resultar em várias consequências com potencial para desenvolvimento de doenças.

Atualmente, existem vários diferentes estudos avaliando as conexões entre anormalidades de metilação do DNA e desenvolvimento de neoplasias. Padrão anormal de metilação, o qual pode causar inativação de genes supressores tumorais, tem sido descrito em LCTP. A hipermetilação das ilhas 5'CpG dos genes *p15INK4b* e *p16INK4a* foi descrita como um dos mecanismos mais frequentes de inativação destes genes em neoplasias hematológicas (JONES et al., 1996).

Um estudo preliminar conduzido por García et al. (2002), por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR)–metilação específica, demonstrou que a hipermetilação dos resíduos citosina das ilhas CpG do DNA dos genes supressores tumorais *p15INK4b* e *p16INK4a* são eventos fisiopatogênicos marcantes nos LNH CD30+ e no linfoma de Hodgkin (LH).

A metilação do *p16* e do *p15* foi detectada, respectivamente, em 28% e 60% dos LNH CD30+ e em 38% e 42% dos LH. A incidência de metilação no diagnóstico e na recidiva sugere que este evento pode ocorrer de forma precoce no desenvolvimento do linfoma anaplásico. Entretanto, no LH, este evento parece estar envolvido na progressão tumoral. O *status* hipermetilado destes genes pode estar associado ao prognóstico desfavorável, pois nesta forma *p15* e *p16* passam a não ser mais transcritos. Entretanto, a função destes genes pode ser restaurada pela aplicação de agentes hipometilantes (OTTERSON et al., 1995; BAUR et al., 1999).

Com base no que foi exposto acima, destaca-se que a raridade destas neoplasias dificulta o empreendimento de estudos randomizados e, conseqüentemente, a obtenção de consenso terapêutico. Além disso, o desconhecimento de grande parte de seus princípios fisiopatológicos, moleculares e das vias de sinalização envolvidas nestas doenças dificulta o estabelecimento de suas características clínico-epidemiológicas e dos desfechos clínicos de diferentes intervenções terapêuticas. Isto torna necessário a realização de novos estudos nesta área para melhor entender estas neoplasias do ponto de vista nacional e internacional.

O sucesso do tratamento dos LCTP está intimamente associado ao diagnóstico histopatológico de certeza devido a sua heterogeneidade. Entretanto, a ausência de marcadores morfológicos e imunofenotípicos específicos podem impedir esta categorização. Desta forma, é essencial aprimorar os atuais recursos diagnósticos para estas neoplasias. Um dos caminhos para esta assertiva certamente é o estudo da biologia destes tumores, que certamente contribuirá para enriquecer o arsenal de marcadores genéticos de diagnóstico e prognóstico existentes.

O presente estudo visa, portanto, compilar as principais características clínico-epidemiológicas destes tumores raros em uma grande série de pacientes brasileiros, comparando-se com a literatura médica internacional disponível. Além disso, objetivamos refinar o diagnóstico histopatológico destas entidades a partir da determinação de um perfil molecular de assinatura gênica específico para cada categoria histopatológica.

Tentaremos ainda avaliar se diferentes padrões de expressão de genes associados à proliferação e ou à regulação do ciclo celular, atividade inflamatória, angiogênese e *status* de metilação do DNA do genes *p15* e *p16* apresentam relevância diagnóstica e

prognóstica nos LCTP. Finalmente, poderemos encontrar potenciais alvos para novas terapias específicas neste grupo de neoplasias.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Avaliar o impacto da expressão relativa dos genes ativadores de proliferação celular *CCNA2*, *TOP2A* e *CHEK1*, dos genes relacionados à resposta inflamatória *NFkB1* e *IKKB* e do gene associado a angiogênese *VEGF1* em portadores de LCTP predominantemente nodais tratados com esquema CHOP-símile, no contexto dos desfechos de resposta global, resposta completa, resposta parcial, sobrevida livre de doença, sobrevida livre de progressão e sobrevida global.

2.2 Objetivos secundários

1. Buscar correlacionar o padrão de expressão dos genes anteriormente citados com as variantes histopatológicas dos LCTP nodais, propondo possíveis critérios moleculares para o refinamento do diagnóstico anatomopatológico destas neoplasias;

2. Determinar se diferentes padrões de metilação dos genes supressores tumorais *p16INK4a* e *p15INK4b* apresentam relevância prognóstica nos portadores de LCTP nodais, determinando suas possíveis interdependências com variáveis do Índice Prognóstico Internacional (IPI) e com mensuração de desfechos – tais como taxas de resposta global, resposta completa, resposta parcial, sobrevida livre de doença, sobrevida livre de progressão e sobrevida global;

3. Avaliar o impacto prognóstico da expressão das proteínas *CCNA2*, *TOP2A*, *CHEK1* e *NFkB1*, mensuradas semiquantitativamente por técnica de imunohistoquímica, em portadores de LCTP nodais, no contexto dos desfechos de sobrevida global, sobrevida livre de progressão e sobrevida livre de doença;

4. Propor potenciais alvos terapêuticos moleculares, a partir do estudo do padrão de expressão gênica e metilação dos genes selecionados em portadores de LCTP, doenças atualmente com desfecho reservado e opções terapêuticas eficazes extremamente limitadas;

5. Estabelecer uma análise do perfil clínico-epidemiológico de pacientes portadores de LCTP nodais atendidos em um grande centro universitário brasileiro, informação atualmente indisponível no âmbito da literatura médica nacional, objetivando melhorar o conhecimento e a caracterização destas neoplasias em uma população de área geográfica adstrita.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Classificação dos linfomas não-Hodgkin de células T/NK

Os linfomas não-Hodgkin são doenças clonais originadas a partir da proliferação de células linfoides B, T ou *natural killer* (NK), em diferentes estágios de maturação. Entre estas neoplasias, 85 a 90% dos casos são de imunofenótipo B e 10% a 15% derivam de células T ou NK (SWERDLOW et al., 2008). Os LNH de células T/NK constituem um grupo de raras doenças, heterogêneas quanto aos aspectos clínicos, morfológicos, fenotípicos e genético-moleculares.

Assim, são individualizados dois subgrupos principais derivados de células T precursoras ou imaturas, incluindo a leucemia/linfoma linfoblástico T e as derivadas de linfócitos T maduros ou pós-tímicos e células NK – reconhecidas como linfomas de células T/NK periféricas (LCTP) (SWERDLOW et al., 2008; O'LEARY et al., 2009a). Os últimos representam 12% a 15% de todos os LNH (O'LEARY et al., 2009b).

Na última classificação da OMS de tumores dos tecidos hematopoiéticos e linfoides, o espectro de LCTP engloba 22 subtipos de doenças, categorizadas de acordo com sua apresentação clínica, em predominantemente linfonodais, extralinfonodais, cutâneos primários e disseminados ou leucêmicos, como se vê sumarizado na tabela 1, abaixo (SWERDLOW et al., 2008; TANG et al., 2010).

Tabela 1. Lista dos linfomas de células T/NK adaptada da Classificação OMS de neoplasias hematopoiéticas e do tecido linfoide

Cutâneos
<ul style="list-style-type: none"> - Micose fungoide e síndrome de Sèzary; - Desordens linfoproliferativas de células T CD30+ cutâneas primárias; <ul style="list-style-type: none"> - Linfoma de grandes células anaplásicas cutâneo primário - Papulose linfomatoide - Linfomas de células T periféricas cutâneos primários, subtipos raros. <ul style="list-style-type: none"> - Linfoma de células T γ/σ cutâneo primário - Linfoma epidermotrópico agressivo CD8+ cutâneo primário - Linfoma de células T pequenas/médias CD4+ cutâneo primário
Predominantemente linfonodais
<ul style="list-style-type: none"> - Linfoma de células T angioimunoblástico; - Linfoma de grandes células anaplásicas ALK (<i>anaplastic lymphoma kinase</i>) positivo; - Linfoma de grandes células anaplásicas ALK (<i>anaplastic lymphoma kinase</i>) negativo; - Linfoma de células T periféricas, sem outras especificações.
Predominantemente extralinfonodais
<ul style="list-style-type: none"> - Doenças linfoproliferativas de células T EBV positivo da infância; <ul style="list-style-type: none"> - Doença linfoproliferativa da infância de células T sistêmica EBV positivo - Linfoma <i>hydroa vacciniiforme</i>-símile - Linfoma de células NK/T extranodal, tipo nasal; - Linfoma de células T associado a enteropatia; - Linfoma de células T hepatoesplênico; - Linfoma de células T subcutâneo paniculite-símile.
Leucêmicos ou Disseminados
<ul style="list-style-type: none"> - Leucemia prolinfocítica de células T; - Leucemia linfocítica de células T tipo <i>large granular</i>; - Leucemia/linfoma de células T do adulto; - Leucemia agressiva de células NK; - Doença linfoproliferativa crônica de células NK.

FONTE: Classificação da Organização Mundial de Saúde de neoplasias linfoides e do tecido hematopoiético, IARC Press, 2008.

3.2 Linfomas de células T periféricas predominantemente linfonodais

Os LCTP predominantemente linfonodais compreendem quatro entidades principais reconhecidas pela OMS, a saber: o linfoma de células T periféricas, sem outras especificações (LCTP/SOE); o de células T tipo angioimunoblástico (LCTA); e o de grandes células anaplásicas ALK positivo (LGCA/ALK+), bem como uma entidade

provisória denominada linfoma de grandes células anaplásicas ALK negativo (LGCA/ALK-).

3.2.1 Linfoma de células T periféricas, sem outras especificações (LCTP/SOE)

3.2.1.1 Definição

De acordo com a classificação da OMS, relatório de 2008, estas neoplasias compreendem uma categoria de linfomas de células T maduras nodais e extralinfonodais sem critérios específicos para qualquer outra entidade definida na classificação atual de linfomas de células T periféricas (SWERDLOW et al., 2008).

Esta categoria inclui entidades com ampla variedade de apresentação clínica, distintos sítios de envolvimento, achados morfológicos e fenotípicos variados, compondo uma grande “miscelânea” para casos que não podem ser colocados em outras categorias definidas (DOGAN et al., 2009).

Como o próprio nome sugere, constituem um diagnóstico de exclusão, apresentando espectro clínico-morfológico bastante amplo. Esta categoria é, por definição, heterogênea, admitindo-se que entidades clinico-patológicas individualizadas sejam delineadas no futuro (JAFFE et al., 2013).

3.2.1.2 Epidemiologia

Os LCTP/SOE representam 60% a 70% dos linfomas de células T periféricas no Ocidente e 5 a 7% de todos os LNH. Acometem predominantemente adultos, com média etária de 61 anos (17 a 90 anos). Casos muito raros são descritos em crianças e apresentam razão homem/mulher de 1,5 a 2,0:1,0 (RUDIGER et al., 2002; ARMITAGE, 2012).

3.2.1.3 Apresentação clínica

A maioria dos pacientes se apresenta com envolvimento de linfonodos periféricos, mas qualquer local pode ser afetado. Doença generalizada é frequentemente encontrada, com infiltração linfomatosa que acomete a medula óssea, fígado, baço e outras localizações extralinfonoidais (RIVZI et al., 2006; ARMITAGE, 2012).

O sangue periférico pode ser envolvido em alguns casos. Mas, a apresentação leucêmica é incomum. Os sítios extralinfonodais mais comumente envolvidos pela doença são a pele e o trato gastrointestinal, porém menos frequentemente se nota o envolvimento de pulmões, glândulas salivares e sistema nervoso central (SWERDLOW et al., 2008).

Segundo estudo conduzido por Rudiger et al., 27% dos pacientes apresentavam a doença em estágio precoce I ou IIE; 12% tinham a doença em estágio III; e 61% tinham doença em estágio avançado IV. Pacientes com LCTP/SOE geralmente apresentam características clínico-laboratoriais desfavoráveis, incluindo presença de sintomas B, níveis elevados de desidrogenase láctica (DHL), tumor *bulky* medindo 10 ou mais centímetros em seu maior eixo, *performance status* não ambulatorial e doença extralinfonodal, levando a maioria (53%) dos pacientes a serem categorizados como possuindo Índice Prognóstico Internacional (IPI) desfavorável (score de 3 a 5) (RUDIGER et al., 2002; SONNEN et al., 2005). Fenômenos paraneoplásicos, tais como, eosinofilia, prurido e raramente síndrome hemofagocítica podem ser encontrados nestes pacientes (RIVZI et al., 2006; TANG et al., 2010).

3.2.1.4 Diagnóstico histopatológico

Tipicamente, o linfonodo acometido pela neoplasia apresenta infiltrado celular de padrão paracortical ou difuso com ruptura da arquitetura linfonodal normal. Na

maior parte dos casos, as células tumorais são de tamanho intermediário a grande, embora uma minoria seja constituída por células neoplásicas predominantemente pequenas (VOSE, 2008; JAFFE et al., 2013) (figura 1).

O espectro citológico é extremamente amplo, variando de um infiltrado monótono constituído por células monomórficas a infiltrados altamente pleomórficos compostos por células com núcleo de contorno irregular, hipercromático ou vesicular, com nucléolo proeminente e muitas figuras mitóticas (HARRIS et al., 1994; JAFFE et al., 2013).

Casos com células Reed-Sternberg (RS) símile são descritos. O infiltrado celular não neoplásico de fundo é bastante variável. Mas contém pequenos linfócitos maduros, plasmócitos, eosinófilos, histiócitos, células B grandes e/ou proliferação vascular proeminente (JAFFE et al., 2013).

A última versão da classificação da OMS reconhece algumas variantes histopatológicas características, incluindo a linfoepiteloide, a folicular e a zona T-símile (SWERDLOW et al., 2008). A variante linfoepiteloide, também conhecida como linfoma de Lennert, mostra um padrão de crescimento difuso ou, mais raramente, interfolicular. Citologicamente, é constituída predominantemente por pequenas células com discretas irregularidades nucleares, agregados confluentes de histócitos epitelioides e algumas células mais atípicas e maiores lembrando blastos.

Pode haver pano de fundo constituído por células inflamatórias e esparsas células Reed-Sternberg-símile, usualmente EBV positivas. Vascularização endotelial não se mostra proeminente e na maioria dos casos as células neoplásicas são CD8 positivas (GEISSINGER et al., 2004; SWERDLOW et al., 2008).

A variante folicular tipicamente evidencia infiltrado de células atípicas com citoplasma claro formando agregados intrafoliculares, mimetizando linfoma folicular

(DE LEVAL et al., 2001). Ela ainda pode ser caracterizada pela formação de pequenos agregados nodulares em fundo de centros germinativos progressivamente transformados mimetizando LH com predomínio linfocitário nodular ou agregados nodulares de disposição perifolicular rodeados por folículos hiperplásicos mimetizando linfoma da zona marginal nodal (RUDIGER et al., 2000).

A despeito de apresentar fenótipo de célula T *helper* folicular, estágio precoce, envolvimento parcial do linfonodo, ausência de proliferação de vênulas arboriformes e disposição irregular de células dendríticas foliculares são parâmetros úteis na diferenciação com linfoma T angioimunoblástico. Recentemente, a descrição da t (5;9) (q33;q22) tem sido relatada como aberrância cromossômica recorrente nessa entidade (STREUBEL et al., 2006).

A variante de zona-T é caracterizada por padrão de crescimento perifolicular, sendo constituída por células neoplásicas pequenas e mínima atipia citológica. Esta entidade pode ser confundida com a hiperplasia paracortical benigna. Alguns estudos sugerem que esta variante possa ser associada a curso clínico mais indolente. Os dados, no entanto, são escassos, não permitindo maiores conclusões (WARNKE, 2007).

Figura 1. Aspectos morfológicos do linfoma de células T periféricas, sem outras especificações (LCTP/SOE). A) Linfoma de células T periféricas, sem outras especificações (LCTP/SOE) – (H&E) – Proliferação difusa de células linfoides atípicas de tamanho intermediário. Notam-se alguns eosinófilos no pano de fundo tumoral não-neoplásico. B) Expressão difusa de CD3 nas células linfoides neoplásicas. C) Tais células também apresentam imunomarcção para CD4. D). O antígeno CD7 é expresso de forma parcial nas células T neoplásicas (aumento de 40x) – Correspondente ao caso L53.

3.2.1.5 Caracterização imunofenotípica

O LCTP/SOE usualmente apresenta imunofenótipo aberrante, com perda de expressão de um ou mais antígenos linfoides T, mais comumente CD5 ou CD7 (WENT et al., 2006; JAFFE et al., 2013) (figura 1). A maioria dos casos são CD4+, embora alguns possam expressar CD8, particularmente a variante linfoepitelióide.

Dupla positividade CD4/CD8 ou dupla negatividade ocasionalmente podem ser encontradas, bem como coexpressão do antígeno NK relacionado CD56 e de grânulos citotóxicos como granzima B, perforina e TIA-1. Um subgrupo de LCTP/SOE apresenta expressão do marcador CD30, excepcionalmente expressam CD15. Mas o perfil fenotípico global e a morfologia permitem distinção com LGCA/ALK-, com EMA+ e grânulos citotóxicos no último e com LH, o qual coexpressa PAX-5 e EBV.

Avaliação para Epstein-Barr vírus por imunohistoquímica ou hibridização *in situ* (ISH) pode ser útil, uma vez que a maioria dos LCTP/SOE é negativa para EBV.

Positividade difusa para este vírus deve levar à suspeição diagnóstica do raro envolvimento nodal por linfoma de células NK/T extranodal tipo nasal.

Células esparsas EBV positivo podem ocasionalmente ser encontradas no LCTP/SOE (DOGAN et al., 2009). Expressão aberrante de CD20 ou CD79a pode ser visualizada em raros casos (WENT et al., 2006).

A expressão de CD52 está ausente em 60% dos casos de LCTP/SOE e a expressão da cadeia β do receptor de células T permite a diferenciação de LCTP/SOE γ/σ e de linfomas de células NK (CHANG et al., 2007). Ao contrário do LCTA, o LCTP/SOE não apresenta fenótipo T *helper* folicular clássico (CD10+, BCL6+, PD1+, ICOS+ e CXCL13+), com exceção da variante folicular/perifolicular (DORFMAN et al., 2006; GROGG et al., 2006). Nesta neoplasia, a taxa proliferativa é usualmente alta e a expressão de Ki67 excedendo 70% está associada a prognóstico adverso (WENT et al., 2006).

3.2.1.6 Diagnóstico genético-molecular

O rearranjo clonal do gene do receptor de células T (TCR) é encontrado na maioria dos LCTP/SOE. A reação em cadeia da polimerase para TCR e/ou rearranjo do genes da imunoglobulina é importante na distinção de hiperplasias reativas atípicas e com os linfomas de células B (RIVZI et al., 2006).

Estas neoplasias comumente apresentam significativas aberrações cariotípicas e como regra têm citogenética complexa. Estudos utilizando citogenética convencional e hibridização genômica comparativa por *microarrays* têm evidenciado ganhos cromossômicos recorrentes nos cromossomas 7q, 8q, 17p e 22q e perdas recorrentes nos cromossomas 4q, 5q, 6p, 9p, 10q, 12q e 13q.

Deleções dos cromossomas 5q, 10q e 12p estão associadas ao prognóstico favorável (ZETTI et al., 2004; THORNS et al., 2007). O desbalanço genético observado no LCTP/SOE difere daquele de outros linfomas T periféricos como LCTA e LGCA (ZETTI et al., 2004; THORNS et al., 2007).

No subgrupo de padrão de crescimento folicular tem sido identificada a t (5;9) (q33;q22) com fusão dos genes tirosina-quinase ITK e SYK (STREUBEL et al., 2006). A proteína de fusão resultante tem propriedades transformadoras oncogênicas *in vitro*, sugerindo que tal translocação possa ser importante na patogênese desta variante (RIGBY et al., 2009; WILCOX et al., 2010).

3.2.2 Linfoma de células T angiomunoblástico (LCTA)

3.2.2.1 Definição e histórico

O linfoma de células T angioimunoblástico (LCTA) é um linfoma de células T periféricas caracterizado por uma síndrome clínica própria, infiltrado polimórfico envolvendo os linfonodos, bem como proliferação de vênulas de endotélio alto com padrão arboriforme e de células dendríticas foliculares (SWERDLOW et al., 2008).

O LCTA foi descrito originalmente em 1974 por Frizzera et al., quando foi denominado de linfadenopatia angioimunoblástica com disproteinemia (FRIZZERA et al., 1974). Termos cunhados posteriormente, tais como linfadenopatia imunoblástica (LUKES et al., 1975) e linfogranulomatose X (LENNERT, 1979) faziam menção a uma linfoproliferação não neoplásica que poderia representar reação hiperimune sistêmica de células linfoides B ou hiperplasia linfoide atípica, a despeito de curso clínico caracterizado por múltiplas recidivas e desfecho fatal na maioria dos pacientes (LUKES et al., 1975).

Subsequentemente, a observação de achados de malignidade, em casos de linfadenopatia angioimunoblástica com disproteinemia, levaram à designação de “linfoma de células T imunoblástico” (SHIMOYAMA et al., 1979). Posteriormente, na década de 1980, a identificação de anormalidades citogenéticas que comprovavam clonalidade e a observação do rearranjo monoclonal do gene do TCR definitivamente estabeleceram sua natureza neoplásica (WEISS et al., 1986; FELLER et al., 1988; KANEKO et al., 1988; TOBINAI et al., 1988).

3.2.2.2 Epidemiologia

O LCTA representa a segunda forma mais comum de linfoma de células T periféricas, suplantado apenas pelo LCTP/SOE. Representa de 15% a 20% dos linfomas T periféricos e 1% a 2% dos LNH (RUDIGER et al., 2002; DE LEVAL et al., 2010). É mais comum na Europa, onde representa 29% dos LCTP do que na América do Norte e na Ásia, onde tem prevalência de 16% e 18% dos LCTP, respectivamente (RUDIGER et al., 2002; VOSE et al., 2008).

De acordo com dados recentes, em algumas localidades do continente europeu, constitui-se na forma mais frequente de LCTP (JAFFE et al., 2013). O mapa de incidência apresenta distribuição geográfica heterogênea, em parte explicada pela baixa prevalência global de neoplasias de células T no Ocidente e pela hiper representação relativa de outros tipos de linfomas de células T/NK na Ásia, mas diferenças verdadeiras podem existir.

O LCTA predomina em adultos idosos, com pico de incidência entre a sexta e a sétima décadas de vida, com média etária que varia de 59 a 65 anos na maioria das séries (VOSE et al., 2008; MOURAD et al., 2008). Um discreto predomínio no sexo

masculino pode ser notado, com razão homem/mulher de 1,3:1,0. Entretanto, a predisposição racial não é reconhecida (VOSE et al., 2008).

3.2.2.3 Apresentação clínica

O LCTA é uma entidade única entre os LNH no que tange aos seus achados clínicos particulares. Nos casos típicos, apresenta-se como doença sistêmica de curso agudo ou subagudo que pode se manifestar após administração de drogas, especialmente antibióticos ou, depois de infecção viral, mimetizando farmocodermia ou viroses sistêmicas (DE LEVAL et al, 2010).

Vários relatos têm também mencionado a associação com infecções bacterianas ou fúngicas. Provavelmente, reflete as consequências da desregulação imune apresentada por portadores desta doença mais do que um fator verdadeiramente causal (DE LEVAL et al., 2010).

A linfadenomegalia generalizada é praticamente universal. Frequentemente, é acompanhada de sintomas constitucionais como febre e perda ponderal (FRIZZERA et al., 1975; DE LEVAL et al., 2010). A adenomegalia geralmente é pequena, com linfonodos variando de 1 a 3 cm de tamanho, usualmente comprometendo cadeias periféricas (PAUTIER et al., 1999; LACHENAL et al., 2007).

Elevada proporção de pacientes apresenta hepatomegalia e/ou esplenomegalia. A infiltração de medula óssea ocorre em até 70% dos casos e tende a se correlacionar com sintomas B, hepatoesplenomegalia, anormalidades laboratoriais e com a presença de células neoplásicas circulantes (CHO et al., 2009).

Mais da metade dos pacientes apresenta erupção cutânea em forma de rash maculo-papular, predominantemente na região do tórax ou generalizado, mimetizando dermatoses inflamatórias. O prurido é frequente e pode ocorrer previamente ou

concomitantemente ao diagnóstico do linfoma, assim como na recidiva. Outras manifestações cutâneas incluem lesões urticariformes, nodulares, em forma de placas e purpúricas (MARTEL et al., 2000).

Outros sinais e sintomas frequentes incluem artralgia ou artrite, efusão pleural, ascite, edema de membros inferiores, envolvimento pulmonar, manifestações neurológicas desmielinizantes e envolvimento de trato gastrointestinal (BRADLEY et al., 1981; KANEKI et al., 1999; TSOCHATZIS et al., 2005; KANG et al., 2007; LACHENAL, 2007; MOURAD et al., 2008). De forma geral, a maior parte dos pacientes apresenta doença extralinfonodal concomitante e estágio avançado (III ou IV) (RUDIGER et al., 2006).

A investigação laboratorial frequentemente mostra a presença de anemia, que ocorre em 40%-57% dos casos; eosinofilia, em 39%; e, ocasionalmente, pancitopenia. Tipicamente, demonstra hipergamaglobulinemia policlonal em 50%-83% dos casos, elevação de DHL sérico em 70%-74% e de velocidade de hemossedimentação em 45%. Uma proporção significativa de pacientes tem autoanticorpos circulantes (66%-77%), incluindo teste de antiglobulina direto ou Coombs direto positivo, crioaglutininas, crioaglobulinas e imunocomplexos circulantes (BASEGGIO et al., 2006; DEARDEN et al., 2011).

Uma série de fenômenos autoimunes tem sido relatada em associação com LCTA, inclusive anemia hemolítica autoimune (AHAI), vasculite leucocitoclástica, artrite reumatoide e doença tireoidiana auto-imune (PIETERS et al., 1982; PAUTIER et al., 1999; HAMIDOU et al., 2001; SUGAYA et al., 2001).

A leucocitose em sangue periférico com linfocitose não ocorre habitualmente. Entretanto, exame cuidadoso de esfregaço de sangue periférico pode revelar uma pequena população de células linfoides atípicas em muitos pacientes. Estas células

podem ser melhor caracterizadas por aberrância fenotípica, utilizando-se imunofenotipagem por citometria de fluxo, pois são CD4+, sCD3-/fraca intensidade e CD10+ (STACCHINI et al., 2007).

Percebe-se desta forma que a síndrome clínica do LCTA se sobrepõe a uma gama de processos inflamatórios, neoplásicos ou reações medicamentosas e que as alterações em sangue periférico e na medula óssea são usualmente inespecíficas, o que dificulta seu diagnóstico (DEARDEN et al., 2011).

3.2.2.4 Diagnóstico histopatológico

O diagnóstico do LCTA pode somente ser obtido com precisão em biópsia excisional e exame histopatológico de linfonodo comprometido. O LCTA é caracterizado por perda parcial da arquitetura normal do linfonodo comprometido pela neoplasia, ou padrão de infiltração difuso com extensão perinodal, poupando os seios corticais periféricos (SWERDLOW et al., 2008; JAFFE et al., 2013) (figura 2).

Segundo Attygalle et al. (2002), três padrões arquiteturais distintos podem ser definidos. Nos casos típicos ou LCTA padrão III sem folículos, que ocorre em 60% dos casos, há perda completa da arquitetura linfonodal, infiltração capsular e perinodal poupando o seio periférico e ausência de folículos residuais de células B.

Os achados característicos desta variante incluem um (I) infiltrado difuso polimórfico com proporção variável de células T neoplásicas atípicas, entremeadas a pequenos linfócitos, histiócitos ou células epitelioides, imunoblastos, eosinófilos e plasmócitos; a (II) proliferação proeminente e de padrão arboriforme de vasos caracterizados por vênulas de endotélio alto e (III) uma proliferação irregular de células dendríticas foliculares (CDF), caracteristicamente acompanhando o trajeto vascular (ATTYGALLE et al., 2002) (figura 2).

As células neoplásicas são de tamanho intermediário, com núcleo arredondado ou levemente irregular. Seu citoplasma é abundantemente claro, com tendência a formar pequenos agregados rodeando as vênulas de endotélio alto. Em casos menos típicos, as células neoplásicas são menores, com discreto pleomorfismo ou atipia, sem citoplasma amplo e claro (WILLENBROCK, 2005).

Uma expansão de imunoblastos B é usualmente presente na região paracortical e pode ter achados morfológicos de hiperplasia imunoblástica reativa ou então mimetizar LH clássico pela morfologia Reed-Sternberg símile (DOGAN et al., 2009). Plasmocitose tecidual também é comum.

Dois outros padrões morfológicos são reconhecidos. No padrão I ou LCTA com folículos hiperplásicos, que ocorre em 15% dos casos, o linfonodo tem arquitetura parcialmente conservada e folículos linfoides hiperplásicos com zonas do manto pouco desenvolvidas são evidenciados. Este padrão é caracterizado por expansão paracortical com infiltrado celular polimórfico constituído por elementos inconspícuos que tendem a se distribuir em torno dos folículos.

No padrão II ou LCTA com folículos depletados, que ocorre em 25% dos casos, folículos depletados ocasionais estão presentes. Em contraste com o padrão III, as células dendríticas foliculares são normais ou minimamente aumentadas nos padrões I e II (ATTYGALLE et al., 2002).

Diferentes padrões histopatológicos têm sido documentados em biópsias consecutivas e parecem representar estágios progressivos de doença. Isto reflete a evolução morfológica mais do que progressão clínica, uma vez que pacientes com padrão I habitualmente apresentam doença avançada (REE et al., 1998; ATTYGALLE et al., 2002; RODRÍGUEZ-JUSTO et al., 2009).

Outras variantes morfológicas ainda são reconhecidas. Aquela rica em células claras compreende os casos de proliferação linfomatosa franca de agregados de células neoplásicas claras (MERCHANT et al., 2006). A variante linfoepitelióide do LCTA é caracterizada por elevado conteúdo de células epitelióides formando agregados pobremente definidos de pequeno tamanho (PATSOURIS et al., 1989).

Um subgrupo de LCTA contém elevada proporção de células B blásticas grandes, reconhecidas como LCTA rico em células B, apresentando mais de 25% de blastos B proliferantes, usualmente; mas, nem sempre, são infectados pelo EBV. Em alguns casos, a proliferação de células EBV positivas pode ser tão proeminente a ponto de formar agregados confluentes difusos.

Nestes casos, um diagnóstico de linfoproliferação EBV positiva ou de linfoma difuso de grandes células B EBV+ pode fazer parte do diagnóstico diferencial. Esta última situação ocorre mais comumente durante a evolução da doença, só que mais raramente pode constituir a figura histopatológica inicial (ZETTL et al., 2002; ATTYGALLE et al., 2007; WILLENBROCK et al., 2007).

Figura 2. Aspectos morfológicos do linfoma de células T angioimunoblástico (LCTA). A) Linfoma de células T angioimunoblástico (LCTA) – (H&E) – Proliferação de células linfoides de pequeno a médio tamanho, com discreta atipia ao redor de vênulas de endotélio alto proeminentes. Células grandes ocasionais são observadas, bem como alguns plasmócitos. B) A maioria das células linfoides neoplásicas expressam o marcador CD3. C) As células neoplásicas também apresentam expressão de CD10. D) O anticorpo anti CD20 salienta os grandes imunoblastos B. E) Expansão da trama de células dendríticas foliculares (CDF) ao redor de vênulas de endotélio alto se torna evidente com imunomarcagem para CD21. (aumento 40x) – Imagens correspondentes a amostra L70.

3.2.2.5 Caracterização imunofenotípica

A imunohistoquímica demonstra expansão das áreas interfoliculares por um infiltrado difuso composto por células linfoides T CD3+. Na maioria dos casos, células T CD4+ dominam o infiltrado. Mas, usualmente, existe uma população entremeada composta por células T CD8+, preservando a razão CD4/CD8 (MERCHANT et al., 2006) (figura 2).

As células neoplásicas são, em sua maioria, de fenótipo T maduro CD4+/CD8-/αβ+ e, habitualmente, apresentam expressão reduzida ou perda de expressão de antígenos T relacionados como CD7, CD3 de superfície ou até mesmo CD4. Expressão parcial do antígeno CD30 é encontrada em mais de um terço dos casos

(WILLENBROCK et al., 2001; LEE et al., 2003; STACCHINI et al., 2007; KARUBE et al., 2008).

Marcadores antigênicos B associados como CD20 e CD79a podem evidenciar centros foliculares residuais e zona do manto pobremente definida, bem como revelar grandes blastos de imunofenótipo B, transformados nas áreas interfoliculares (figura 2). Virtualmente, tais células são EBV+ e demonstram morfologia imunoblástica ou Reed-Sternberg símile. Mimetizam, assim, o LH clássico e o LDGCB, embora com expressão policlonal das cadeias leves de Ig (ANAGNOSTOPOULOS et al., 1992).

A expressão aberrante de CD10 pelas células neoplásicas é observada em 80% dos casos. Frequentemente, porém, é heterogênea (ATTYGALLE et al., 2002; YUAN et al., 2005; DORFMAN et al., 2006; KARUBE et al., 2008; MOURAD et al., 2008) (figura 2).

As células neoplásicas do LCTA expressam vários marcadores de células THF, normalmente localizadas na zona clara do centro germinativo reativo. Estas células são propostas como sendo as correspondentes normais que originam tal neoplasia.

Na maioria dos casos, observa-se expressão citoplasmática da quimiocina CXCL13 (GROGG et al., 2005; DUPUIS et al., 2006). Marcadores adicionais do fenótipo THF tem sido demonstrados por imunohistoquímica no LCTA, incluindo as moléculas de superfície CXCR5, CD154 e *Programmed Death-1* (PD-1 ou CD279, um membro da família do receptor coestimulatório CD28, que resulta em regulação negativa da atividade das células T), *Inducible Coestimulador* (ICOS) (um homólogo do CD28 com função coestimulatória para expansão e ativação de células T) e *cytoplasmic SAP* (*SLAM-associated protein*) (DORFMAN et al., 2006; KRENACS et al., 2006; RONCADOR et al., 2007; XERRI et al., 2008; RODRÍGUEZ-JUSTOS et al., 2009).

A expressão imunofenotípica de BCL-6, um fator de transcrição característico do subgrupo de células THF, é outro marcador fenotípico útil para o diagnóstico de LCTA (REE et al., 1999; YUAN et al., 2005). Portanto, para proposta diagnóstica, os marcadores CXCL-13, PD-1, ICOS e BCL-6 representam atualmente os mais robustos e úteis para o diagnóstico de LCTA (DE LEVAL et al., 2010).

A expansão das CDF, tipicamente associada a proliferação vascular exuberante, pode ser vista na morfologia frequentemente. Mas é melhor evidenciada por imunohistoquímica com marcadores clássicos para estas células, como CD21, CD23, CD35 e/ou CNA.42, dentre os quais o CD21 parece ser o mais sensível (TROXELL et al., 2005) (figura 2). A expansão vascular de vênulas de endotélio alto pode ser melhor identificada mediante utilização dos marcadores imunohistoquímicos CD31 e CD34.

3.2.2.6 Diagnóstico genético-molecular

A maior parte dos LCTA contém uma população monoclonal de células T que pode ser demonstrada por técnica de *Southern blotting* ou PCR. A presença de clone linfóide B pode também ser evidenciada em um quarto dos casos. Tal clone representa a população de grandes imunoblastos B EBV+ possivelmente oriundos da imunodeficiência de base ocasionada pela neoplasia (DOGAN et al., 2003). O genoma do EBV pode ser detectado por PCR ou FISH (*fluorescent in situ hibridization*) em quase 100% dos linfonodos comprometidos por LCTA (ANAGNOSTOPOULOS et al., 1992; JAFFE et al., 2013).

Citogenética convencional detecta aberrância cromossômica em 70% a 80% dos pacientes (SCHLEGELBERGER et al., 1996; LEPRETRE et al., 2000). Trissomia do cromossoma 3 e 5 e cromossoma X adicional são as anormalidades citogenéticas mais frequentemente detectadas em portadores de LCTA (SCHLEGELBERGER et al.,

1996). Hibridização genômica comparativa demonstra ganhos dos cromossomas 22q, 19 e 11q13 e perda do 13q em subgrupos de pacientes (THORNS et al., 2007).

3.2.2.7 Fisiopatologia

No LCTA, um mapa complexo de interações entre as células tumorais derivadas da CTH folicular CD4+ e vários componentes do microambiente reativo ganham importância. Diferentes fatores liberados pela CTH folicular estão envolvidos no recrutamento, ativação e diferenciação de células linfoides B, particularmente o CXCL13 e na modulação de outros subtipos de células T (IL21, IL10 e TGF β) ou na promoção de proliferação vascular (VEGF). Todos estes fatores podem ter função autócrina.

Reativação do genoma do EBV ocorre no contexto da desregulação imune, a qual favorece a expansão de CTH foliculares e linfócitos B. Proteínas virais relacionadas ao EBV presentes nos imunoblastos EBV+ como EBNA-1, em associação a moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe II sobrerregulam o ligante CD28 (B7) e fornecem sinais coestimulatórios para ativar CTH foliculares.

Estas células promovem estimulação adicional, com produção de CXCR5 e CXCL13. O CXCL13 recruta células B para o linfonodo e promovem sua aderência às vênulas e capilares proliferados no interior dos centros germinativos. O TGF β é um mediador importante na diferenciação e proliferação de CDF, as quais atuam como fontes adicionais de CXCL13 e VEGF1, perpetuando o processo oncogênico (DUNLEAVY et al., 2007; DE LEVAL et al., 2010), conforme sumarizado na figura 3.

Figura 3. Modelo fisiopatogênico do LCTA – existência de vias complexas de interação entre as células neoplásicas e vários componentes celulares do microambiente tumoral reativo. Diferentes fatores liberados pela célula T *helper* folicular (THF) estão envolvidos no recrutamento de células B, ativação e diferenciação (CXCL13), na modulação de outros subtipos de células T (IL-10, IL-21 e TGF- β) e promoção de proliferação vascular (VEGF). Todos eles podem atuar também de forma autócrina. Reativação do EBV ocorre no contexto de resposta imune desregulada, o que favorece a expansão de ambas células T *helper* foliculares e células B. O TGF β atua como mediador de diferenciação de célula dendrítica foliculares e estas são fontes adicionais de CXCL13 e VEGF. *THF: célula T *helper* folicular, EBV: Epstein-Barr virus, VEA: vênulas de endotélio alto, CDF: célula dendrítica folicular. FONTE: Adaptado de De Leval et al. (2010).

3.2.3 Linfoma de grandes células anaplásicas *anaplastic lymphoma kinase* (ALK)

positivo

3.2.3.1 Definição

O linfoma de grandes células anaplásicas (LGCA) *anaplastic lymphoma kinase* positivo (ALK+) é um tipo de neoplasia formada por proliferação de células T periféricas, constituído por células linfoides usualmente grandes e pleomórficas, com citoplasma amplo e núcleo em forma de ferradura ou rim. Por definição, essas células expressam o antígeno Ki-1 (CD30), a quinase do linfoma anaplásico (ALK) e têm translocações envolvendo o gene *ALK*.

A última classificação da OMS reconhece três subtipos distintos de LGCA: o linfoma anaplásico primário sistêmico ALK positivo (LGCA/ALK+); o primário sistêmico ALK negativo (LGCA/ALK-), ainda considerado uma entidade provisória; e os anaplásicos cutâneos primários (LGCAC), que têm diferenças imunofenóticas, genéticas e clínicas (SWERDLOW et al, 2008).

Sabe-se que 60% dos LGCA sistêmicos são ALK+ e possuem sobrevida significativamente superior aos ALK-, justificando-se a separação destas duas entidades (GASCOYNE et al., 1999; TEN BERGE et al., 2000).

3.2.3.2 Epidemiologia

LGCA/ALK positivo é uma neoplasia que predomina em idade jovem. Costuma ser mais frequente nas três primeiras décadas de vida, com mediana etária de 30 anos. Correspondem a 3%-5% dos LNH em adultos e 30% dos LNH na infância. Demonstram discreto predomínio no sexo masculino, com razão homem/mulher de 1,5:1,0 (STEIN et al., 1990; BENHARROCH et al., 1998; FALINI et al., 1999).

3.2.3.3 Apresentação clínica

A maioria dos pacientes, ou seja, 70%, apresentam-se ao médico com doença em estágio avançado (III ou IV), com envolvimento de linfonodos periféricos e/ou linfadenopatia abdominal e sintomas B, especialmente febre (SAVAGE et al., 2008). Doença *bulky* não costuma ser achado habitual (DEARDEN et al., 2011).

Além dos linfonodos, localizações extralinfonodais são comprometidas em 50% dos casos. Os locais mais frequentemente envolvidos incluem pele, tecido celular subcutâneo, osso, pulmão e fígado. Envolvimento de trato gastrointestinal e sistema nervoso central são raros.

A incidência de envolvimento de medula óssea é de 10%, quando analisada por hematoxilina-eosina. Mas se eleva para 30%, quando colorações imunohistoquímicas são utilizadas, devido ao envolvimento frequentemente sutil deste órgão (FALINI et al., 1999; STEIN et al., 2000).

Nesse caso, o envolvimento de sangue periférico não é usual, sendo raras vezes identificado na variante de pequenas células (BAYLE et al., 1999). Apesar do estágio avançado e envolvimento de múltiplos sítios extralinfonodais, a maioria dos pacientes encontra-se alocada em categoria de baixo risco ou risco intermediário-baixo pelo IPI devido ao *performance status* preservado, idade jovem à apresentação e níveis normais de DHL (DEARDEN et al., 2011).

3.2.3.4 Diagnóstico histopatológico

O LGCA/ALK+ demonstra amplo espectro morfológico (SWERDLOW et al., 2008; FERRERI et al., 2012). Entretanto, todos os casos contêm uma proporção variável de células com núcleo excêntrico, em formato de “rim” ou “ferradura”, com uma região eosinofílica perinuclear, correspondente ao aparelho de Golgi e citoplasma abundante. Tais células são denominadas de “*hallmark cells*”, por causa da sua presença em todas as variantes morfológicas da neoplasia (BENHARROCH et al., 1998, FALINI et al., 1998) (figura 4).

Os achados morfológicos do LGCA/ALK+ variam de neoplasia de pequenas células ao extremo oposto, onde predominam células grandes. Cinco padrões morfológicos são classicamente reconhecidos (FALLINI et al., 1998; BENHARROCH et al., 1998; SWERDLOW et al., 2008).

A variante “comum” que representa 60% dos casos é composta quase que exclusivamente de células grandes, frequentemente com aparência “*hallmark*” que, por

vezes, lembram células de Reed-Sternberg (figura 4). Quando a arquitetura linfonodal é parcialmente comprometida, as células crescem dentro dos sinusoides, e podem lembrar tumores metastáticos (SWERDLOW et al., 2008).

O padrão linfohistiocítico corresponde a 10% dos casos. Caracteriza-se por células neoplásicas entremeadas por um grande número de histiócitos reativos (FORNARI et al., 2009). Tais histiócitos podem mascarar as células neoplásicas, as quais são, habitualmente, de menor tamanho que na variante comum e se dispõem ao redor de vasos sanguíneos, podendo ser melhor visualizadas por imunohistoquímica com os marcadores CD30 e ALK.

O padrão de pequenas células correspondente a 5% a 10% dos casos, é caracterizado por população predominante de células neoplásicas de pequeno a médio tamanho com núcleo bastante irregular. As *hallmark cells* são sempre presentes e tendem a se concentrar ao redor dos vasos sanguíneos (BENHARROCH et al., 1998; FALLINI et al., 1998; SWERDLOW et al., 2008).

O padrão “*Hodgkin-like*” (3% dos casos) é caracterizado por achados morfológicos mimetizando o LH clássico tipo esclerose nodular (VASSALLO et al., 2006). Mais de um padrão morfológico pode ser evidenciado em uma única biópsia, sendo conhecido por seu padrão composto, que corresponde a 15% dos casos. Recidivas tumorais podem revelar achados morfológicos distintos dos inicialmente visualizados ao diagnóstico (FERRERI et al., 2012)

Figura 4. Aspectos morfológicos do linfoma de grandes células anaplásicas ALK1 positivo (LGCA/ALK1+). A) Linfoma de grandes células anaplásicas (LGCA) – (H&E) – Proliferação difusa de grandes células atípicas, com pleomorfismo evidente. Algumas “*hallmark cells*” podem ser observadas, elas apresentam núcleo grande, multilobulado, em “formato de ferradura”. As células neoplásicas apresentam marcação difusa para B) CD30, 4C) CD43, 4D) EMA e 4E) ALK-1. Nota-se que, neste caso, a positividade para ALK-1 apresenta exclusivamente um padrão de imunomarcação citoplasmático. (aumento 40x) – Imagens correspondentes ao caso L61.

3.2.3.5 Caracterização imunofenotípica

As células neoplásicas são positivas para CD30 (Ki-1), com padrão de imunocoloração de membrana e com reforço na região correspondente ao aparelho de Golgi, conhecido como *dot* perinuclear (figura 4). A imunomarcação mais evidente é vista nas grandes células.

Células tumorais menores podem ser apenas fracamente positivas ou mesmo negativas para CD30 (BENHARROCH et al., 1998). A expressão da proteína ALK está ausente em todos os tecidos humanos normais na fase de vida pós natal, exceto por raras células do tecido cerebral. Por esta razão, técnicas de imunohistoquímica têm amplamente suplantando os testes moleculares no diagnóstico de LGCA/ALK+.

Na maioria dos casos, de forma clássica se encontra a t(2;5) (p23;q35), a qual produz a proteína híbrida NPM/ALK. O padrão imunohistoquímico apresentado nas

grandes células é nuclear e/ou citoplasmático (BENHARROCH et al., 1998; FALLINI et al., 1998; STEIN et al., 2000).

Na variante de pequenas células, a positividade para ALK está restrita ao núcleo das células neoplásicas. Em casos de translocações variantes, diferentes padrões de marcação imunohistoquímica podem ser visualizadas, tanto em membrana quanto em citoplasma, a depender da translocação envolvida (figura 4).

LGCA/ALK+ usualmente mostra fenótipo T aberrante com perda de muitos marcadores de linhagem T, embora alguns casos possam ter fenótipo *null* (STEIN et al., 2000; SAVAGE et al., 2008). Entre os marcadores pan-T, habitualmente, somente o CD2 é positivo, enquanto CD3, CD45RO, CD5 e CD7 são usualmente negativos.

A maior parte dos casos apresenta fenótipo *helper* CD4+/CD8-, mas casos CD8+ têm sido relatados na literatura (FORNARI et al., 2009). Independentemente da expressão de CD4 e/ou CD8, moléculas citotóxicas, como granzima B, perforina e TIA-1 são quase universalmente expressas (FOSS et al., 1996; KRENACS et al., 1997), bem como o antígeno de membrana epitelial (EMA) (figura 4).

Estes grânulos citotóxicos, em conjunto com alguns dos marcadores T, podem ser úteis no estabelecimento do diagnóstico diferencial entre LGCA e LH. Além do mais, as células neoplásicas no LH clássico, ao contrário do LGCA, frequentemente expressam CD15 e PAX-5 (FORNARI et al., 2009).

3.2.3.6 Diagnóstico genético molecular

Aproximadamente 90% dos LGCA/ALK+ apresentam rearranjo clonal do gene do receptor de células T (TCR). A alteração genética mais frequente é a translocação, t(2;5) (p23;q35), que envolve o gene *ALK* localizado no cromossoma 2 e o gene da

nucleofosmina (*NPM*), situado no cromossoma 5 (MORRIS et al., 1995; LAMANT et al., 1996).

Translocações variantes envolvendo o gene *ALK* e outros genes parceiros nos cromossomas 1, 2, 3, 17, 19, 22 e X podem ocorrer, conforme demonstrado na tabela 2. Todas resultam em superregulação da proteína *ALK*. O LGCA/*ALK*⁺ é consistentemente negativo para EBV (BROUSSET et al., 1993).

Tabela 2. Características das proteínas de fusão relacionadas ao LGCA/*ALK*⁺

Alteração genética	Frequência %	Proteína de fusão ligada ao domínio TK do <i>ALK</i> 2p23	Tamanho da proteína de fusão, kDa	Padrão de coloração
t(2;5) (p23;q35)	73	NPM	80	Citoplasmático e nuclear
t(1;2) (q21;p23)	18	TPM3	104	Citoplasmático e nuclear
t(2;3) (p23;q21)	3	TFG	97	Citoplasmático
t(2;22) (p23;q11)	3	CLTCL	250	Citoplasmático granular
inv(2) (p23;q35)	3	ATIC	96	Citoplasmático

FONTE: Classificação da Organização Mundial de Saúde de neoplasias linfoides e do tecido hematopoiético, IARC Press, 2008. NPM: nucleofosmina, TPM3: tropomiosina não muscular, TGF: receptor de tropomiosina, CLTCL: polipeptídeo símile clatrina de alto peso, ATIC: ciclohidrolase monofosfato de iosina/tranformilase ribonucleotídeo 5-aminoimidazol-4-carboxamida.

3.2.3.7 Fisiopatologia

A oncogenicidade da proteína híbrida *NPM/ALK* e outras quimeras derivadas de rearranjos envolvendo o gene *ALK* no LGCA é decorrente da ativação constitutiva do domínio catalítico da *ALK*, resultando em superregulação da proliferação e sobrevida celular (FORNARI et al., 2009).

A transformação mediada pela ALK ocorre por ativação de moléculas de regulação e vias de sinalização específicas, entre as quais se destacam a via Ras/ERK, essencial para a proliferação celular e as vias JAK3/STAT3 e PI3k/Akt, possivelmente mais relacionadas à sobrevivência celular (BAI et al., 2000).

Os resíduos tirosina NPM/ALK constitutivamente fosforilados atuam como sítios de ligação para diversas moléculas como SRC, SH2 *domain-containing transforming proteins* (SHC), substrato 1 do receptor de insulina (IRIS 1) e a proteína relacionada ao fator de crescimento 2 (GRB2).

Estas moléculas modulam a ativação da via Ras/ERK e, então, promovem o estímulo mitogênico responsável pela linfomagenese. Outras moléculas descritas recentemente que parecem estar envolvidas na transformação NPM/ALK mediada através da ativação Ras/ERK incluem a tirosina fosfatase SHP2, também conhecida como PTPN11 (VOENA et al., 2007)

Sinais antiapoptóticos são mediados pelas vias JAK/STAT e PI3k/Akt. A via do STAT 3 tem papel central na tumorigênese mediada pelo ALK e pode ser fosforilado diretamente pela NPM/ALK ou pela ativação do JAK3. A ativação de STAT3 resulta em incremento da transcrição de fatores antiapoptóticos e reguladores do ciclo celular como BCL/XL, survivina, ciclina D3, C/EBP β e *myeloid cell leukemia 1* (MCL1) (ZAMO et al., 2002; COLUCCIA et al., 2004; PIVA et al., 2006).

O PI3k é diretamente ativado pela NPM/ALK e fosforila seus efetores AKT1 e AKT2 (BAI et al., 2000). A consequência dessa ativação de AKT é a inibição do *forkhead box O3A* (FOXO3A), que leva à supregulação da ciclina D2 e à subregulação de genes de transcrição mediados pelo FOXO3A, que promovem apoptose e parada do ciclo celular, tais como BIM e p27 (FORNARI et al., 2009).

A proteína AKT também funciona como ativadora do *mammalian target of rapamycin* (mTOR), que é outra molécula envolvida na regulação da sobrevivência celular e atua como inibidor de outras proteínas pró-apoptóticas, como o BCL2-*antagonist of death cell* (BAD), o que finalmente ativa a degradação proteossomal do p27 por fosforilação (SLUPIANEK et al., 2004; RASSIDAKIS et al., 2005).

Tem sido também demonstrado que o NPM/ALK é capaz de fosforilar a JUN *N-terminal kinase* (JNK) induzindo a ativação da JUN e, finalmente, promove a ativação do fator de transcrição AP1. Como resultado, há inativação de p21 e a ativação de ciclina D3 e de ciclina A, que são responsáveis por progressão do ciclo celular (LEVENTAKI et al., 2007).

Outra via envolvida na linfomagenese mediada pelo ALK parece ser a via da fosfolipase C-gama (PLC- γ). O PLC- γ se liga diretamente a NPM/ALK, por meio de seu domínio SH2, o que leva ao aumento dos níveis intracelulares de cálcio, ativando a quinase PKC que interfere na via Ras/ERK.

Em resumo, a ativação constitutiva da proteína ALK ocasionada pela formação do transcrito NPM/ALK leva a um efeito transformante oncogênico ativando vias relacionadas à proliferação celular (Ras/ERK) e ao prolongamento do ciclo celular, com efeitos antiapoptóticos (JAK3/STAT3 e PI3k/Akt) conforme sumarizado na figura 5.

Figura 5. Vias moleculares de interação da proteína NPM/ALK. Esta proteína de fusão apresenta um efeito oncogênico transformante através da ativação de vias relacionadas à proliferação e à regulação do ciclo celular (Ras/ERK) e aos sinais antiapoptóticos mediados pelas vias JAK3/STAT3 e PI3K/Akt. FONTE: adaptado de Boi et al..(2015).

3.2.4 Linfoma de grandes células anaplásicas ALK (*anaplastic lymphoma kinase*) negativo (LGCA/ALK-)

3.2.4.1 Definição

O LGCA/ALK negativo foi incluído como entidade provisória pela atual Classificação de Neoplasias Hematológicas da OMS. Caracteriza-se por ser neoplasia de células linfoides T maduras, CD30+ e morfologicamente indistinguível do LGCA/ALK+. Entretanto, não apresenta translocações cromossômicas envolvendo o gene *ALK* e, portanto, não expressam a proteína ALK (SWERDLOW et al., 2008; DOGAN et al., 2009).

3.2.4.2 Epidemiologia

O pico de incidência desta neoplasia ocorre em adultos entre 40 e 65 anos, ao contrário do LGCA/ALK+, que predomina em crianças e adultos jovens, embora

possam ocorrer em qualquer faixa etária (FALLINI et al., 2001). A razão homem/mulher é de 1,5: 1,0 (DOGAN et al., 2009).

3.2.4.3 Apresentação clínica

A despeito de ser predominantemente nodal, o LGCA/ALK- envolve sítios extralinfonodais em até metade dos pacientes. As localizações aqui mais comuns são pele, tecidos moles, ossos, pulmão e fígado (SAVAGE et al., 2008). Casos com comprometimento cutâneo deverão ser distinguidos do LGCA cutâneo primário, e aqueles com envolvimento de trato gastrointestinal deverão ser diferenciados do linfoma de células T, associado à enteropatia CD30+ (SWERDLOW et al., 2008).

Uma variante não usual com comportamento clínico indolente originado nas adjacências de implantes protéticos mamários tem sido descrita recentemente (DOGAN et al., 2009).

Nos casos clássicos, a maioria dos pacientes se apresentam com doença em estágio avançado (III ou IV), com linfadenopatia periférica e/ou abdominal e sintomas B, particularmente febre (TEN BERGE et al., 2003).

3.2.4.4 Diagnóstico histopatológico

O LGCA/ALK negativo apresenta achados morfológicos semelhantes aos do LGCA/ALK+. Caracteristicamente, a arquitetura linfonodal é distorcida, porém nos casos com comprometimento estrutural parcial do linfonodo um padrão de infiltração predominantemente sinusoidal com agregados coesivos de células atípicas mimetizando carcinoma metastático pode ser evidenciado (SWERDLOW et al., 2008).

Hallmark cells são usualmente visualizadas e as células multinucleadas com núcleo em padrão de “coroa de flores” ou “guirlanda” são comuns. As células nessa

neoplasia são maiores e têm aspecto mais pleomórfico do que nos LGCA/ALK+ (PITTALUGA et al., 2007). Figuras mitóticas não são infrequentes e achadas como esclerose ou aumento do número de eosinófilos podem ocorrer. Porém, quando presentes deve-se suspeitar de LH (SWERDLOW et al., 2008).

3.2.4.5 Caracterização imunofenotípica

A imunohistoquímica demonstra expressão universal do antígeno CD30 e negatividade para proteína ALK. A imunomarcção para CD30 deve ser intensa e uniforme em membrana, com aparato de Golgi visível. A coloração citoplasmática, no entanto, pode ocorrer. A expressão fraca ou parcial de CD30 sugere diagnóstico de LCTP/SOE CD30+.

Assim como no LGCA/ALK+, esta neoplasia pode apresentar perda de expressão de antígenos linfoides T relacionados, o que muitas vezes leva a fenótipo do tipo *null*. Positividade para EMA e/ou clusterina pode ser útil na distinção de LCTP/SOE, embora estes marcadores estejam presentes em menor frequência do que no LGCA/ALK+ (SAVAGE et al., 2008).

Se positivos, os antígenos CD43, EMA, clusterina, grânulos citotóxicos e CD56 podem ser úteis no estabelecimento de diagnóstico diferencial com LH. Imunohistoquímica para PAX5 também é importante nesta situação, demonstrando positividade fraca nas células de Reed-Sternberg e negatividade em todos os LGCA/ALK- (FELDMAN et al., 2007).

3.2.4.6 Diagnóstico genético-molecular

A maioria dos casos apresenta rearranjo clonal do gene do TCR, independentemente da expressão de antígenos T relacionados. É importante ressaltar

que nenhuma anormalidade citogénética primária recorrente tem sido relatada nestes tumores. Dois estudos indicam uma tendência em termos de padrão de ganho e perda cromossômica diferencial entre o LGCA/ALK- e aqueles casos de LCTP/SOE e LGCA/ALK+, embora achados imbricados possam ocorrer (ZETTI et al., 2004; SALAVERRIA et al., 2008).

3.3 Estadiamento

Similarmente à maioria dos LNH, o sistema de estadiamento padrão utilizado para os linfomas de células T periféricas é o mesmo proposto para LH, na Conferência de Ann Arbor, realizada do ano de 1971 (CARBONE et al., 1971). Entretanto, este sistema apresenta menor acurácia para os LNH, devido à maior frequência de apresentação extralinfonodal destas doenças.

Este sistema de estadiamento reflete tanto o número de sítios envolvidos pela neoplasia quanto a presença de doença acima ou abaixo do diafragma (tabela 3 e figura 6). Os pacientes são ainda divididos em dois subgrupos, de acordo com a presença (B) ou a ausência (A) de sintomas sistêmicos constitucionais, como febre sem causa evidente, sudorese noturna profusa e perda ponderal superior a 10% do valor do peso corpóreo basal em período de seis meses.

A presença de doença *bulky*, definida por lesão igual ou superior a 10 cm ou acima de um terço do diâmetro cardiorácico, deve ser designada pela letra “X”, enquanto o envolvimento extralinfonodal isolado ou por extensão direta de sítio nodal adjacente receberá a codificação da letra “E”.

Neste sistema de estadiamento, além dos linfonodos, foram classificados como estruturas linfáticas, o baço, o timo, o anel de Waldeyer, o apêndice cecal e as placas de

Peyer. Considera-se clinicamente alterado linfonodos maiores que 1,5 cm em seu maior diâmetro (ARMITAGE, 2005).

O baço é considerado um órgão envolvido se houver esplenomegalia maciça perceptível ao exame físico ou se mesmo de tamanho preservado apresentar lesões focais no exame de imagem, afastando-se cistos ou alterações vasculares (CARBONE et al., 1971; ARMITAGE, 2005). O acometimento esplênico é destacado pela letra “S”.

O fígado é considerado envolvido quando existem múltiplas lesões focais, indetectadas pelo exame de imagem ou se biópsia hepática demonstrar infiltração por linfoma (ARMITAGE, 2005). O envolvimento de medula óssea deve ser comprovado histopatologicamente. Acometimento de fígado ou medula óssea caracterizam estágio clínico IV.

Figura 6. Representação esquemática do sistema de estadiamento de Ann Arbor modificado por Cotswolds. Inicialmente, foi descrito para o linfoma de Hodgkin. Posteriormente, foi adaptado para os linfomas não-Hodgkin. FONTE: adaptado de Armitage (2005).

Tabela 3. Sistema de estadiamento de Ann Arbor/Cotswolds

Estágio	Envolvimento
I	Região linfonodal única (I) ou doença extralinfonodal localizada, ou por extensão de sítio nodal envolvido (IE)
II	Duas ou mais regiões linfonodais comprometidas do mesmo lado do diafragma (II) ou extensão extralinfática local associada a uma ou mais regiões nodais do mesmo lado do diafragma (IIE)
III	Envolvimento de regiões linfonodais em ambos lados do diafragma (III), podendo ser acompanhada de extensão extralinfática local (IIIE)
IV	Envolvimento difuso de uma ou mais regiões extralinfáticas

FONTES: Carbone et al. (1971), Armitage et al. (2005). A: ausência de sintomas sistêmicos; B: presença de pelo menos um dos sintomas: perda ponderal superior a 10% do valor basal durante os seis meses que precedem o estadiamento, febre inexplicada e recorrente > 38°. C e sudorese noturna; X: massa maior que 10 cm em seu maior diâmetro ou massa mediastinal excedendo um terço do diâmetro transtorácico transversal aferido por raio-X simples pósterio-anterior ao nível do disco intervertebral T5-T6.

O estadiamento completo de portadores de LCTP deverá ser baseado em exame físico acurado, exames hematológicos e bioquímicos completos, inclusive do nível sérico de DHL, $\beta 2$ microglobulina e eletroforese de proteínas séricas, além de sorologias virais para HIV, hepatites B e C e HTLV-1/2. Recomenda-se realizar avaliação estrutural e funcional do miocárdio em todos pacientes candidatos a regimes terapêuticos contendo antraciclina, devido ao potencial cardiotóxico deste grupo de quimioterápicos.

Todos os sítios linfonodais e extralinfonodais comprometidos deverão ser documentados por TC de pescoço, tórax, abdome e pelve, além da biópsia de medula óssea. Punção lombar com pesquisa de citologia oncológica e ressonância magnética de crânio são necessárias se houver suspeita clínica de envolvimento do sistema nervoso central.

O papel da FDG-PET nos LCTP ainda está sob investigação e somente tem sido relatado na avaliação clínica de pacientes em número limitado de estudos clínicos

(ELSTROM et al., 2003). Os dados sugerem que a maioria dos linfomas T são ávidos pela 18 fluordeoxiglicose com intensidade de captação variável (TSUKAMOTO et al., 2007; KHONG et al., 2008). Porém, este exame não parece suficientemente sensível ou específico para ser usado nos linfomas de células T cutâneos primários.

Em portadores de LCTP, predominantemente nodais, o estágio clínico se altera em menos de 10% dos pacientes com a utilização desta técnica de imagem, e não muda as recomendações de tratamento (ZINZANI et al., 2009). O FDG-PET pode ser mais útil na detecção de doença residual ao término do tratamento ou durante o seguimento. Perde, porém, em especificidade, sendo necessária confirmação histopatológica quando positivo nestes momentos (ZINZANI et al., 2009). De tal forma, seu uso não está recomendado na rotina clínica e deverá ser prospectivamente explorado em estudos futuros.

3.4 Fatores prognósticos e estratificação de risco

3.4.1 Estratificação de risco clínica – Índices prognósticos

O IPI, inicialmente descrito por Shipp et al. (SHIPP et al., 1994), fornece escore prognóstico baseado em variáveis clínicas e laboratoriais, incluindo idade ao diagnóstico, nível sérico de DHL, estadiamento clínico, quantidade de sítios extralinfonodais envolvidos e *performance status*, de acordo com a classificação do *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG). Este índice é capaz de separar os pacientes em quatro categorias de risco distintas conforme demonstrado nas tabelas 4 e 5 dispostas abaixo.

Tabela 4. Categorização do Índice Prognóstico Internacional (IPI). Avaliação da taxa de resposta completa e estimativa de sobrevida global em cinco anos após terapia com esquema CHOP

Grupo de risco	Escore IPI	% pacientes	SG em 5 anos	RC
Baixo	0-1	35%	73%	87%
Intermediário-baixo	2	27%	51%	67%
Intermediário-alto	3	22%	43%	55%
Alto	4-5	16%	26%	44%

FONTE: Shipp et al. (1994). IPI: Índice Prognóstico Internacional. RC: Resposta completa. SG: Sobrevida global. Soma-se um ponto para cada um dos seguintes parâmetros: idade > 60 anos, DHL acima do valor superior da normalidade, estágio clínico III ou IV, performance status ≥ 2 e > 1 sítio extralinfonodal acometido.

Tabela 5. ECOG PS – *Eastern Cooperative Oncology Group performance status*

ECOG	Descrição
0	Completamente ativo, capaz de desempenhar todas as atividades sem restrições.
1	Restrição para atividades físicas extenuantes, com perfil ambulatorial e capaz de realizar atividades cotidianas.
2	Ambulatorial e capaz de se auto-cuidar, porém incapaz de desempenhar atividades cotidianas. Menos de 50% do tempo restrito ao leito.
3	Capacidade limitada de autocuidado, restrito ao leito por mais de 50% do tempo.
4	Completamente incapaz. Não pode estabelecer autocuidado. Totalmente confinado no leito.

FONTE: Oken et al. (1982).

O estudo de Shipp et al. envolveu pacientes com LNH agressivos em uma época em que não se utilizava rotineiramente a imunofenotipagem para caracterizar a linhagem destas neoplasias. Sendo assim, a influência do fenótipo de células T na aplicabilidade do IPI não foi validada neste estudo (SHIPP et al, 1994).

Investigações posteriores, conduzidas por Ascani et al. e López-Guillermo et al. demonstraram que os linfomas de imunofenótipo T podem também ser efetivamente

estratificados, usando-se o IPI, embora a maior proporção de casos seja alocada em categorias de risco intermediário alto e alto, o que, de certa forma, acaba por limitar sua utilidade (ASCANI et al., 1997; LÓPEZ-GUILLERMO et al., 1998). Diversos relatos têm confirmado a utilidade do IPI em pelo menos alguns subtipos específicos de LCTP, destacando-se o linfoma de grandes células anaplásicas ALK positivo e negativo e LCTP/SOE (LÓPEZ-GUILLERMO et al., 1998; GALLAMINI et al., 2004; SAVAGE et al., 2004).

Uma tentativa de produzir um IPI mais específico para linfomas de fenótipo T, particularmente para LCTP/SOE, foi desenvolvida pelo *Intergruppo Italiano Linfomi*, denominado de PIT (*Prognostic Index for T-cell Lymphomas*) (GALLAMINI et al., 2004).

Esta análise, que envolveu 385 casos, identificou quatro fatores de risco. Destaques para idade, DHL sérico, *performance status* e documentação de envolvimento histopatológico de medula óssea, estratificando-se os pacientes em quatro grupos de risco com 0, 1, 2 e 3 ou mais fatores.

As taxas de SG em cinco anos para cada um dos grupos foi respectivamente de 62%, 53%, 33% e 18%, conforme demonstrado no gráfico 1. Este achado está de acordo com a maioria das séries publicadas, sugerindo uma SG em 5 anos de 30 a 35%, sem nenhuma distinção para seus subgrupos (MELNYK et al., 1997; GISSELBRECHT et al., 1998; LÓPEZ-GUILLERMO et al., 1998; SONNEN et al., 2005).

O modelo PIT exibe capacidade superior em prever desfecho em portadores de LCTP, em comparação com o IPI, embora ainda necessite de comprovação adicional na literatura (WENT et al., 2006; VOSE 2008).

Gráfico 1. Sobrevida global de LCTP conforme o Índice Prognóstico de Linfomas T

PIT: idade > 60 anos, performance status ≥ 2 , DHL elevado e envolvimento de medula óssea. Grupo 1 – 0 fatores, SG 62%; Grupo 2 – 1 fator, SG 53%; Grupo 3 – 2 fatores, SG 33% e Grupo 4 – 3 ou mais fatores, SG 18%. FONTE: Savage et al. (2007).

Um sistema de escore de prognóstico denominado mPIT (*modified Prognostic Index for T-cell Lymphoma*), que integra achados clínicos e biológicos incluindo idade, *performance status*, DHL e expressão do antígeno de proliferação celular Ki67, tem se mostrado útil na distinção de prognóstico em três grupos de risco (bom, intermediário e ruim) (WENT et al., 2006).

Curiosamente, nem o IPI e nem o PIT de alto risco têm capacidade de prever desfecho desfavorável no LCTA (MOURAD et al., 2008). É postulado que os efeitos clínicos do LCTA decorram mais da desregulação do sistema imune do que de efeitos diretos do volume tumoral, dado que a hipergamaglobulinemia e a eosinofilia acompanham este linfoma. Como o IPI e o PIT geralmente refletem *burden* tumoral, ambos não se constituem em armas hábeis em prognosticar este linfoma.

O mais recente escore de prognóstico para linfomas T periféricos foi apresentado pelo *International Peripheral T-Cell Lymphoma Project* (IPTCLP) em pacientes com LCTP/SOE e LCTA. Foram consideradas nesse caso as variáveis de idade, *performance status* e contagem plaquetária. A tabela 6, abaixo, demonstra todas as variáveis contempladas para o cálculo de cada índice de prognóstico.

Tabela 6. Variáveis usadas para calcular os diferentes índices prognósticos

Características	IPI*	PIT*	IPTCLP*	mPIT*
Idade (≤ 60 versus > 60)	X	X	X	X
ECOG (≤ 1 versus > 1)	X	X	X	X
DHL (normal versus alto)	X	X		
Estágio clínico (I-II versus III-IV)	X			
Extranodal (< 2 versus ≥ 2)	X			
Medula óssea (- versus +)		X		
Plaquetas ($\leq$ versus $> 150 \times 10^9/l$)			X	
Ki67 (%) (≤ 75 versus > 75)				X

FONTE: Gutiérrez-Garcia et al. (2011). IPI: *International Prognostic Index*, PIT: *Prognostic Index for T-cell Lymphoma*, IPTCLP: *International peripheral T-cell lymphoma project*, mPIT: *modified Prognostic Index for T-cell lymphoma*.

Os quatro escores mencionados até então se mostraram hábeis em predizer o desfecho de pacientes com LCTP. Um estudo conduzido por Gutiérrez-Garcia et al. procurou comparar a utilidade dos quatro escores prognósticos em portadores de LCTP de uma única instituição.

A concordância entre IPI, PIT e IPTCLP foi de 52% para o grupo de baixo risco, 27% para o grupo intermediário baixo, 20% para o grupo intermediário alto e 14% para o grupo de alto risco. O IPI, PIT e IPTCLP demonstraram ser capazes em predizer taxa de resposta completa ao tratamento, com o IPI sendo o melhor escore.

A imunomarcção pelo Ki67 e o mPIT não foram hábeis em prever taxa de RC. Assim, a sobrevida global em cinco anos, comparando-se categorias de baixo risco versus risco intermediário e alto de acordo com IPI, PIT, IPTCLP e mPIT foi de 52% versus 45%, 75% versus 49%, 58% versus 20% e 39% versus 0%, respectivamente.

Em suma, todos os quatro escores analisados demonstraram utilidade em prever resposta e sobrevida em portadores de LCTP, embora o IPTCLP tenha sido o mais significativo em prever resposta global (GUTIÉRREZ-GARCIA et al., 2011). Estes escores não foram aplicados e validados em estudos prospectivos.

3.4.2 Estratificação de risco biológica

Diversos fatores biológicos têm sido alistados com significado de prognóstico em LCTP. A expressão da proteína ALK tem sido proposta como preditor independente de sobrevida em portadores de LGCA (FALINI et al., 1999).

A sobrevida do LGCA/ALK+ é muito superior à do LGCA/ALK-, com taxas de SG em cinco anos de 71% e 15%, respectivamente. Em séries limitadas a pacientes adultos a SLP em cinco anos foi de 60% e 36%, respectivamente para LGCA/ALK+ e LGCA/ALK- (SAVAGE et al., 2008).

O prognóstico favorável do LGCA/ALK+, em parte, está relacionado à menor idade de apresentação desta neoplasia. No *International Peripheral T-cell Lymphoma Project* (ITLP), as SLP e SG foram similares nos LGCA/ALK+ e LGCA/ALK- em idade inferior a 40 anos. Entretanto, a idade inferior a 40 anos é incomum nos LGCA/ALK negativos.

Níveis de proteínas séricas pré-tratamento também têm demonstrado significativo prognóstico (WATANABE et al., 2010). Achados específicos incluem a

expressão de moléculas citotóxicas (ASANO et al., 2005), Ki67 superior a 80% (WENT et al., 2006), anormalidades envolvendo o gene *TP53* e receptores de citocinas.

A expressão de moléculas citotóxicas, como TIA-1 e granzima B, demonstrou ser associada a maior ocorrência de sintomas B, IPI mais elevado, menor taxa de resposta completa e um desfecho inferior quando comparado com pacientes sem estes marcadores (ASANO et al., 2005).

A expressão de receptores de citocinas que distinguem subtipos de células T *helper* se correlaciona com histologia e prognóstico. Por exemplo, a expressão favorável de CXCR3 no LCTA (ISHIDA et al., 2004).

Perdas e ganhos cromossômicos são comuns em LCTP, especialmente del(6q), del(13q) e trissomia do 7 (NELSON et al., 2008). As perdas dos cromossomas 5q, 10q e 12q são associadas ao melhor prognóstico, enquanto a dissomia uniparental ocorre em 35% dos LCTP/SOE. O nível sérico solúvel de CD30 e a positividade imunohistoquímica para CD56 são indicadores de mau prognóstico em LGCA (ZINZANI et al., 1998; SUZUKI et al., 2000).

3.4.2.1 Papel do perfil de expressão gênica na classificação e estratificação de risco nos LCTP

A despeito da evolução das técnicas de diagnóstico, incluindo a imunofenotipagem e os métodos moleculares utilizados na última classificação da OMS para distinção dos vários grupos de LNH T, os LCTP permanecem heterogêneos em termos de biologia tumoral e desfecho. A tecnologia para análise do perfil de expressão gênica contribuiu para reduzir esta heterogeneidade e permitiu uma classificação mais fidedigna com bases moleculares (COSTELLO et al., 2010).

Martínez-Delgado et al. conseguiram diferenciar os linfomas de células T precursoras ou linfoma linfoblástico dos LCTP de acordo com seus respectivos perfis de assinatura gênica (MARTÍNEZ-DELGADO et al., 2004). Apesar da heterogeneidade patológica entre os subtipos analisados no estudo (19 casos de LCTP/SOE, cinco de LGCA, quatro LCTA, três linfomas cutâneos primários e três linfomas de células *natural killer*), os autores falharam em determinar um padrão de assinatura gênica diferencial nestas subclasses de LCTP.

O mesmo grupo, posteriormente analisou 39 amostras de LCTP/SOE, com o mesmo *microarray* (MARTÍNEZ-DELGADO et al., 2005). Os LCTP/SOE apresentaram padrão de assinatura gênica com expressão reduzida de genes relacionados à via NFkB em 11/39 (28%) amostras. Por outro lado, 28/39 (72%) casos apresentaram expressão aumentada destes genes e foram denominados de linfoma NFkB positivos. Os linfomas NFkB negativos apresentaram sobrevida desfavorável em comparação aos NFkB positivos com SG em cinco anos de 40% para os casos NFkB positivos e de 0% para os casos NFkB negativos.

Ballester et al. analisaram 32 casos de LCTP/SOE com uma plataforma de *microarray* contendo 7874 genes. Neste estudo, os LCTP/SOE mostraram clara heterogeneidade molecular, sendo possível agrupá-los em três braços distintos denominados U1, U2 e U3.

O grupo U1 hiper expressava genes relacionados a tecido conectivo e muscular, relacionados a atividade proliferativa e controle do ciclo celular a exemplo do CCND2. Apresentavam prognóstico adverso em relação a outras neoplasias. O grupo U2 hiperexpressava genes envolvidos em translação, sinalização intracelular e apoptose. Finalmente, o grupo U3 mostrou genes expressos em linhagem monocítica e

macrofágica, codificadores de várias citocinas, catepsinas, proteínas relacionadas ao MHC e de proteínas envolvidas na via de resposta ao interferon (IFN/JAK/STAT).

Os autores observaram tendência a uma melhor sobrevida nos grupos U2 e U3, em comparação ao U1, embora o significado estatístico não tenha sido atingido, devido ao número restrito de pacientes analisados (BALLESTER et al., 2006).

Piccaluga et al. analisaram 28 casos de LCTP e identificaram 89 genes que foram expressos de forma distinta em portadores de LCTA e de LGCA- LCTP/SOE. Um estudo posterior dos mesmos autores com 28 casos de LCTP confirmou que o padrão de expressão gênica apresentava alto poder discriminatório entre LCTP/SOE e LCTA, porém não para discriminar os primeiros dos LGCA (PICCALUGA et al., 2007a; PICCALUGA et al., 2007b).

Em relação à contraparte normal das células neoplásicas de LCTP/SOE, os mesmos autores compararam o perfil de expressão gênica destas neoplasias com o de linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ latentes e ativados. Identificou-se dois diferentes perfis nos LCTP/SOE, um grande grupo relacionado a células T CD4⁺ ativadas e outro menor relacionado a linfócitos T CD8⁺ ativados.

Neste estudo, nenhuma diferença baseada no tipo de célula T helper (TH1 ou TH2) foi detectada. Observou-se, no entanto, que as células malignas destes tumores claramente diferiam dos linfócitos T normais, pela expressão de genes relacionados ao remodelamento de matriz extracelular, adesão, apoptose e regulação de transcrição.

Salienta-se, com relação a possibilidades terapêuticas, que a hiperexpressão aberrante de PDGFR α foi identificada por abordagem de *microarray*. E confirmada por imunohistoquímica em 91 das 121 amostras testadas. Isto pode representar um indício robusto para utilização de inibidores de tirosinoquinase nestas neoplasias.

Estudos adicionais demonstraram distintos padrões de expressão gênica em LCTP/SOE, de acordo com a expressão de CD30 (DE LEVAL et al., 2007). Os LCTP/SOE CD30 positivos hiperexpressavam enzimas com atividade de transferase, sintetase e quinase e genes envolvidos no controle da transcrição como a proteína de dimerização Jun, que atua como repressor de IL-2.

Os LCTP/SOE CD30 negativos, mais especificamente, superexpressavam genes envolvidos em ativação de células T, tais como o receptor coestimulatório CD28, o antígeno de ativação CD69, CD52 e moléculas envolvidas na via de sinalização do receptor de células T (TCR).

Cuadros et al. conduziram um estudo com 23 LCTP/SOE e 12 de LCTA, por meio da tecnologia *CNIO Oncochip microarray*, e identificaram cinco grupos distintos. Um achado interessante foi que o cluster denominado “A” incluía 55 genes relacionados à proliferação (*CDC2*, *CCNA2*, *CCNE2*, *STK6* e *CDC25A*) e à regulação do ciclo celular (*TOP2A*, *CHEK1*, *BUB1*, *BUB1B* e *PCNA*), associado ao pior prognóstico, com mediana de sobrevida de 31 e 15 meses, respectivamente, para os grupos de menor e maior atividade proliferativa.

O grupo relacionado à maior atividade proliferativa apresentava hipoexpressão de genes relacionados à resposta imune-inflamatória, como o complexo *NFkB* (*NFkB1*, *IKKB*, *NFkBIE*, *VCAM*, *MMP9* e *SELL*). Neste estudo, nenhum dos outros clusters gênicos (cluster B – proliferação 2, cluster C – inflamação 1, cluster D - inflamação 2 e cluster E – relacionado a expressão de imunoglobulinas) demonstraram associação com desfechos (CUADROS et al., 2007).

Em suma, o perfil de expressão gênica em portadores de LCTP/SOE possui várias implicações potencialmente significativas, destacando-se a capacidade de distinção entre LCTP/SOE e LCTA e de diferenciar o LCTP/SOE em diferentes

subgrupos quanto ao perfil NFkB, CD4+ ativado versus CD8+ ativado, ou em três agregados (U1, U2 e U3) baseado na expressão de várias famílias gênicas.

Tal tecnologia demonstrou ainda a capacidade em diferenciar LCTP/SOE CD30 positivo de CD30 negativos, estabelecer que células linfoides T CD4+ e CD8+ ativadas correspondem às contrapartes normais das células malignas, bem como determinar grupos prognósticos dependendo de um perfil de assinatura proliferativa.

Finalmente, sugere opções terapêuticas relacionadas à regulação da via NFkB, uso de CD52 como imunoterapia alvo e uso de inibidores de tirosinoquinase em tumores que expressam altos níveis de PDGFR α (COSTELLO et al., 2009).

Quanto ao LCTA, as células neoplásicas constituem a minoria entre outras células reativas do tumor. Este fato torna a exploração do perfil de expressão gênica nesta neoplasia bastante dificultosa. Isto é sugerido pelo estudo de Ballester et al., que encontrou principalmente genes associados a células B no padrão de assinatura gênica destes pacientes (BALLESTER et al., 2006).

Estudo de Martínez-Delgado encontrou em cinco de sete amostras de LCTA o perfil de expressão relacionado à ativação da via NFkB. Porém, este padrão não foi específico e observado com alguma variação em todos os outros subtipos de LCTP estudados (MARTÍNEZ-DELGADO et al., 2005).

Cuadros et al. analisaram doze amostras de LCTA utilizando a tecnologia *CNIO Oncochip microarray* e, similarmente, a Miyazaki et al., os autores falharam em identificar assinatura gênica específica do LCTA.

O mesmo ocorreu com Ballester et al., onde a assinatura genética correspondia predominantemente a genes relacionados a linfócitos B, sugerindo preponderância de células inflamatórias reativas, que constituem o microambiente desta neoplasia (BALLESTER et al., 2006; CUADROS et al., 2007; MIYAZAKI et al., 2009).

Em contraste com os estudos anteriores, De Leval et al. obtiveram resultados mais conclusivos. Por meio da tecnologia *Gene Chip Human Genome U133 microarray* (*Affymetrix*), em preparações teciduais, os autores identificaram uma gama de 678 genes diferentemente expressos em LCTA e LCTP/SOE (DE LEVAL et al., 2007).

Este estudo foi o primeiro a estabelecer correlação sólida entre assinatura gênica do LCTA e CTH foliculares pela superexpressão de vários genes característicos de suas correspondentes normais como *CXCL13*, *BCL6*, *PDCD1*, *CD40LG*, *NFATC1*, auxiliando na classificação destas neoplasias.

Um grupo de genes envolvidos na biologia vascular se encontra superexpresso no LCTA, notavelmente o fator de crescimento vascular derivado do endotélio (VEGF). Enquanto De Leval et al sugerem que sua expressão seja decorrente do componente não neoplásico reativo, resultados de outro estudo, com maior grau de pureza de preparação tecidual (> 70% de células neoplásicas) e com a mesma tecnologia apoiam que a secreção anômala de VEGF decorra diretamente das células neoplásicas (DE LEVAL et al., 2007; PICCALUGA et al., 2007a).

De tal forma, o envolvimento de desregulação na síntese de VEGF no desenvolvimento desta neoplasia, sugere um potencial alvo terapêutico pela utilização de inibidores do VEGF (RUAN et al., 2009).

Thompson et al. desenvolveram um trabalho baseado no uso da tecnologia *Lymphochip microarray* (ALIZADEH et al., 1999), contendo 12.196 cDNAs para analisar o padrão de expressão gênica diferencial entre linfoma de grandes células anaplásicas ALK positivo e ALK negativo e estabeleceram diferença molecular entre ambos.

Os genes hiperexpressos nos dois linfomas incluíam moléculas antiapoptóticas e quinases. Embora ambos os grupos apresentassem taxas de crescimento comparáveis, as

vias que levavam a este desfecho eram distintas, pois os tumores ALK positivos superexpressavam ciclina D3 e os linfomas ALK negativos apresentaram expressão reduzida do inibidor do ciclo celular p19INK4D.

Neste mesmo estudo, foi demonstrado que os linfomas ALK positivos hiperexpressavam genes codificadores de moléculas de transdução de sinal (*SYK*, *LYN*, *CDC37*) e hipoexpressavam genes relacionados a fatores de transcrição (*HOXC6* e *HOXA3*), em comparação às neoplasias ALK negativas (THOMPSON et al., 2005).

Estudo posterior de Lamant et al. analisou 25 casos de LGCA/ALK positivo em comparação a sete casos de LGCA/ALK negativo, a partir do uso do *microarray Affymetrix GeneChip Human genome U133A*. Nessa pesquisa, os autores utilizaram critérios morfológicos e histoquímicos mais restritos para estabelecer o diagnóstico de linfoma anaplásico, requerendo coexpressão de CD30 e EMA e positividade para grânulos citotóxicos (granzima B e/ou perforina). Tal análise identificou 303 genes diferentemente expressos com 117 genes superexpressos nos casos ALK positivos e 186 genes nos casos ALK negativos.

Os genes mais discriminatórios entre ambas neoplasias envolveram o *BCL-6*, *PTPN12*, *CEBP β* e a *SERPINA-1*. Os genes superexpressos no grupo ALK positivo eram relacionados a função imune, a via NFkB, a migração transendotelial de leucócitos e adesão celular, enquanto genes relacionados a funções celulares inespecíficas e moléculas envolvidas da interação de citocinas como *CCR7*, *CNTFR*, *IL21* e *IL22* eram associados ao grupo ALK negativo (LAMANT et al., 2007).

Também foram identificados diferentes grupos de prognóstico nestes tumores, com um perfil favorável que corresponde à hiperexpressão de genes envolvidos em inflamação, resposta imune e migração transendotelial de leucócitos e desfavorável

(recidiva < 12 meses), associado a genes implicados em proliferação e regulação do ciclo celular.

3.4.2.2 Estado de metilação do DNA e linfoma de células T

Determinadas anormalidades genéticas encontradas em diversos LNH não fornecem retrato fiel e completo dos mecanismos moleculares envolvidos em sua patogênese. Alterações epigenéticas, como o grau de metilação do DNA e a deacetilação de histonas, são mecanismos adicionais que podem contribuir para formação do fenótipo maligno.

A metilação do DNA é um mecanismo fisiológico que existe para que as células mantenham padrão de expressão gênica normal. Além disso, colabora para a homeostasia dos processos de regulação da expressão gênica, de diferenciação celular e do desenvolvimento de células tronco hematopoiéticas.

Entretanto, hipermetilação aberrante dos segmentos *CpG* do DNA podem levar ao silenciamento de diversos genes, incluindo genes supressores tumorais, sendo, então, reconhecida como mecanismo de tumorigênese e progressão dos linfomas (OTSUKI et al., 1995; DREXLER et al., 1998).

Nos eucariontes mais especializados os resíduos de citosina localizados na porção 5' da região promotora *CpG* são metilados gerando resíduos guanosina. Esta modificação tem importante efeito regulatório na expressão gênica, especialmente quando envolve áreas ricas em *CpG*, conhecidas como ilhas *CpG* nas regiões promotoras dos genes (HOLLIDAY et al., 1993).

Enquanto quase todos os genes associados às ilhas *CpG* são protegidos de metilação excessiva em cromossomos autossômicos, a metilação exacerbada das ilhotas

CpG tem sido associada à inativação transcricional de determinados genes, como supressores tumorais.

Metilação aberrante das ilhas *CpG* tem sido documentada como evento relativamente frequente em células transformadas, que perderam suas propriedades apoptóticas fisiológicas e tiveram inativação de transcrição de genes supressores tumorais em neoplasias humanas (HERMAN et al., 1994).

Os genes *p16INK4a* e *p15INK4b* são dois membros da família *INK* de inibidores de quinase dependentes de ciclina. Quando em estado hipermetilado, produzem inativação funcional da proteína Rb e subsequente desbloqueio da fase G1 do ciclo celular, por meio de ligação as quinases dependentes de ciclina 4 e 6 (CDK4 e CDK6) (SERRANO et al., 1993).

Nos últimos anos, tem se tornado evidente que as regiões promotoras *CpG* de muitos genes relacionados a câncer estão hipermetiladas em diferentes neoplasias humanas. A hipermetilação da região promotora *CpG* do gene supressor tumoral *p16INK4a* foi relatada em neoplasias de cólon, bexiga urinária, mama, pulmão, glioma, melanoma, leucemia e linfoma.

Porém, a hipermetilação do gene supressor tumoral *p15INK4b* tem sido quase que exclusivamente envolvidas na gênese de neoplasias hematológicas (OTSUKI et al., 1995). Ambas as alterações epigenéticas também foram demonstradas em linfomas do tecido linfoide associado à mucosa (MALT), de Burkitt e no mieloma múltiplo.

A capacidade para detectar hipermetilação dos segmentos de interesse apresenta maior percentual de positividade quando técnicas mais sensíveis são utilizadas, como reação de PCR específica para metilação (MSP) ou sequenciamento genômico com bissulfito (MARTÍNEZ-DELGADO, 1997).

Estudo conduzido por García et al., envolvendo portadores de LGCA, LCTP/SOE CD30+, LDGCB de morfologia anaplásica e LH, neoplasias morfológica e fenotipicamente interrelacionadas, revelou distintos padrões de metilação nos genes *p16INK4a* e *p15INK4b*.

Na série citada, o padrão de metilação aberrante do *p15* e *p16* foram frequentes tanto em LH quanto em LNH (LNH: *p16* 28%; *p15* 60%; LH: *p16* 38% e *p15* 42%). Estas frequências elevadas clareiam a importância da hipermetilação de regiões promotoras gênicas como possíveis eventos iniciadores destas neoplasias.

Embora os mecanismos moleculares envolvidos neste processo não sejam completamente esclarecidos, achados recentes sugerem que proteínas ligadas ao DNA metilado e às histonas deacetiladas participam do silenciamento transcricional de genes hipermetilados em neoplasias (GARCÍA et al., 2002).

Nos LNH a hipermetilação do gene *p16INK4a* foi associada ao fenótipo mais agressivo e pior prognóstico, quando correlacionado ao IPI. Este dado corrobora com a proposição de que a inativação do gene *p16* seja preditor de pior prognóstico em portadores de linfoma de alto grau.

A despeito da elevada frequência de metilação aberrante dos genes *p16* e *p15* detectadas em LGCA e LH, tais alterações parecem ser eventos precoces e inicializadores de tumorigênese em LGCA e implicadas na progressão tumoral e recidiva no LH.

Esses dados são relevantes, devido à reafirmação de distinção entre duas entidades que apresentam sobreposição morfológica e fenotípica, o que contribui para melhor entendimento de sua biologia (GARCÍA et al., 2002).

A análise de maior número de casos, incluindo mais pacientes recidivados e com dados clínicos detalhados irá auxiliar na definição de forma mais sólida da utilidade da

análise de metilação dos genes *p15* e *p16* nestes linfomas, assim como na determinação de potenciais alvos de exploração terapêutica, devido a relatos recentes de restauração de atividade gênica previamente supressa pela utilização de drogas hipometilantes.

3.5 Genes selecionados

3.5.1 Gene *TOP2A* (DNA topoisomerase II α)

O gene DNA topoisomerase II α (TOP2A), também conhecido como TOP2 ou TP2A, localiza-se no cromossoma 17q21-q22 e codifica uma proteína de 170 kDa designada DNA topoisomerase II α . Topoisomerases são enzimas expressas de forma ubíqua, controlam e alteram o estado topológico do DNA durante a transcrição.

Esta enzima nuclear é envolvida em processos de condensação dos cromossomas, separação das cromátides irmãs e alívio do estresse de torção que ocorre durante a transcrição e a replicação do DNA. Catalisam a quebra e a rejunção transitórias dos dois filamentos da dupla fita de DNA, permitindo que uma fita passe através da outra, alterando assim o estado topológico do DNA.

Problemas comuns como a formação de nós e emaranhados de DNA são resolvidos pelas topoisomerases por mediação da quebra de um ou dos dois filamentos de DNA.

A enzima topoisomerase tipo I apenas corta uma fita da dupla hélice de DNA, de modo a permitir a saída do estado helicoidal em que se encontra o DNA. Quatro genes codificam as topoisomerases tipo I, as quais incluem a topoisomerase nuclear tipo I (TOP1) e a topoisomerase mitocondrial tipo I (TOP1MT).

As enzimas tipo I são subdivididas em A e B, baseadas no mecanismo catalítico utilizado para gerar uma quebra única no DNA. TOP1 e TOP1MT são ambas do tipo 1B, que atuam pela formação de pontes constituídas por resíduos 3'-fosfotirosil.

A camptotecina é um produto inibidor natural da TOP1, que levou à descoberta de vários compostos derivados desta substância utilizados com finalidade antineoplásica. Tais inibidores aprisionam a enzima em um complexo de clivagem, em conjunto com o DNA.

Topoisomerases tipo II (IIA e IIB) são enzimas dependentes de ATP particularmente importantes para o desembaraçamento do DNA que ocorre pela geração de quebras mediadas pela enzima sobre a dupla hélice genômica.

A disfunção das enzimas tipo 2 pode, então, ter efeitos genotóxicos potencialmente significativos, os quais podem ser sobrepujados, com a utilização de vários agentes terapêuticos inibidores da atividade desta enzima, os denominados inibidores da topoisomerase II.

A topoisomerase tipo IIA regula a integridade e topologia do DNA nas células. Também denominada DNA girase, é primariamente responsável pela formação de supertorções negativas no DNA. Nos seres eucariontes a topoisomerase II consiste em um polipeptídeo único, onde as regiões N-terminal e C-terminal correspondem às subunidades girase B e girase A, respectivamente. Nos procariontes, geram um homodímero responsável pela confecção das supertorções negativas.

Existem quatro domínios funcionais na topoisomerase II: o domínio 1 (região N-terminal da girase B) que é uma ATPase; o domínio 2 (C-terminal da girase B), responsável pela interação das subunidades enzimáticas; o domínio 3 (N-terminal da girase A) é responsável pela função de quebra e rejunte devido à sua capacidade de formar pontes proteicas no DNA; e o domínio 4 (C-terminal da girase A), útil em ligações não específicas ao DNA.

Estudo conduzido por Cuadros et al., em 2007, que avaliou 35 amostras de linfoma de células T periféricas predominantemente nodal, demonstrou que um *cluster*

gênico incluindo 55 genes envolvidos em funções de proliferação e regulação do ciclo celular, entre eles o gene *TOP2A*, foram associados a desfecho desfavorável e apresentação fenotípica mais agressiva (CUADROS et al., 2007).

3.5.2 Gene *CCNA2* (ciclina A2)

O gene *CCNA2* se localiza na região q27 do cromossoma 4 e codifica uma proteína da superfamília das ciclinas, cujos membros são caracterizados por expressão proteica abundante durante todas as fases do ciclo celular. As ciclinas são proteínas eucariontes que desempenham papel ativo no controle dos ciclos de divisão celular e nuclear e são reguladas por quinases dependentes de ciclina (CDK *kinases*).

Distintas ciclinas exibem diferentes padrões de expressão e degradação que contribuem para coordenação temporal dos eventos mitóticos. Em contraste à ciclina A1, presente somente em células de linhagem germinativa, esta ciclina é expressa na maioria dos tecidos humanos.

A ciclina A2 se liga e ativa as quinases dependentes de ciclina CDC2 (p34) ou CDK2, formando o fator promotor de maturação (MPF), o qual promove a transição entre as distintas fases do ciclo celular (G1/S e G2/M). Existem dois principais grupos de ciclinas, as denominadas G1/S, essenciais para o controle do ciclo celular na transição G1/S (inicialização do ciclo celular) e as ciclinas G2/M, essenciais para transição entre a fase G2 e a fase de mitose.

As ciclinas G2/M se acumulam constantemente durante a fase G2 e são abruptamente destruídas quando a célula entra em mitose, no final da fase M como exposto na figura 7.

Figura 7. Participação de ciclinas no controle/regulação do ciclo celular de eucariontes.

Homólogos de ciclinas são encontrados em vários vírus, incluindo o herpes vírus 2 saimiriine e o herpes vírus tipo 8 (HHV-8), associado ao desenvolvimento do sarcoma de Kaposi. Estes homólogos virais diferem de seus contrapartes celulares normais, fazendo com que proteínas virais ganhem novas funções e eliminem outras, de tal forma que estes vírus possam aproveitar e se beneficiar do ciclo celular normal.

O HHV-8, além de implicado no sarcoma de Kaposi, exibe correlação direta na fisiopatogênese de doenças hematológicas, como a doença de Castleman multicêntrica (variante de células plasmáticas) e o LNH primário de efusões (linfoma das cavidades).

A ciclina A pode ativar duas diferentes quinases dependentes de ciclina, as CDK1 e CDK2, desempenhando ação nas fases S e M do ciclo celular. A síntese de ciclina A tem início com a aproximação da transição G1-S, sendo abruptamente metabolizada antes da metáfase.

Os elementos responsáveis por sua degradação estão localizados na região N-terminal da molécula e consistem em um KEN Box, um D-box e outro elemento de destruição ainda mal caracterizado na região C-terminal ao D-box.

Assinatura gênica de carácter proliferativo definida em portadores de LNH T periférico linfonodal, incluindo 23 LCTP/SOE e 12 LCTA, onde o gene *CCNA2* é frequentemente hiperexpresso, parece exibir relação estreita com desfecho clínico desfavorável nestas neoplasias (CUADROS et al., 2007).

3.5.3 Gene *CHEK1* (*Checkpoint kinase 1*)

O gene quinase ponto de checagem 1 (*CHEK1*) está localizado no cromossoma 11q24.2. A proteína codificada por este gene pertence à família de proteínoquinases Serina/Treonina (Ser/Thr), as quais são fundamentais para a parada do ciclo celular mediada por uma checagem de ponto que se processa em resposta a um dano no DNA ou presença de DNA não replicado.

Esta proteína pode ainda regular negativamente a progressão do ciclo celular na ocasião de ciclos celulares erráticos ou anômalos. A regulação é fornecida por vários mecanismos que atuando em conjunto ajudam a preservar a integridade do genoma, tais como o reconhecimento de sequências ou substratos [R-X-X-S/T], ligação e fosforilação das moléculas CDC25A, CDC25B e CDC25C.

A fosforilação da molécula CDC25A nos aminoácidos ‘Ser-178’ e ‘Thr-507’ e a fosforilação do CDC25C no sítio ‘Ser-216’ criam sítios de ligação para a proteína 14-3-3, a qual inibe a função do CDC25A e CDC25C. A fosforilação da proteína fosfatase CDC25A é necessária para o retardo da progressão do ciclo celular em resposta a quebra da dupla fita de DNA, tendo assim função de freio biológico.

A fosforilação *CHEK1*, mediada por CDC25A nos sítios ‘Ser-76’, ‘Ser-124’, ‘Ser-178’, ‘Ser-279’ e ‘Ser-293’, também levam à proteólise do CDC25A. A fosforilação de CDC25A no resíduo ‘Ser-76’ leva à fosforilação subsequente dos resíduos ‘Ser-79’, ‘Ser-82’ e ‘Ser-88’ pela NEK11, a qual é necessária para a

poliubiquitinação e degradação do CDC25A. A inibição de CDC25 leva ao aumento da atividade inibitória de complexos ciclina/quinase dependente de ciclina e bloqueia a progressão do ciclo celular.

A proteína CHEK1 também se liga e fosforila RAD51 no resíduo ‘Thr-309’, promovendo a liberação de RAD51 do BRCA2 e aumenta a associação do RAD51 com a cromatina, promovendo então reparo do DNA por recombinação homóloga. Tem ainda a função de fosforilar múltiplos sítios dentro da região C-terminal do supressor tumoral *TP53*, promovendo sua ativação por acetilação, gerando parada do ciclo celular e supressão da atividade proliferativa.

A mesma proteína desempenha atividade adicional na ligação e fosforilação do resíduo ‘Ser-743’ do gene *TLK1*, o que previne a fosforilação TLK1 dependente do fator de estruturação da cromatina ASF1A, e pode promover a montagem da cromatina na presença ou na ausência de dano ao DNA.

Por fim, regula a transcrição de genes determinantes para progressão do ciclo celular através da fosforilação de histonas. A fosforilação da histona H3.1, gerando o produto H3T11ph leva a inibição epigenética de um subgrupo de genes responsáveis pela progressão do ciclo celular. Pode, ainda, fosforilar o gene *RBI* para promover a sua interação com a família E2F de fatores de transcrição com subsequente parada do ciclo celular.

O gene *CHEK1*, conjuntamente com outros genes envolvidos em funções de replicação, transcrição e reparo do DNA, como *BUB1*, *BUB1B* e *PCNA*, tem alto poder discriminatório para um padrão de assinatura gênica proliferativa relacionada a prognóstico adverso em portadores de linfoproliferação T crônica (CUADROS et al., 2007).

3.5.4 Gene *VEGF* (Fator de crescimento derivado do endotélio vascular)

Localizado no cromossoma 6p12, o gene do fator de crescimento derivado do endotélio vascular (*VEGFA*, *VPF* ou *MCDVI*) é membro da família de fatores de crescimento derivados de plaquetas/derivado do endotélio vascular (PDGF/VEGF). Esse gene codifica uma proteína frequentemente encontrada como homodímero com ligações dissulfeto.

Esta proteína é um mitógeno glicosilado que atua especificamente sobre células endoteliais com efeitos variados, incluindo regulação da permeabilidade vascular, indução da neoangiogênese, crescimento e proliferação de células endoteliais, promoção da migração destes elementos celulares e inibição da apoptose. Constitui, portanto, proteína sinalizadora envolvida na regulação da vasculogênese, conforme demonstrado na figura 8.

Figura 8. Regulação de angiogênese mediada pela proteína VEGF – FONTE: adaptado de Tabernero (2007).

O VEGF se liga e ativa um receptor do tipo tirosina quinase, denominado de VEGFR. Três isoformas de VEGFR têm sido identificadas em humanos. São estes:

VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) e VEGFR-3 (Flt-4). O VEGFR-2 se caracteriza por mediar a maioria das respostas celulares ao VEGF.

Acredita-se que a ação do VEGFR-2 é modulada pelo VEGFR-1 ou então que este atua como receptor de acoplamento e desacoplamento sequestrando o VEGF do VEGFR-2. As isoformas VEGF-165 e VEGF-145 se ligam à neuropilina-1 (NRP-1), enquanto a isoforma VEGF165B se liga ao KDR, porém, sem ativar vias de sinalização intracelular ou a angiogênese e inibe o crescimento tumoral.

Os níveis elevados de VEGF estão implicados na fisiopatogênese da síndrome de POEMS e explicam a sobrecarga circulatória e os derrames serosos apresentados por tais pacientes, em decorrência do aumento da permeabilidade vascular oriunda da atividade desta proteína.

Mutações neste gene têm sido associadas à retinopatia proliferativa e não proliferativa em indivíduos portadores de diabetes mellitus. A superregulação de vários mediadores angiogênicos tem sido demonstrada no linfoma angioimunoblástico. O VEGF é hiperexpresso neste linfoma e, possivelmente, atua como um mediador-chave da vascularização de padrão arborescente proeminente observada nesta doença (de LEVAL et al., 2007; PICCALUGA et al., 2007).

Estudos adicionais têm demonstrado, pela técnica de imunohistoquímica, que tanto as células neoplásicas quanto as endoteliais expressam VEGF e seu respectivo receptor, sugerindo a possibilidade de efeito parácrino ou de alça autócrina (PICCALUGA et al, 2007). Destaca-se ainda que as células dendríticas foliculares dos LCTA representam uma fonte adicional de secreção de VEGF (KONSTATINOU et al., 2009).

3.5.5 Gene *NFkB1* (Fator nuclear kappa B1)

O gene do fator nuclear do polipeptídeo leve kappa promotor de células B está localizado no cromossoma 4q24. Ele sintetiza uma proteína de 105 kD que experimenta processamento cotranslacional pelo proteassoma 26S para produzir outra proteína de 50 kD.

A proteína de 105 kD inibe a transcrição específica da proteína Rel e a proteína de 50 kD é uma subunidade ligadora ao DNA do complexo proteico NF-kappa-B (NFkB). O NFkB é um regulador de transcrição que pode ser ativado por diversos estímulos intracelulares e extracelulares, tais como citocinas, radicais livres de oxigênio, irradiação ultravioleta e produtos virais e bacterianos.

Em células não estimuladas, os dímeros NFkB são sequestrados e inativados no citoplasma por um complexo proteico denominado inibidor do fator nuclear kappa-B (IkappaB). O IkappaB inativa o NFkB, impedindo sua migração nuclear. Ativação do NFkB ocorre via degradação do IKappaB, processo iniciado por sua fosforilação pela quinase IKappaB (IKK).

Esta fosforilação resulta em ubiquitinação do IKappaB e faz com que este se torne um alvo da degradação pelo proteassoma. O NFkB regula a expressão do IKappaB, de modo a levar à formação de uma alça de *feedback* negativo. Por sua vez, quando ativado, o NFkB é translocado para o núcleo e estimula a expressão de genes envolvidos em uma ampla variedade de funções biológicas.

A ativação inapropriada do NFkB tem sido associada a várias doenças inflamatórias, enquanto sua repressão persistente pode promover desenvolvimento imune celular inapropriado ou retardo do crescimento celular.

Estudos de expressão gênica em LNH T periféricos têm evidenciado correlação inversa entre a assinatura de proliferação e aquela onde predominam genes associados à

resposta inflamatória, como o *NFkB1*. Relato de Martínez-Delgado sugere que determinados genes da via NFkB são úteis para separar grupos de LCTP de prognóstico distinto (MARTÍNEZ-DELGADO et al. 2005).

Um estudo posterior de Cuadros et al. constatou, por sua vez, que genes relacionados à via NFkB estavam associados a distintos processos biológicos como infiltração tumoral por macrófagos, liberação de proteinases e citocinas, aumento da permeabilidade vascular, ativação de células T e de resposta imune, os quais são marcadores bem estabelecidos do processo de inflamação.

As neoplasias com predomínio de expressão de assinatura proliferativa relacionados ao desfecho desfavorável tiveram expressão reduzida de genes ligados à inflamação (CUADROS et al., 2007). No mesmo estudo, em concordância com dados apresentados pelo *array*, o percentual de histiócitos foi inversamente relacionado à assinatura gênica proliferativa. Sugere, assim, que células inflamatórias possam ter papel na regulação da proliferação tumoral.

3.5.6 Gene *IKBkB* (Quinase do inibidor do fator nuclear NFkB)

Este gene é localizado no cromossoma 8p11.2 e codifica uma proteína que fosforila o inibidor kappa B (IKappaB) no complexo inibidor/NFkB, e leva à dissociação do inibidor e à consequente ativação do NFkB. A quinase IkappaB é um complexo enzimático da via sinalizadora NFkB. Este complexo é constituído por três subunidades (IKK α (IKK1), IKK β (IKK2) e IKK γ (NEMO)).

As subunidades α e β são cataliticamente ativas, enquanto a subunidade γ apresenta função regulatória. Como anteriormente mencionada, a ativação de NFkB ocorre via degradação do IkappaB em processo inicializado com a sua fosforilação pela quinase IkappaB (IKK).

O IkappaB fosforilado se dissocia do NFkB, levando à ubiquitinação deste inibidor e posterior degradação pelo proteassoma, o que libera o NFkB para entrar no núcleo e regular a expressão gênica, conforme demonstrado na figura 9. No estudo de Cuadros et al. em 2007, o *IKBkB* constou como gene relacionado ao perfil de assinatura inflamatória em portadores de LCTP, com potencial prognóstico favorável (CUADROS et al., 2007).

Figura 9. Diagrama de via de sinalização levando a transcrição gênica induzida pelo NFkB. Ativação do complexo IKK leva a fosforilação do IκB permitindo translocação do NFkB para o núcleo celular.* TNFα – fator de necrose tumoral α, LPS: lipopolissacarídeo.

3.6 Formas de tratamento

3.6.1 Quimioterapia

Os regimes quimioterápicos convencionais como CHOP (ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona), usados no tratamento de LNH agressivos de imunofenótipo B, são considerados terapias padrão para os LCTP. No entanto, com notável exceção do LGCA/ALK+, os desfechos utilizando regimes baseados no

emprego de antraciclina têm sido uniformemente desapontadores (SAVAGE et al., 2007).

Um grande estudo com intergrupos estabeleceu o regime CHOP como sendo equivalente, mas com menor toxicidade do que regimes de segunda e terceira geração no tratamento de linfoma agressivo. Entretanto, esta pesquisa foi conduzida previamente ao uso rotineiro da imunofenotipagem para subclassificação destas neoplasias. Portanto, o impacto destes regimes específicos nos portadores de linfomas agressivos de imunofenótipo T não foi acessado (FISHER et al., 1993).

Assim, a prerrogativa do potencial benefício do emprego de agentes antracíclicos nos regimes poliquimioterápicos para tratamento dos LNH T agressivos foi extrapolado de dados aplicáveis a linfomas agressivos de imunofenótipo B. Desde esta análise, não tem sido conduzido estudo randomizado fase III comparando o esquema CHOP com regimes alternativos exclusivamente em LCTP, carecendo, então, de validação em coorte própria.

O pobre desfecho terapêutico dos LCTP parece decorrer de uma somatória de fatores adversos, como baixa resposta inicial ao tratamento, maior proporção de resistência terapêutica devido a expressão de proteínas que conferem resistência a múltiplas drogas (MDR), bem como a ocorrência de morte precoce durante o tratamento de primeira linha.

Além disso, há uma maior tendência a recidivas após se atingir a remissão completa, que ocorrem predominantemente nos primeiros dois anos de término do tratamento. Apesar de nunca ter sido estabelecido como regime mais efetivo para o tratamento de LCTP não ALK positivos, o regime CHOP permanece como o mais comumente usado no tratamento de primeira linha destas neoplasias.

A utilização de CHOP como terapia de primeira linha do LCTP/SOE foi avaliada em diversos estudos. De acordo com os principais resultados disponíveis, tal esquema promove taxa de RC de 50% e SG em cinco anos de 30% (MELNYK et al., 1997; GISSELBRECHT et al., 1998; LÓPEZ-GUILLERMO et al., 1998; SONNEN et al., 2005).

Estudos adicionais revelaram ainda maior risco de recidiva do que o observado para os linfomas B agressivos, de modo a contribuir para maior taxa de falência ao tratamento nos primeiros dois anos (GALLAMINI et al., 2004). Tais resultados levaram a investigação de estratégias abordando intensificação terapêutica, tanto com regimes quimioterápicos alternativos quanto com TCTH ou ambas.

Uma comparação retrospectiva entre CHOP e regimes mais intensivos conduzida no *M.D. Anderson Cancer Centre* não demonstrou diferença de desfecho entre estas abordagens, com SG em três anos de 62% versus 56%, respectivamente; e 43% versus 49%, após exclusão dos LGCA (ESCALON et al., 2005).

O *Group Quest Est d'Etude des Leucemies et Autres Maladies Du Sang* (GOELAMS) comparou o esquema intensificado VIP/ABVD (etoposídeo, ifosfamida, cisplatina, doxorubicina, bleomicina, vimblastina e dacarabazina) versus CHOP e novamente não se demonstrou diferença de SLP e SG nos LCTP (SIMON et al., 2010).

As séries de casos do *International T-cell Lymphoma Project* (ITCP) e da *British Columbia Cancer Agency* (BCCA) foram bastante úteis em revelar os desfechos esperados com poliquimioterapia CHOP no tratamento dos LCTP.

Segundo dados do ITCP, mais de 85% dos pacientes receberam terapia baseada no esquema CHOP e, em contraste ao LGCA/ALK+, onde a sobrevida livre de falência (SLF) em cinco anos foi de 60%, a SLF em cinco anos para LCTP/SOE, LCTA e LGCA/ALK- foi somente de 20%, 18% e 36%, respectivamente.

Desfechos similares foram observados na série da BCCA, com SLP em 5 anos de 29%, 13% e 28% para LCTP/SOE, LCTA e LGCA/ALK-, respectivamente (MOSKOWITZ et al., 2014).

Conclui-se, portanto, a partir dos dados apresentados, que a quimioterapia com esquema CHOP é adequada para fornecer respostas iniciais. Mas poucos pacientes atingem o RC ou respostas duradouras, embora os LGCA consistentemente apresentem melhores respostas que os LCTA e LCTP/SOE.

A intensificação do esquema CHOP, com adição de etoposídeo, tem demonstrado resultados discordantes. Sete grandes estudos conduzidos pelo *German Study Group* demonstraram que pacientes jovens com risco favorável apresentam SLP aumentada (71% versus 50%), com adição de etoposídeo ao CHOP, a cada 14 ou a cada 21 dias (SCHMITZ et al., 2010). Muitos pacientes nesta série, porém, eram portadores de LGCA. E quando se exclui os ALK positivos da análise, a diferença não demonstrou significância estatística.

O *Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte* (GELA), ao analisar portadores de todos linfomas de alto grau, demonstrou que o regime ACVBP (doxorrubicina, ciclofosfamida, vindesina, bleomicina e prednisona) apresentou resultados superiores ao esquema CHOP em pacientes acima de 60 anos. Porém, falhou em demonstrar benefício nos casos de pacientes mais jovens (TILLY et al., 2003).

Destaca-se, neste contexto, a observação do Grupo Italiano de Estudo de Linfomas (ITLP), em que a inclusão de antraciclina no regime terapêutico de pacientes portadores de LCTP não alterou o desfecho dos mesmos (VOSE et al., 2008). Especula-se que isto advenha em parte da elevada expressão de glicoproteína P nestas neoplasias, o que está associado com resistência a antracíclicos e agentes antitubulina, conferindo fenótipo multidroga resistente.

A maior parte dos dados publicados relacionados à quimioterapia alternativa ou intensificada em LCTP/SOE tem considerado a consolidação com auto-TCTH, o que torna a interpretação dos efeitos de esquemas quimioterápicos isolados bastante difícil (MERCADAL et al., 2008). Portanto, o tratamento primário de LCTP/SOE deve ser, preferencialmente, realizado no contexto de estudo clínico, pois a terapia padrão atual produz resultados desapontadores. Fora deste cenário, o esquema CHOP-símile permanece como terapia de escolha.

Quanto ao LCTA, sabe-se que raros casos podem envolver espontaneamente. Porém, usualmente, segue-se o curso clínico agressivo na maior parte dos pacientes. Ocasionalmente, pacientes assintomáticos poderão ser observados antes do início de quimioterapia sistêmica ou manejados com corticoterapia isolada.

Estes pacientes, habitualmente, apresentam recidivas precoces e falecem em decorrência de complicações infecciosas, o que torna difícil aplicação de regimes terapêuticos mais intensivos. Estudos demonstram eficácia de monoquimioterapia, bem como poliquimioterapia no tratamento de portadores de LCTA e demonstram que os regimes frequentemente empregados incluem CHOP, CVP (ciclofosfamida, vincristina e prednisona), VAP (vincristina, asparaginase e prednisona), esteroides com ou sem ciclofosfamida, metilprednisolona em altas doses ou o esquema IMVP-16 (ifosfamida, metotrexato e etoposídeo) (SIEGERT et al., 1992; GISSELBRECHT et al., 1998; LÓPEZ-GUILLERMO et al., 1998; PAUTIER et al., 1999; PELLATT et al., 2002).

Embora uma taxa de RC de 50% possa ser atingida com a quimioterapia combinada, as taxas de recidiva permanecem elevadas. De forma geral, a poliquimioterapia ocasiona resultados superiores em relação a esteroides isoladamente (PAUTIER et al., 1999).

Outras abordagens quimioterápicas utilizadas no LCTA incluem o emprego de baixas doses de metotrexato com corticoide (GERLANDO et al., 2000), fludarabina (HAST et al., 1999; TSATALAS et al., 2001), cladribina (SALLAH et al., 1999) e gemcitabina (SALLAH et al., 2001). Ressalta-se que a terapia de manutenção, após a indução de remissão com interferon- α , não tem demonstrado benefícios concretos (PAUTIER et al., 1999).

Alguns estudos limitados com utilização de ciclosporina demonstram resultados controversos (ADVANI et al., 2007). Talidomida e bevacizumab (antagonista de VEGF) tem sido empregados como agentes antiangiogênicos, com resultados promissores, quando utilizados isoladamente (ZHAO et al., 2004; DOGAN et al., 2005). Estudos adicionais, porém, fazem-se necessários.

A associação de CHOP em combinação com bevacizumab demonstrou alta taxa de cardiotoxicidade em linfomas agressivos de imunofenótipo B, levando à interrupção precoce de estudos usando esta associação.

De forma geral, os portadores de LCTA que requerem terapia deverão ser preferencialmente alistados em estudos clínicos. À parte deste cenário, os esquemas CHOP ou CHOEP têm sido considerados como esquemas de primeira escolha. Nos casos dos pacientes que obtêm RC ou RP a consolidação com TCTH autólogo deve ser indicada.

O LGCA/ALK+ é uma neoplasia altamente químio-sensível e com desfecho comparável ao LDGCB, seguindo uma terapia com antracíclicos. Estudos que tenham avaliado somente pacientes ALK+ são raros. A maior parte dos levantamentos prospectivos tem sido realizada em crianças. Baseado na análise de séries retrospectivas, poliquimioterapia contendo doxorubicina, particularmente o esquema

CHOP, é considerado como padrão, promovendo taxas de resposta global de 90% (FALLINI et al., 1999; SAVAGE et al., 2008).

Com esta estratégia, os LGCA/ALK+ exibem desfecho significativamente melhor que os LGCA/ALK-, com SG em cinco anos de 70%-80% e 33%-49%, respectivamente (STEIN et al., 2000; SAVAGE et al., 2008). Com base nestes dados, recomenda-se que pacientes adultos com LGCA/ALK+ devam ser tratados com quimioterapia CHOP-símile em primeira linha.

O LGCA/ALK- possui prognóstico intermediário entre LGCA/ALK+ e LCTP/SOE, com SG em cinco anos de 49%. Atualmente, o manejo terapêutico de indivíduos com esta doença é o mesmo utilizado para a variante ALK+. Mas, como o desfecho costuma ser pior, recomenda-se intensificação quimioterápica com etoposídeo e consolidação com TCTH (DEARDEN et al., 2011).

3.6.2 Radioterapia

De forma geral, a abordagem terapêutica dos LCTP não envolve o emprego de radioterapia. Esta modalidade terapêutica, vale destacar, é reservada a portadores de doença *bulky* ou massa residual ao término da quimioterapia, sem no entanto, haver estudos formais na literatura demonstrando claro benefício.

Uma exceção a esta regra é o LNH de células NK/T extranodal tipo nasal, onde a radioterapia parece ser a modalidade chave para o sucesso terapêutico deste grupo de doentes, com desfechos claramente mais favoráveis com regimes que incorporam radioterapia como estratégia terapêutica (CHEUNG et al., 2002; YOU et al., 2004).

Um estudo recente importante, que envolveu 105 pacientes chineses, com esta neoplasia em estágio localizado, demonstrou que pacientes tratados somente com radioterapia primária apresentavam SG em cinco anos equivalente a pacientes tratados

com modalidade combinada (66% versus 76%, respectivamente), sugerindo que a quimioterapia não ofereceria benefício adicional em suas formas precoces (LI et al., 2006).

Progressão frequente durante a quimioterapia baseada em agentes antracíclicos tem sido observada em vários estudos envolvendo LNH NK/T nasal, sugerindo resistência a estas drogas, relacionado à elevada expressão de glicoproteína P, nas células neoplásicas. Por este motivo, alguns grupos têm defendido o uso de radioterapia, associada ou não à quimioterapia, como terapia de escolha para este linfoma (YOU et al., 2004).

Os pacientes deverão ser irradiados com frações superiores a 5000-5500 cGy. Nos estágios avançados deve-se empregar poliquimioterapia. Os regimes que contêm asparaginase devem ser considerados no cenário de doença refratária ou recidivada (DEARDEN et al., 2011).

Outra exceção envolve o LGCA cutâneo primário, que possui história natural indolente e propensão à recidiva. A maior parte dos pacientes pode ser tratada com excisão cirúrgica, com ou sem radioterapia, reservando-se a quimioterapia sistêmica a pacientes com doença disseminada ou extracutânea (WILLEMZE et al., 2005).

3.6.3 Transplante de células tronco hematopoiéticas

Vários grupos têm analisado o papel da quimioterapia em altas doses, seguida por consolidação com TCTH autólogo no LCTP em primeira remissão completa ou parcial (MOUNIER et al., 2004; CORRADINI et al., 2006; FEYLER et al., 2007; RODRÍGUEZ et al., 2007).

Mounier et al. relataram resultados extraídos dos estudos GELA LNH 87 e 93, comparando quimioterapia intensificada isolada (esquema ACBVP) com terapia em

altas doses associada a resgate com TCTH. Eles observaram ausência de diferença estatisticamente significativa para SG e SLP em 29 portadores de LCTP não anaplásicos.

Um seguimento a longo prazo de estudo italiano que utilizou a quimioterapia sequencial em altas doses em LCTP demonstrou sobrevida global em doze anos de apenas 21% no grupo não ALK+, comparado a 62% nos ALK+ (CORRADINI et al., 2006).

A análise de intenção de tratamento deste estudo mostrou que somente 74% dos pacientes submeteram-se a TCTH devido à elevada incidência de progressão de doença durante o tratamento de primeira linha. A análise multivariada revelou que os pacientes que apresentavam RC, no momento do TCTH autólogo, apresentaram desfecho superior (CORRADINI et al., 2006; FEYLER et al., 2007).

Outro estudo envolvendo 74 pacientes portadores de LCTP transplantados em primeira remissão relatou taxas de SG e SLP em cinco anos de 68% e 63% respectivamente (RODRÍGUEZ et al., 2007). Entretanto, todos os pacientes que participaram do estudo estavam em remissão completa no momento do transplante. Além disso, o estudo incluiu 23 casos de LGCA com status ALK não informado, o que pode ter interferido no desfecho encontrado e um possível viés de seleção.

Um segundo estudo do mesmo grupo analisou desfechos em casos de alto risco definido pela exclusão das neoplasias ALK+ e doença localizada. De 26 pacientes avaliados, 19 responderam ao tratamento de indução ou ao resgate, e após o TCTH, 17 atingiram remissão completa.

Sendo assim, com base em intenção de tratamento, quimioterapia intensiva seguida por suporte com TCTH autólogo resultou em taxas de RC de 65% em

portadores de LCTP. SG e SLP em três anos foram de 73% e 53%, respectivamente (RODRÍGUEZ et al., 2007).

Reimer et al. (2009) publicaram resultados de estudo prospectivo multicêntrico utilizando TCTH autólogo em primeira linha em LCTP (83 casos incluindo 32 LCTP/SOE, 15 LGCA/ALK- e 27 LCTA). Entre todos os pacientes selecionados, somente 66% (55 casos) realizaram o transplante, sendo a progressão de doença durante tratamento quimioterápico de indução o principal motivo impeditivo de se realizar o procedimento. A SG e SLP em três anos foi de 48% e 36% respectivamente (REIMER et al., 2009). A SG em em três anos foi de 71% para o grupo que experimentou TCTH autólogo e de 11% nos pacientes que não realizaram o procedimento.

O maior estudo para avaliar o papel do TCTH autólogo em primeira linha em portadores de LCTP foi conduzido por d'Amore e cols. O estudo reuniu 160 pacientes com LCTP, incluindo 39% de LCTP/SOE, 19% de LGCA/ALK-, 19% de LCTA, excluindo os LGCA/ALK+.

A maioria dos pacientes (81%) apresentava doença avançada ao diagnóstico e 72% tinham IPI $\geq$ a 2. Os pacientes receberam CHOEP por seis ciclos, sendo o etoposídeo omitido em pacientes acima de 60 anos. Pacientes em RC ou RP receberam terapia com altas doses de carmustina, etoposídeo, citarabina e melfalano e resgate com células tronco hematopoiéticas autólogas.

Cento e quinze pacientes (71%) realizaram TCTH. SG e SLP em cinco anos foram de 51% e 44%, respectivamente. Os pacientes com LGCA/ALK-, particularmente, beneficiaram-se e obtiveram SG e SLP em cinco anos de 70% e 61%, respectivamente. SG e SLP em cinco anos para os LCTP/SOE foram 47% e 38%, respectivamente, e para os LCTA foram 52% e 49%, respectivamente (d'AMORE et al., 2012).

Conclui-se assim, que fora de estudo clínico, quimioterapia CHOP-símile permanece como terapia padrão para estas neoplasias e quando possível considerar consolidação com TCTH autólogo em primeira RC ou RP (DEARDEN et al., 2011, MOSKOWICZ et al., 2014).

Portadores de LCTP apresentando doença refratária ou recidivada e *performance status* aceitável deverão experimentar resgate quimioterápico, seguido por transplante de medula óssea autólogo ou alogênico (DEARDEN et al., 2011). Vários grupos têm relatado na literatura suas experiências com quimioterapia em altas doses e TCTH autólogo, como resgate para doença recidivada (BLYSTAD et al., 2001; SONG et al., 2003; KEWALRAMANI et al., 2006; SMITH et al., 2007).

Os principais estudos são de caráter retrospectivo e muitos incluem LGCA/ALK+, os quais, como anteriormente notado, apresentam melhor prognóstico que os demais subtipos histológicos. A eficácia global desta abordagem na doença não ALK+ foi desapontadora, com SG estimada em cinco anos inferior a 35% na maioria dos estudos (SONG et al., 2003; ZAMKOFF et al., 2004; KEWALRAMANI et al., 2006; SMITH et al., 2007).

A maior parte dos estudos retrospectivos de TCTH alogênico em linfoma recidivado ou refratário não tem analisado resultados para doenças de imunofenótipo T separadamente. Entretanto, um pequeno número de relatos tem sido publicado. A taxa de mortalidade relacionada ao procedimento para regimes de condicionamento mieloablativo tem sido muito elevadas, chegando a 30% a 50% dos casos (DHEDIN et al., 1999; LE GOUILL et al., 2008).

Esta toxicidade inaceitável estimulou o desenvolvimento de regimes de condicionamento de intensidade reduzida (CIR), os quais mantêm o efeito enxerto-

versus-linfoma, enquanto minimizam as toxicidades relacionadas ao regime quimioterápico.

Um estudo piloto de 17 pacientes incluiu nove casos de LCTP/SOE, quatro de LCTA e quatro de LGCA/ALK-, evidenciando mortalidade não relacionada a recidiva de apenas 6%, seguindo regime de condicionamento não mieloablativo que incorporava thiotepa, fludarabina e ciclofosfamida (CORRADINI et al., 2004).

Uma doença do enxerto versus hospedeiro grave aguda ou crônica foi relatada em somente três casos. Em seguimento médio de 28 meses, doze pacientes mantinham RC sustentada. Mais estudos adicionais de caráter prospectivo para se avaliar o valor do TCTH mini-alogênico em LCTP se fazem necessários para melhores conclusões.

Até o presente momento, no entanto, recomenda-se que a doença recidivada ou refratária deva ser manejada com poliquimioterapia, em esquema de resgate, com consolidação com TCTH mini-alogênico ou TCTH autólogo, se não realizado em primeira linha e com doença químio-sensível ou novas terapias experimentais, no contexto de estudos clínicos (DEARDEN et al., 2011).

Entre os portadores de LCTA, a consolidação com TCTH autólogo em RC em primeira linha ou em recidiva químio-sensível deve sempre ser considerada, caso o paciente tenha condições clínicas. Rodriguez et al. relataram que pacientes com LCTA com fatores prognósticos desfavoráveis ao diagnóstico apresentavam mais de 60% de SLD em três nos após TCTH autólogo.

Esta abordagem tem eficácia limitada para doença refratária ou em caso de infiltração persistente de medula óssea, ao término do tratamento de indução (SCHETELIG et al., 2003; RODRÍGUEZ et al., 2007; KYRIAKOU et al., 2008; MOURAD et al., 2008). O desfecho do aloenxerto em LCTA não tem sido acessado de forma separada na literatura, porém pode ser considerado em pacientes jovens, com

múltiplos fatores de prognóstico adverso no cenário de estudo clínico (DEARDEN et al., 2011).

Não estão disponíveis na literatura estudos das fases III, com abordagem sobre o papel do TCTH autólogo exclusivamente em portadores de LGCA ALK+. A despeito deste aspecto, o TCTH autólogo é recomendado como tratamento de salvamento em portadores de LGCA/ALK+ recidivados ou refratários. Principalmente, devido ao fato de que a maioria destes pacientes é jovem e apresenta boas condições clínicas.

Estudos retrospectivos apoiam o fato de que a taxa de resgate obtida com este procedimento apresenta SG de 80% em três anos (SONG et al., 2003; JAGASIA et al., 2004; RODRÍGUEZ et al., 2007). De forma geral os portadores de LGCA/ALK+ que são refratários primários a quimioterapia de indução ou que recidivam precocemente (< 12 meses) tem prognóstico mais adverso, com SLP em três anos de 28% em comparação a 68% para os pacientes com recidiva tardia.

3.6.4 Novas terapias

Para boa parcela de portadores de LCTP, as estratégias de tratamento atualmente disponíveis são altamente ineficazes e novas terapias promissoras têm sido exploradas. Dentre estas, a gemcitabina tem demonstrado ter uma atividade útil em portadores de LCTP recidivados, quando empregada como monoterapia. Atualmente, essa estratégia tem sido explorada em combinação com outros agentes quimioterápicos, no tratamento primários de LCTP (SALLAH et al., 2001).

O receptor de IL-2 (IL-2R) é um marcador de diferenciação linfóide T e a sua subunidade CD25 é expressa em um subgrupo de pacientes com LCTP/SOE e LGCA. A denileukin difitox é uma molécula de fusão de IL-2 à toxina diftérica e tem

demonstrado eficácia em pacientes com linfoma de células T cutâneos e LCTP recidivados (DANG et al., 2004).

Anticorpos direcionados contra subunidade CD25 (anticorpo humano anti TAC ou daclizumab) e a imunotoxina recombinante antiCD25 têm também sido avaliados como potenciais agentes terapêuticos.

Os inibidores de histona deacetilase constituem uma nova classe de agentes antineoplásicos, atualmente avaliados em estudos clínicos contra o câncer. A acetilação das histonas modula a expressão de genes, diferenciação celular, sobrevivência e é regulada pela atividade oposta de histonas acetiltransferases e histonas deacetilases.

A inibição de histonas deacetilases resulta no acúmulo nucleossomal de histonas acetiladas e induz diferenciação e/ou apoptose em células transformadas. O depsipeptide, um inibidor da acetilação de histonas, tem demonstrado atividade promissora em portadores de LCTP recidivados (PIERKAZ et al., 2005).

A imunoterapia tem emergido como importante adjunto terapêutico no manejo destas doenças. Alemtuzumab, um anticorpo monoclonal humanizado direcionado contra o antígeno CD52, presente na maioria das malignidades de células T, é um agente atrativo no manejo de portadores de LCTP.

A expressão disseminada de CD52 em linfócitos normais B e T, monócitos e macrófagos resulta em marcante imunossupressão e tem restringido sua combinação a poliquimioterapia convencional. Quando utilizado como monoterapia em pacientes previamente pesadamente pré-tratados a taxa de resposta global oferecida por este anticorpo monoclonal pode atingir 36% dos casos (ENBLAD et al., 2004). Destaca-se o fato de que até metade dos pacientes que realizam uso desta droga podem sofrer reativação de infecção citomegálica.

O antígeno CD30 é uniformemente expresso no LGCA e em um subgrupo de LCTP/SOE. Com expressão mínima nas células normais, destaca-se como alvo terapêutico ideal. Várias respostas objetivas têm sido relatadas em estudos de fase II e III empregando-se anticorpos monoclonais anti CD30, conjugado ao agente antitubulina monometil auristatina E (brentuximab vedotina).

Novos estudos em curso com estes agentes defendem potencial benefício aditivo, quando combinado a quimioterapia convencional, destacando-se respostas objetivas em até 86% dos pacientes e RC em até 57% dos casos (ADVANI et al., 2012).

Para os portadores de LGCA/ALK+, o inibidor do ALK crizotinib é um novo agente oral que parece ser ativo em portadores de doença recidivada. Um estudo recente de dois pacientes com doença recidivada relatou remissão completa em ambos com a utilização desta droga (GAMBACORTI-PASSERINI et al., 2011).

Um número de terapias alternativas pode ser empregado em portadores de LCTA. A presença de células linfoides B infectadas pelo EBV no tumor tem levado a estudos clínicos com emprego do anticorpo monoclonal anti CD20 rituximab. Um relato francês se mostrou inicialmente positivo, mas seguimento a longo prazo não encontrou benefício na adição de rituximab ao regime quimioterápico (JOLY et al., 2005; JOLY et al., 2010).

Relatos de remissão completa também têm sido descritos com utilização de agentes com ação imunomoduladora e antiangiogênica, tais como ciclosporina, lenalidomida e o anticorpo monoclonal anti-VEGF bevacizumab (AGUIAR-BUJANDA, 2008).

Para portadores de LCTP/SOE que apresentam falência a terapia primária, uma ampla variedade de novas drogas tem sido estudadas com resultados promissores. Destaque para o agente antifolato pralatrexato, o inibidor de histona deacetilase

romidepsina e agentes inibidores de aurora kinase (DUECK et al., 2010; O'CONNOR et al., 2011).

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Pacientes selecionados

Após aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa do HC-FMUSP e do ICESP (parecer consubstanciado número 97631, de 19-09-2012), foi realizado um estudo retrospectivo com portadores de LCTP predominantemente nodais, compreendendo as variantes histopatológicas LCTP/SOE, LCTA, LGCA/ALK+ e LGCA/ALK- tratados no Serviço de Hematologia do HC-FMUSP e ICESP-FMUSP.

Nesse trabalho, foram incluídos pacientes com idade maior ou igual a 16 anos, portadores de LCTP nodais diagnosticados no período compreendido entre janeiro de 2000 a dezembro de 2014, que tenham sido submetidos à poliquimioterapia com esquema CHOP ou CHOP-símile, com intuito curativo.

Optou-se por excluir do estudo os pacientes com doença linfoproliferativa pós-transplante de órgão sólido, cardiopatas com fração de ejeção inferior a 30% ou com fração de ejeção entre 30% e 50% e insuficiência cardíaca sintomática impeditiva ao uso de agentes antracíclicos.

Ainda foram excluídos portadores de doença linfoproliferativa de células T CD30 positivas primárias da pele, a exemplo da papulose linfomatoide e do LGCA primário cutâneo. Da mesma forma, pacientes com amostras parafinadas indisponíveis e/ou com prontuário médico não recuperado.

Os dados clínico-epidemiológicos, laboratoriais e imagenológicos foram recuperados, a partir da análise de prontuários médicos manuais ou informatizados. Foram compiladas características demográficas de idade ao diagnóstico, assim como sexo, variante histopatológica, *status* da doença no momento da avaliação interina e final de tratamento, data do diagnóstico, data da obtenção de remissão, óbito, progressão, recidiva e da última avaliação clínica disponível. Além disso, foram

catalogados o número de sítios extralinfonodais envolvidos, as variáveis componentes do IPI e do PIT, assim como estes respectivos índices.

4.2 Diagnóstico anatomopatológico

O diagnóstico de LCTP foi obtido a partir da análise morfológica das amostras de biópsia do tecido acometido. Inicialmente, realizou-se coloração de hematoxilina e eosina (H&E), a qual foi complementada com reações de imunohistoquímica com painel mínimo de anticorpos monoclonais direcionados aos antígenos linfoides B (CD20), T (CD3), Ki-1 (CD30) e o marcador de proliferação celular Ki-67.

Todas as amostras foram revisadas centralmente por dois hematopatologistas experientes do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e do Serviço de Anatomia Patológica da Divisão de Patologia do HC-FMUSP. Em todos os casos, levantou-se o laudo original emitido no momento de realização da biópsia diagnóstica. O mesmo foi comparado ao diagnóstico final obtido após revisão centralizada. Todos os casos foram categorizados em uma das seguintes quatro entidades: LCTP/SOE, LCTA, LGCA/ALK+ e LGCA/ALK-.

O diagnóstico de LCTA foi definido pela presença de infiltrado celular polimórfico, constituído predominantemente por células linfoides de pequeno a médio tamanho, poupando-se frequentemente o seio subcortical linfonodal. Foi necessário também identificar a expansão paracortical, onde visualizavam-se células grandes de morfologia imunoblasto-símile.

Além disso, havia proliferação vascular exacerbada, com vênulas de endotélio alto e disposição irregular das células dendríticas foliculares, acompanhando o trajeto dos vasos proliferados.

A partir da suspeita morfológica, sempre que possível, procedeu-se a complementação com imunohistoquímica adicional, direcionada contra os antígenos de linhagem T-helper folicular CD10, BCL-6, ICOS, PD-1 e CXCL-13, vasculares CD31 e CD34 e de células dendrítico foliculares (CDF) CD21, CD23 e CD35. Adicionalmente, realizou-se pesquisa do genoma do EBV por imunohistoquímica para LMP-1 ou hibridização *in situ* (EBER).

Definiu-se o diagnóstico de LGCA pela presença de infiltrado linfoide atípico composto habitualmente por células grandes anaplásicas denominadas “*hallmark cells*”. Estas células apresentavam núcleo polilobulado e padrão de infiltração sinusoidal, além de positividade universal para o antígeno CD30.

Mediante essa suspeita, realizava-se sempre que possível, complementação com os marcadores PAX-5 e CD15, com o propósito de estabelecer um diferencial com linfoma de Hodgkin clássico e ALK para a devida subcategorização em LGCA/ALK+ ou LGCA/ALK-.

Os casos remanescentes, sem critérios morfológicos ou imunohistoquímicos para nenhuma das entidades supracitadas e que habitualmente apresentavam infiltrado linfoide atípico de padrão difuso, com células de pequeno a moderado tamanho e que não se encaixavam em nenhuma entidade definida pela Classificação de Neoplasias Hematológicas da OMS, foram subcategorizados como LCTP/SOE.

Em alguns casos, para melhor categorização deste linfoma, foi realizada complementação imunohistoquímica utilizando-se os marcadores linfoides T associados CD2, CD4, CD5, CD7, CD8, TCR alpha/beta e TCR gamma/delta.

4.3 Reações de imunohistoquímica

Um estudo imunohistoquímico foi realizado nos cortes de amostras de biópsias linfonodais ou extralinfonodais fixadas em formalina e incluídas em parafina pelo Laboratório de Imunohistoquímica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os anticorpos utilizados para pesquisa das proteínas codificadas pelos genes de interesse incluíram o anti TOP2A (clone Ki-S1, Dako, Carpinteria, Califórnia, EUA), anti CCNA2 (clone 6E6, Abcam, Cambridge, Massachussets, EUA), anti VEGF (clone 5C3F8, Abcam, Cambridge, Massachussets, EUA), anti CHEK1 (clone DCS-310, Sigma-Aldrich, Heidenheim, Alemanha), anti NFkB1 (policlonal, Abcam, Cambridge, Massachussets, EUA) e anti IKBkB (clone 10A2C5B3, Thermo Scientific, Rockford, Illinois, EUA).

Utilizou-se como controle para padronizar as reações de imunohistoquímica e determinar a titulação dos anticorpos cortes de parênquima pulmonar saudável para o anticorpo anti VEGF, de adenocarcinoma ductal de mama para o anticorpo TOP2A e de amígdala para os anticorpos anti CCNA2, CHEK1, NFkB1 e IKBkB. Paralelamente, a titulação ideal dos anticorpos foi padronizada por meio de diluições seriadas em amostras adicionais de LCTP pertencentes à coorte do estudo.

As diluições finais foram de 1:4.000 para o anti TOP2A; 1:100, para antiCCNA2; 1:200.000, para antiCHEK1; e 1:3.500, para antiNFkB1. Embora tenham sido realizadas inúmeras tentativas, com diferentes titulações, não foi possível se estabelecer valor ótimo a fim de padronizar as reações imunohistoquímicas para os marcadores VEGF1 e IKBkB.

Os cortes de tecido linfonodal ou extralinfonodal de 5µm de espessura foram colocados em lâminas silanizadas (Sigma Chemical Co, St. Louis, Missouri, EUA) e em

suporte adequado. O processo de desparafinização foi feito pela exposição das lâminas ao xilol aquecido em estufa a temperatura de 60 – 65° C por 10 minutos, seguido de passagens rápidas em três banhos de xilol frio.

Para hidratação dos cortes, as lâminas foram colocadas em dois banhos de álcool absoluto, um banho de álcool a 95° C e outro de álcool a 70°C. Em seguida, foram lavadas em água corrente, em água deionizada e deixadas em tampão fosfato pH 7,4. O próximo passo foi a recuperação dos sítios antigênicos, realizada em alta temperatura com solução de ácido cítrico 10 mM pH 6,0 em panela (Pascal, Dakocytomation, Model:2800, EUA) à 121° C por 3 minutos sob a pressão de 25 mmHg.

O bloqueio da peroxidase endógena das hemácias foi realizado com peróxido de hidrogênio 10v (3%). O bloqueio das proteínas inespecíficas foi feito com diluente de anticorpos (Spring Bioscience, EUA). As lâminas foram então incubadas com os respectivos anticorpos primários anteriormente descritos por 24h a 4° C e, posteriormente, com o anticorpo secundário Novolink (Novolink Polymer, Leica Biosystems, EUA).

Para revelar a reação, utilizou-se o cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha). Ao final, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha) em todos os casos.

A leitura das reações de imunohistoquímica foi feita estimando-se cerca de 200 células por campo, em um total de vinte campos de 40x em microscópio óptico. Foi utilizada análise semiquantitativa por três observadores distintos, estabelecendo-se o valor de consenso para cada caso. A análise semiquantitativa foi padronizada em uma escala de percentual de células atípicas, que apresentavam expressão da proteína de interesse, graduando-se em intervalos de 10% (0% (totalmente negativo), 1 a 10%, 11% a 20%, 21% a 30%, etc...).

4.4 Estadiamento

Para estadiamento clínico dos pacientes, inicialmente foram realizados exames laboratoriais, incluindo hemograma completo, contagem de reticulócitos, bioquímica com eletrólitos, função renal, provas de avaliação hepática, dosagem sérica de ácido úrico, DHL e $\beta 2$ microglobulina. Sorologias para HIV, hepatites B e C e HTLV-I/II também foram efetuadas.

Todos os pacientes realizavam ecocardiograma transtorácico para quantificar a fração de ejeção cardíaca. Pacientes com insuficiência cardíaca sintomática ou fração de ejeção inferior a 30% receberam tratamento quimioterápico com esquemas sem agentes antracíclicos e foram excluídos do estudo. Aqueles com valor de fração de ejeção variando entre 30% a 50% e assintomáticos do ponto de vista cardiológico foram submetidos a tratamento quimioterápico habitual contendo antracíclicos. Eles foram monitorizados seriadamente, com ecocardiograma, a cada dois ciclos de quimioterapia e, em caso de queda igual ou superior a 10% do valor basal da fração de ejeção, a antraciclina era descontinuada.

Para acessar todas as áreas nodais e extralinfonodais envolvidas pela doença, realizou-se tomografia computadorizada de pescoço, tórax, abdômen e pelve, de acordo com o preconizado por Cheson et al. (2014). Tomografia por emissão de pósitrom, com 18Fluoro deoxiglicose (FDG-PET), foi efetuada em alguns casos. Porém, para efeito de estadiamento e para tentar homogeneizá-lo, foi utilizada a TC.

Caso houvesse envolvimento do anel de Waldeyer ou sintomas referentes ao envolvimento de trato gastrointestinal alto, realizava-se endoscopia digestiva. Biópsia de medula óssea unilateral foi realizada de rotina ao estadiamento de todos os casos, exceto naqueles de contraindicação, por condições clínicas do paciente.

A avaliação imagenológica de sistema nervoso central foi realizada por TC de crânio ou pela ressonância nuclear magnética em todos os pacientes que apresentavam sintomas clínicos neurológicos sugestivos de envolvimento pelo linfoma.

A punção líquórica com análise bioquímica e morfológica, incluindo citologia oncológica, foi realizada em pacientes com comprometimento de sítios e alto risco de disseminação para SNC, incluindo seios paranasais, anel de Waldeyer, massa tumoral paravertebral, envolvimento gonadal (testículos ou ovários), mamário, renal e adrenal.

Os pacientes foram estratificados em estágios clínicos I, II, III e IV, de acordo com os critérios propostos na conferência de Ann Arbor (CARBONE et al., 1971) (figura 6 e tabela 3). Considerou-se como doença *bulky* a presença de massa tumoral de tamanho igual ou superior a 10 cm. Pacientes com linfoma primário do trato gastrointestinal foram estadiados pelos critérios de Lugano (ROHATINER et al., 1994).

A presença de sintomas B foi definida mediante perda de peso superior a 10% do peso corpóreo basal, em período inferior ou igual a seis meses, febre persistente acima de 38°. C e/ou sudorese noturna recorrente (LISTER et al., 1989).

4.5 Tratamento

Os pacientes com LGCA/ALK+ foram tratados em períodos com seis a oito ciclos do protocolo quimioterápico CHOP (tabela 7), em intervalo de 21 dias. Os LGCA/ALK-, LCTA e LCTP/SOE foram tratados com seis a oito ciclos do protocolo CHOP ou CHOP-símile, preferencialmente o esquema CHOEP (tabela 8), em intervalo de 21 dias.

O protocolo CHOEP foi empregado em pacientes com idade inferior a 60 anos, com baixo índice de comorbidades e bom *performance status*, com etoposídeo na dose 100 mg/m² ao dia, por três dias consecutivos. Pacientes com idade superior a 60 anos,

índice de comorbidade desfavorável ou pobre *performance status* tiveram a dose de etoposídeo reduzida para 100 mg/m² somente no primeiro dia do tratamento.

Indivíduos com LGCA/ALK+ não foram consolidados com transplante de células tronco hematopoiéticas autólogas em primeira remissão completa. Esta terapia foi reservada apenas para recidiva, resposta parcial ou refratários primários, químio-sensíveis ao esquema quimioterápico de salvamento.

Os pacientes com LGCA/ALK-, LCTA e LCTP/SOE receberam TCTH autólogo de rotina como consolidação em RC ou RP, após quimioterapia de primeira linha, caso apresentassem idade inferior a 65 anos, baixo índice de comorbidade e bom *performance status*.

Para todos os subtipos histopatológicos de LCTP predominantemente nodais, quimioterapia citorredutora com ciclofosfamida 300 mg/m² no D1, vincristina 1 mg (dose fixa) no D1 e prednisona 60 mg/m² do D1 a D7, foi aplicada antes do primeiro ciclo de CHOP ou CHOP-símile. Isso se deu em pacientes com doença *bulky*, alto risco de síndrome de lise tumoral ou com estado funcional superior a dois pela escala ECOG ao diagnóstico.

A radioterapia de consolidação com 30 Gy a 40 Gy foi indicada em região de *bulky*, sítios extralinfonodais específicos como mamas, doença óssea localizada, massa paravertebral ou mediante massa residual ao término do tratamento quimioterápico.

Os pacientes refratários primários ou com recidiva precoce ou tardia foram tratados com protocolo de salvamento vigente no serviço e se químio-sensíveis submetidos a consolidação com TCTH autólogo.

O transplante de células tronco hematopoiéticas alogênico foi indicado em alguns pacientes com recidiva, após TCTH autólogo e quimiorrefratários aos esquemas iniciais ou de salvamento.

A profilaxia quimioterápica de sistema nervoso central foi empregada em pacientes com comprometimento extralinfonodal manifesto por massa de localização paravertebral, envolvimento gonadal (testículos ou ovários), seios da face, anel de Waldeyer, órbita e mamas ou doença óssea disseminada.

Assim se deu também nos casos com envolvimento de dois ou mais sítios extralinfonodais e IPI intermediário-alto ou de alto risco. A profilaxia envolveu quatro aplicações intratecais de 12 mg de metotrexato e 2 mg de dexametasona com intervalo de 21 dias associada a duas doses sequenciais de metotrexato sistêmico na dose de 3.000 mg/m² em intervalo de 21 dias após término do regime quimioterápico de indução.

Tabela 7. Protocolo CHOP

Fármaco	Dose mg/m ²	Via	Dias de aplicação
Ciclofosfamida	750	EV	D1
Doxorrubicina	50	EV	D1
Vincristina	1,4 (máximo 2 mg)	EV	D1
Prednisona	100 mg/dia	VO	D1 a D5

FONTE: Coiffier et al (2002). EV: via endovenosa. VO: via oral.

Tabela 8. Protocolo CHOEP

Fármaco	Dose mg/m ²	Via	Dias de aplicação
Ciclofosfamida	750	EV	D1
Doxorrubicina	50	EV	D1
Etoposídeo	100	EV	D1* ou D1 a D3**
Vincristina	1,4 (máximo 2mg)	EV	D1
Prednisona	100 mg/dia	VO	D1 a D5

FONTE: Coiffier et al (2002) – com adaptações. EV: via endovenosa. VO: via oral. *Para pacientes com idade superior a 60 anos, comorbidades relevantes ou pobre PS; **Para pacientes com idade inferior a 60 anos, sem comorbidades e bom PS.

4.6 Avaliação de resposta

A resposta à terapêutica foi avaliada, de acordo com os critérios propostos no *International Workshop to Standardize Response Criteria for Non-Hodgkin's Lymphomas* (CHESON et al., 1999; 2007; 2014) (Tabela 9).

Levou-se em consideração aspectos como a avaliação clínico-laboratorial, a radiológica com TC após o quarto ciclo e após término do tratamento. A biópsia de medula óssea foi repetida ao final do tratamento em pacientes que obtiveram remissão completa e apresentavam infiltração de medula óssea ao diagnóstico.

A programação de seguimento dos pacientes após término do tratamento incluía exames laboratoriais de rotina e visita médica, com exame físico completo a cada dois meses, no primeiro ano de remissão; a cada três meses, no segundo ano; a cada quatro meses, no terceiro ano; a cada seis meses, no quarto ano; e anuais a partir do quinto ano de remissão.

Tabela 9. Definições de resposta ao tratamento

Resposta e Local	Resposta baseada em PET/CT	Resposta baseada em TC
COMPLETA	Resposta metabólica completa (RMC):	Resposta radiológica completa:
Linfonodos e sítios extralinfonodais	Escore 1, 2 ou 3 com ou sem massa residual na escala de 5 P* Em anel de Waldeyer ou sítios extralinfonodais com alta captação fisiológica ou ativação esplênica ou medular pós-QT ou GSCF, a captação pode ser maior do que o mediastino ou hepática. Assim, considerar RMC se a captação em locais de envolvimento inicial não for maior que a do tecido circunjacente normal, ainda que o tecido normal tenha alta captação fisiológica	Linfonodos alvo e massas nodais devem regredir a tamanho $\leq 1,5$ cm Ausência de doença extranodal
Lesão não mensurável	Não aplicável	Ausente
Visceromegalia	Não aplicável	Regressão ao tamanho normal
Novas lesões	Nenhuma	Nenhuma
Medula óssea	Ausência de doença ávida ao FDG em MO	Morfologicamente normal; se indeterminada, IHC negativa
PARCIAL	Resposta metabólica parcial (RMP)	Remissão parcial (todas as seguintes):
Linfonodos e sítios extralinfonodais	Escore 4 ou 5 com redução da captação quando comparada à basal e massa residual de qualquer tamanho Se PET ínterim: achados indicativos de resposta ao tratamento Se PET final: achados indicativos de doença residual	Redução $\geq 50\%$ na SPD** dos 6 linfonodos mensuráveis alvo e sítios extralinfonodais Lesões muito pequenas para mensurar na TC, definir 5mm x 5mm como valor predeterminado Lesão não visível, 0 x 0 mm Para um linfonodo >5 mm x 5 mm, mas menor que o normal, usar a medida atual no cálculo Ausente/normal, regressão, mas sem aumento $>50\%$ regressão
Lesão não mensurável	Não aplicável	
Visceromegalia	Não aplicável	
Novas lesões	Nenhuma	Nenhuma
Medula óssea	Captação residual maior que a captação medular normal mas menor que a captação ao diagnóstico	Não aplicável

Continua

Continuação

Resposta e Local	Resposta baseada em PET/CT	Resposta baseada em TC
AUSÊNCIA DE RESPOSTA OU DOENÇA ESTÁVEL	Ausência de resposta metabólica	Doença estável
Linfonodos alvo/massas nodais e extralinfonodais	Escore 4 ou 5 sem mudança significativa na captação da PET ínterim ou final comparado à PET inicial	Redução $\geq 50\%$ na SPD** dos 6 linfonodos mensuráveis alvo e sítios extralinfonodais; ausência de progressão
Lesão não mensurável	Não aplicável	Ausência de progressão
Visceromegalia	Não aplicável	Ausência de progressão
Novas lesões	Nenhuma	Nenhuma
PROGRESSÃO	Doença metabólica progressiva	Doença progressiva (ao menos 1 critério):
Linfonodos alvo individuais/massas nodais	Escore 4 ou 5 com aumento na intensidade da captação do e/ou	Progressão no DP*** Um linfonodo/lesão individual com: DL**** $>1,5$ cm e Aumento $\geq 50\%$ no nadir do DP e Aumento no DL e DC***** do nadir 0,5 cm para lesões ≤ 2 cm 1,0 cm para lesões >2 cm Se esplenomegalia progressiva, aumento $\geq 50\%$ na extensão do aumento inicial. Na ausência de esplenomegalia, aumento de 2 cm do basal. Esplenomegalia nova ou recorrente
Sítios extralinfonodais		Nova lesão ou progressão inequívoca de lesões progressivas não mensuráveis
Lesão não mensurável	Nenhuma	Progressão de lesões previamente resolvidas
Novas lesões	Nova captação de FDG consistente com linfoma e não outra causa (infecção, inflamação). Se duvidosa, biopsiar ou repetir PET/CT	Novo linfonodo $>1,5$ cm em qualquer eixo Novo sítio extralinfonodal $>1,0$ cm em qualquer eixo; se $<1,0$ cm deve ser de forma inequívoca atribuída ao linfoma Qualquer tamanho de doença inequivocamente atribuída ao linfoma
Medula óssea	Captação nova ou recorrente	Envolvimento novo/recorrente

FONTE: Cheson et AL (2014). *PET: Tomografia com emissão de pósitrons, TC: tomografia computadorizada, RMC: resposta metabólica completa, RMP: resposta metabólica parcial, QT: quimioterapia, GCSF: fator estimulador de colônias de granulócitos, FDG: fluoro-deoxi-glicose, MO: medula óssea, IMQ: imunohistoquímica, SPD: soma do produto dos diâmetros, DP: diâmetro perpendicular, DL: diâmetro mais longo; DC: diâmetro mais curto.

4.7 Método molecular

4.7.1 Extração de RNA

O processo de extração de RNA das amostras fixadas em formol e incluídas em parafina (FFPE) foi realizado no Laboratório de Genética e Hematologia Molecular – LIM 31 do HC-FMUSP.

O RNA foi extraído a partir de cortes de amostras de biópsias de linfonodo FFPE de 5 µm de espessura, colocadas em tubos de 1,7 ml, por meio do *kit RNeasy FFPE* (Qiagen, Inc, EUA).

Em cada tubo, colocou-se 1,5 ml do reagente xilol a 100% para a desparafinização. Os tubos foram agitados em vórtex vigorosamente por 10 segundos, incubados a 37° C por dez minutos e em seguida procedeu-se a centrifugação a 20.000 x g por dois minutos, em temperatura ambiente, para obtenção de botão celular.

Posteriormente, removeu-se o sobrenadante por pipetagem cuidadosa, para não haver remoção do botão celular. Em seguida, as células foram lavadas com 1,5 ml de etanol a 100%, nova agitação em vórtex por mais 10 segundos, centrifugação a 20.000 x g por dois minutos, em temperatura ambiente, com posterior remoção do sobrenadante. Este procedimento foi realizado mais uma vez. Subsequentemente as células foram incubadas por dez minutos, em temperatura ambiente, até a evaporação total do etanol residual.

Em seguida, as células foram ressuspensas em 150 µL de tampão PKD, com adição de 10 µL de proteinase K. A amostra foi, então, incubada a 55° C, por quinze minutos e, imediatamente, após a 80° C por mais quinze minutos. Adicionou-se 320 µL do tampão RBC, para ajuste das condições de ligação.

O lisado foi posteriormente misturado e transferido para coluna eliminadora de gDNA e centrifugado por trinta segundos a 8000 x g. Em seguida, descartou-se a

coluna, adicionou-se 720 μL de etanol a 100% e transferiu-se imediatamente 700 μL da amostra para a coluna *MinElute ENeasy*.

Ocluiu-se a tampa do tubo, centrifugou-se por mais quinze segundos, a 8000 x g, descartando-se o sobrenadante. Adicionou-se 500 μL do tampão RPE à coluna *MinElute ENeasy*, fechando-se delicadamente a tampa, centrifugou-se por quinze segundos, a 8000 x g, descartando-se o líquido.

Adicionou-se mais 500 μL do tampão RPE à coluna *MinElute ENeasy*, ocluiu-se a tampa e centrifugou-se por mais quinze segundos, a 8000 x g, com novo descarte do líquido. Em seguida, transferiu-se a coluna *MinElute ENeasy* para um novo tubo coletor de 2 ml, o qual foi centrifugado com a tampa aberta por cinco minutos, à velocidade de 20.000 x g.

Em seguida, descartou-se o tubo coletor e transferiu-se a coluna *MinElute ENeasy* para outro tubo, agora de 1,7 ml. Adicionou-se, então, 30 μL de água livre de RNase à coluna e centrifugou-se por um minuto, à velocidade de 20.000 x g. Ao final da eluição, obteve-se o RNA, o qual foi estocado em temperatura igual ou inferior a -20°C até o momento do uso.

A concentração de RNA de cada amostra foi obtida utilizando-se o NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 e sua integridade analisada no RNA Nano Chip 2100 Bioanalyzer da Agilent.

4.7.2 Preparação do cDNA

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de 1 μg do RNA total, obtido conforme descrito anteriormente. A preparação foi realizada segundo as orientações do fabricante Thermo Fisher para o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*. O cDNA foi obtido em volume final da reação de 20 μL contendo

1 µg de RNA total, 0.8 µL de 25 X dNTP Mix (100 mM), 2.0 µL de RT Buffer (10 X tampão de reação), 2 µL de RT Random Primers (10 X), 1 µL MultiScribe Reverse Transcriptase (transcriptase reversa) e H₂O tratada com dietilpirocarbonato para completar o volume final de 20 µL.

As amostras foram submetidas às temperaturas de 25° C, por dez minutos, 37° C por 120 minutos; e de 85° C, por cinco minutos, no termociclador *Veriti Thermo Cycler* da *Thermo Fisher* para obtenção do cDNA.

4.7.3 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

A qRT-PCR foi realizada com o sistema *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e sua análise executada no equipamento 7500 FAST Real Time PCR Systems da Thermo Fisher. Os valores quantitativos relativos foram obtidos a partir do ciclo limiar (*cycle threshold* [Ct]) – ponto no qual a elevação do sinal fluorescente corresponde ao crescimento exponencial dos produtos da PCR. As curvas de eficiência e quantificação para os genes *CCNA2*, *TOP2A*, *VEGF*, *CHEK1*, *NFκB1* e *IKBkB* foram realizadas a partir de diluições seriadas. Utilizou-se, como controle endógeno, o gene *GUSB*. A quantificação relativa baseou-se na construção de curva padrão (figura 10), com quantidades conhecidas do cDNA do gene de interesse, diluídos dez vezes por três vezes, totalizando-se quatro pontos na curva.

Assim, foi possível saber a quantidade de gene expressa em cada amostra pela plotagem em gráfico do número de ciclos necessários para amplificação *versus* a quantidade correspondente na curva padrão. A água sempre foi utilizada como controle negativo.

Por último, os níveis relativos de expressão dos genes *TOP2A*, *CCNA2*, *CHEK1*, *VEGF1*, *NFkB1* e *IKBkB* foram normalizados em relação ao mRNA do gene endógeno *GUSB*.

Tabela 10. Eficiências dos genes avaliados

Genes	R2	Eficiência (%)
CCNA2	0,99	98,72
TOP2A	0,98	99,12
CHEK1	0,99	104,7
NFKB1	0,99	93,63
IKBKB	0,99	95,00
GUSB	0,99	99,94

Figura 10. Curvas de padronização da reação de PCR em tempo real. A: *CCNA2*, B: *TOP2A*, C: *CHEK1*, D: *NFkB1*, E: *IKBkB*, F: *GUSB*.

4.7.4 Extração de DNA

O DNA foi extraído de cortes de biópsias de linfonodo FFPE de 5 µm de espessura, colocados em tubos cônico de 1,7 mL. A estes tubos foi adicionado 1 ml de xilol a 100%, para desparafinização da amostra. Estes foram homogeneizados em agitador e centrifugados a 7.600 x g.

Em seguida, a amostra foi aquecida a 50° C por três minutos para derreter a parafina e, em seguida, centrifugada novamente por dois minutos, a uma temperatura ambiente e em velocidade máxima, para se obter agregado celular visível no fundo do tubo. Subsequentemente, removeu-se o xilol e lavou-se o agregado celular por duas vezes, com 1000 µL de etanol 100%.

Procedeu-se a nova centrifugação a vácuo e à TA por 20 minutos para secar o botão celular. Adicionou-se ao agregado celular 500 µL de TEN, 5 µl de SDS 10% e 3 µl de proteinase K. Com isso, homogeneizou-se a amostra e procedeu-se a incubação a 56° C, durante 48 horas. Em seguida, foi acrescentado 150 µL de NaCl 5M à amostra e agitou-se o conteúdo vigorosamente por 15 segundos.

A amostra foi centrifugada a 2.600 x g a 20° C por dez minutos. Posteriormente, transferiu-se o sobrenadante para outro tubo de 1,7 ml contendo 600 µL de isopropanol (C₃H₈O) e foi invertido o tubo várias vezes, até se chegar à precipitação do DNA.

Realizou-se, então, procedimento de lavagem por centrifugação da amostra a 15.000 x g a 4°C durante dez minutos e, em seguida, o sobrenadante foi desprezado, invertendo-se o tubo uma única vez. Posteriormente, o botão celular foi lavado com 1 ml de etanol 70%, seguindo-se de centrifugação a 2.600 x g a 20°C por cinco minutos.

Estas últimas etapas foram repetidas três vezes consecutivas em um total de quatro lavagens. Procedeu-se, então, à secagem do agregado celular a vácuo por vinte minutos, o qual foi dissolvido com 20 µL de tampão TE.

Após armazenagem em geladeira a 4°C, realizou-se a aplicação da amostra em gel de agarose 0,8% para verificar a qualidade e a quantidade de DNA. A concentração de DNA foi obtida a partir do uso do NanoDrop Spectrophotometer ND-1000.

4.7.5 Metilação das regiões promotoras do DNA dos genes *p15INK4b* e *p16INK4a*

O estudo de metilação das regiões promotoras do DNA dos genes supressores tumorais *p15INK4b* e *p16INK4a* foi realizado por PCR, por meio do kit EZ DNA Methylation-Direct™ da Zymo Research Corporation (Foster City, California, EUA), seguindo-se orientações do fabricante.

4.7.5.1 Digestão da amostra com solução proteinase K

O procedimento de digestão consistiu na adição de 13 µL do tampão de digestão-M (2X) até 12 µl de DNA, 1 µL de proteinase K e volume suficiente de H₂O para completar um volume total de reação, o qual foi de 26 µL.

Posteriormente, a amostra foi incubada a 50°C, por quatro horas, com posterior homogeneização cuidadosa dos componentes da reação, seguida de centrifugação por cinco minutos, a 10.000 x g. Subsequentemente, separou-se 20 µL do sobrenadante para a reação de conversão com bissulfito conforme detalhado a seguir.

4.7.5.2 Tratamento do DNA com bissulfito de sódio

Adicionou-se 20 µL da amostra obtida, conforme descrito anteriormente, a 130 µL da solução Reagente de Conversão CT em tubo cônico de 0,5 ml. A amostra foi homogeneizada e centrifugada brevemente para garantir que nenhuma gotícula permanecesse na tampa ou nas laterais do tubo.

Em seguida, colocou-se os tubos contendo a amostra e o reagente de conversão no termociclador para realizar as etapas de 98°C por oito minutos, 64°C por três horas e meia e estocagem a 4°C por até 20 horas. Depois, adicionou-se 600 µL do tampão de Ligação-M em coluna Zymo-SpinTM IC, a qual foi conectada a um tubo coletor.

A amostra, então, foi colocada na coluna Zymo-SpinTM IC contendo o tampão de ligação M, homogeneizando-se seu conteúdo por várias inversões da coluna, seguido por centrifugação em velocidade máxima por trinta segundos e descarte do sobrenadante.

Adicionou-se 100 µL do tampão de Lavagem-M à coluna, com posterior centrifugação por 30 segundos. Em seguida, juntou-se mais 200 µL do tampão de Dessulfonação-M à coluna, deixando-a em repouso à TA por quinze minutos, com subsequente centrifugação à velocidade máxima por trinta segundos.

Outra vez, foram adicionados 200 µL do tampão de Lavagem-M à coluna, seguido por mais duas rápidas centrifugações. A coluna foi transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, adicionando-se 10 µL do tampão de Eluição-M diretamente à matriz da coluna.

Por fim, após outra centrifugação breve, à velocidade máxima, obteve-se o DNA genômico eluído para uso na reação de PCR.

4.7.5.3 Análise de metilação

Nesse processo, o DNA modificado por bissulfito de sódio foi amplificado, conforme descrito previamente por Garcia et al., 2002, utilizando-se os primers descritos na tabela 11.

Tabela 11. Primers utilizados para análise de metilação do genes *p15INK* e *p16INK*

Gene	Primers
<i>p16INK4a</i>	p16M S - TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC
	p16M AS - GACCCCGAACCGCGACCGTAA
	p16U S - TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT
	p16U AS - CAACCCCAAACCACAACCATAA
<i>p15INK4b</i>	p15M S - GCGTTCGTATTTTGCGGTT
	p15M AS - CGTACAATAACCGAACGACCGA
	p15U S - TGTGATGTGTTTGTATTTTGTGGTT
	p15U AS - CCATACAATAACCAAACAACCAA

O PCR dos primers p16M e p16U foi realizado nas mesmas condições. No mix de PCR, havia 1 X PCR tampão (10 mmol/L Tris-HCL, pH 8,3 e 50 mmol/L KCl), 1 mmol/L de MgCl₂, 200 µmol/L de cada dNTP, 30 pmol de cada primer, 1 U de TaqDNA polimerase e 250 ng de DNA modificado em reação de 50µL.

As reações foram efetuadas a 94°C por dez minutos; 40 ciclos, a 94°C por trinta segundos; a 63°C, por trinta segundos; e a 72°C, por trinta segundos; e por cinco minutos, a 72°. C, para extensão final do DNA.

A PCR para o gene *p15* foi processada nas mesmas condições anteriormente descritas. Porém, com temperatura de anelamento de 61°C. Foram utilizadas as linhagens celulares RAJI, KG1 e HL60 como controle de amplificação, conforme demonstrado na tabela 12, para interpretação do padrão de metilação do DNA das amostras selecionadas.

Tabela 12. Linhagens celulares utilizadas como controle de amplificação para reação de metilação

Linhagem celular	p16M	p16U	p15M	p15U
RAJI	Positivo	negativo		
KG1		negativo	positivo	
HL60			negativo	positivo

4.8 Análise estatística

As variáveis quantitativas podem ser discretas, quando determinadas por números inteiros, ou contínuas, cujos dados podem apresentar qualquer valor de variação em escala numérica infinita. As variáveis categóricas ou qualitativas não são quantificáveis e, sim, medidas por meio de sua classificação em categorias (HULLEY et al., 2008).

No presente estudo, trabalhou-se com variáveis quantitativas contínuas (exemplo: expressão dos genes *CCNA2*, *TOP2A*, *CHEK1*, *NFκB*, *IKBκB* etc.) e com variáveis qualitativas categóricas (exemplo: sexo, estágio clínico, variante histopatológica, etc.). Algumas variáveis contínuas como idade e expressão gênica foram transformadas em categóricas a exemplo da idade inferior a 60 anos ou maior ou igual a 60 anos, expressão de *CCNA2* menor que a mediana e maior ou igual à mediana.

A análise univariada para medir associação entre as variáveis categóricas foi realizada pelo teste do Qui-Quadrado de Mantel-Haenszel (mhodds). A análise univariada de Cox foi aplicada para estimar a associação de variáveis categóricas ou contínuas, com as curvas de sobrevida.

O teste de log-rank foi utilizado para comparar as curvas de sobrevida e para determinar a associação entre variáveis categóricas e curvas de sobrevida (SCHOENFELD, 1981).

As variáveis que são estatisticamente significantes nas análises univariadas foram submetidas posteriormente à análise multivariada pelo modelo de riscos proporcionais de Cox *stepwise backward selection* para definição das variáveis independentes.

Para determinar o melhor ponto de corte de positividade da expressão proteica dos genes de interesse por imunohistoquímica, utilizou-se estimativa de sensibilidade e especificidade nos *cut offs* de 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80% e 90% por curvas de ROC (*receiver operator characteristic curve*).

Além disso, as variáveis consideradas importantes pelos investigadores que desenvolveram este estudo foram submetidas à análise multivariada pelo modelo de riscos proporcionais de Cox *stepwise backward selection* para definição de variáveis de significado independentes.

A definição de resposta completa, parcial, doença estável e progressão ou refratariedade foi baseada nos critérios do *International Workshop to Standardize Response Criteria for Non-Hodgkin's Lymphomas* (CHESON et al, 1999; 2007; 2014).

As curvas de sobrevida global, sobrevida livre de progressão e sobrevida livre de doença foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier. A sobrevida global foi definida como o intervalo entre a data do diagnóstico e a data do último seguimento ou óbito, considerando-se como evento o óbito.

A sobrevida livre de doença foi definida como o intervalo entre a data da remissão completa e a data da recidiva, último seguimento ou óbito, considerando-se evento a recidiva precoce ou tardia.

A sobrevida livre de progressão foi calculada como o tempo transcorrido entre o diagnóstico e o momento da progressão, recidiva, o último seguimento ou óbito, considerando-se como evento progressão de doença ou recidiva.

O estudo de clusterização gênica foi realizado a partir da diferença da mediana de expressão dos genes em função das quatro variantes histopatológicas de LCTP nodais estudadas. Utilizou-se nesta oportunidade o teste de associação de Tamhane, com validação pelos métodos de Games-Howell, Dunnett C e Dunnett T3.

A análise estatística foi elaborada no *software* STATA 12.0, aceitando-se como estatisticamente significativo valor de p igual ou inferior a 0,05.

5. RESULTADOS

5.1 Casuística

Inicialmente 94 pacientes com LCTP predominantemente nodais foram selecionados para o estudo. Destes, 7/94 (7,5%) foram excluídos após revisão de prontuário médico, quatro dos quais, por falta de informações adequadas. Dois pacientes foram excluídos pois foram reclassificados em LGCA cutâneo primário e outro por tratar-se de leucemia/linfoma de células T do adulto.

Portanto, os dados clínico-epidemiológicos foram avaliáveis em 87/94 (92,5%) pacientes. Destes, 24/87 (27,5%) foram excluídos devido à impossibilidade de recuperação dos blocos de parafina das amostras tumorais e/ou por falha na extração do RNA ou amplificação do cDNA (figura 11). Sendo assim, 63/87 (72,5%) pacientes foram avaliáveis para estudo de expressão gênica.

Quatro casos adicionais foram excluídos devido à falha de extração ou de amplificação do DNA para análise de metilação dos genes *p15* e *p16*. Portanto, 59/87 (67,8%) pacientes foram avaliáveis para este estudo. Finalmente, para as reações de imunohistoquímica foram excluídos mais cinco casos devido ao esgotamento dos blocos de parafina ou pela falta de representatividade de tecido neoplásico na amostra residual.

Portanto, a análise imunohistoquímica foi executada em 54/87 (62%) casos de LCTP nodais. A análise de todas as variáveis clínicas, metilação, expressão gênica e proteica foi possível de ser realizada em 50 pacientes. A Tabela 13 disponibiliza as características clínico-laboratoriais dos 24 pacientes excluídos por ausência de obtenção ou amplificação de RNA. Entre os casos excluídos havia maior número de pacientes com idade superior a 60 anos e com doença localizada apresentando estágio clínico I e II.

Figura 11. Casuística

Tabela 13. Características clínicas dos pacientes com LCTP nodais excluídos por falha de extração de RNA

Características	Total N (%)	Excluídos N (%)	(p-value)
Sexo			
Feminino	35 (40,2)	8 (33,3)	0,42
Masculino	52 (59,8)	16 (66,7)	
Mediana idade (anos)	49 (14-84)	57 (14-84)	0,0119
>60 anos	26 (29,9)	12 (50,0)	
Variante histológica			
LGCA/ALK+	18 (20,7)	4 (16,7)	0,4713
LGCA/ALK-	29 (33,3)	11 (45,8)	
LCTP/SOE	30 (34,5)	8 (33,3)	
LCTA	10 (11,5)	1 (04,2)	
DHL aumentado	53 (60,9)	11 (45,8)	0,0768
ECOG ≥ 2	53 (60,9)	13 (54,2)	0,4283
Medula Óssea			
Positiva	10 (11,5)	2 (08,3)	0,5823
Negativa	67 (70,0)	19 (79,2)	
Não disponível	10 (11,5)	3 (12,5)	
Sítios extranodais ≥ 2	38 (43,7)	11 (45,8)	0,8036
<i>Bulky</i>	35 (40,2)	11 (45,8)	0,5131
EC Ann Arbor			
Localizado (I ou II)	22 (25,3)	10 (41,7)	0,0310
Avançado (III ou IV)	65 (74,7)	14 (58,3)	0,0697
Avançados e/ou Bulky	80 (92,0)	20 (83,3)	
IPI			
Baixo	18 (20,7)	5 (20,8)	0,3516
Intermediário-baixo	16 (18,4)	5 (20,8)	
Intermediário-alto	25 (28,7)	10 (41,7)	
Alto	28 (32,2)	4 (16,7)	
IPI adaptado			
Baixo (BR+IB)	34 (39,1)	10 (41,7)	0,7616
Alto (IA+AR)	53 (60,9)	14 (58,3)	
IPI-T	(N=77) ¹	(N=21) ¹	0,7320
Baixo	13 (16,9)	3 (14,3)	
Intermediário baixo	18 (23,4)	6 (28,6)	
Intermediário alto	34 (44,2)	10 (47,6)	
Alto risco	12 (15,6)	2 (09,5)	

Continua

Continuação			
Características	Total N (%)	Excluídos N (%)	(p-value)
IPI-T	(N=85) ²	(N=23) ²	
Baixo (BR+IB)	31 (36,5)	9 (39,1)	0,7577
Alto (IA+AR)	54 (63,5)	14 (60,9)	
Consolidação com RDT	26 (29,9)	9 (37,5)	0,3410
Status da doença no último seguimento			0,6635
RC	36 (41,4)	11 (45,8)	0,60
RP	05 (05,7)	1 (04,2)	0,69
Progressão e/ou óbito	46 (52,9)	12 (50,0)	0,74
Consolidação com TCTH	29 (33,3)	7 (29,2)	0,6129
Protocolo de tratamento			0,6006
CHOP	45 (51,7)	13 (54,2)	0,77
CHOEP	19 (21,8)	4 (16,7)	0,47
Outros	13 (14,9)	2 (08,3)	0,28
Não tratou	10 (0,11)	5 (20,8)	0,09
Causa de óbito	46 (52,9)	12 (50,0)	0,74
Progressão	26 (56,5) ⁴	4 (33,3) ⁴	0,09
Infecção	24 (52,2) ⁴	9 (75,0) ⁴	0,20
2 ^a neoplasia ³	04 (08,7) ⁴	0 (00,0) ⁴	0,20

1- Excluídos 10 e 3 pacientes, respectivamente por ausência de biópsia de medula óssea (BMO); 2- Dos 10 pacientes com BMO não avaliável, 8 já apresentavam IPI-T adaptado de alto risco assim o N utilizado foi 85. O mesmo foi considerado para análise de subgrupos; 3- Dois casos de leucemia mieloide aguda e dois de tumor sólido; 4- Percentual calculado entre os óbitos – quanto às causas de óbito considerado sobreposição de causas em alguns pacientes; LGCA/ALK+: linfoma de grandes células anaplásicas, quinase do linfoma anaplásico positivo; LGCA/ALK-: linfoma de grandes células anaplásicas quinase do linfoma anaplásico negativo; LCTP/SOE: linfoma de células T periféricas sem outras especificações; LCTA: linfoma de células T angioimunoblástico; DHL: desidrogenase láctica; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; IPI: Índice prognóstico internacional; IPI-T: Índice prognóstico internacional para linfomas T; BR: baixo risco, IB: intermediário-baixo; IA: intermediário-alto; AR: alto risco; RDT: radioterapia; RC: remissão completa; RP: resposta parcial; TCTH: transplante de células tronco hematopoiéticas autólogas; CHOP: ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona; CHOEP: ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina, etoposídeo e prednisona.

5.2 Características clínicas e laboratoriais

5.2.1 Características clínicas e laboratoriais da coorte de LCTP nodais avaliada

As características clínico-laboratoriais dos 63 pacientes avaliáveis estão disponibilizadas na Tabela 14. A mediana de idade foi de 47 anos (18-61 anos) e 36/63 (57%) pacientes foram do sexo masculino. Observamos predomínio da variante histopatológica LCTP/SOE 22/63 (34,9%), seguido de LGCA/ALK- 18/63 (28,6%), LGCA/ALK+ 14/63 (22,2%) e LCTA 9/63 (14,3%), conforme demonstrado no gráfico 2.

Comprometimento extralinfonodal igual ou superior a dois sítios foi encontrado em 27/63 (43%) dos pacientes. A pele foi o sítio extralinfonodal mais frequentemente comprometido, seguido pela medula óssea e trato gastrointestinal (gráfico 3). O envolvimento de medula óssea foi encontrado em 12,7% (8/63) dos pacientes.

DHL superior ao valor de referência (480 U/L) ocorreu em 42/63 (67%) pacientes, e massa *bulky* em 30% (24/63) dos casos. A maioria dos pacientes 40/63 (60,9%) apresentou estado funcional pelo ECOG igual ou superior a dois. Quanto ao estágio clínico, a maioria dos casos 51/63 (81%) apresentou doença avançada (estádios III ou IV).

IPI de baixo risco ocorreu em 13/63 (20,6%) pacientes, intermediário-baixo em 11/63 (17,5%), intermediário-alto em 15/63 (23,8%) e alto risco em 24/63 (38,1%) . O IPI-T calculado em 56/63 pacientes demonstrou 17,9% (10/56) de baixo risco, 21,4% (12/56) intermediário-baixo, 42,9% (24/56) intermediário-alto e 17,9% (10/56) de alto risco.

Tabela 14. Características dos pacientes com LCTP incluídos no estudo

Características	Total 87 N (%)	Incluídos 63 N (%)
Sexo		
Feminino	35 (40,2)	27 (42,9)
Masculino	52 (59,8)	36 (57,1)
Mediana idade (anos)	49 (14-84)	47 (16-81)
>60 anos	26 (29,9)	14 (22,2)
Variante histopatológica		
LGCA/ALK+	18 (20,7)	14 (22,2)
LGCA/ALK-	29 (33,3)	18 (28,6)
LCTP/SOE	30 (34,5)	22 (34,9)
LCTA	10 (11,5)	09 (14,3)
DHL aumentado	53 (60,9)	42 (66,7)
ECOG ≥ 2	53 (60,9)	40 (60,9)
Medula óssea		
Positiva	10 (11,5)	08 (12,7)
Negativa	67 (70,0)	48 (76,9)
Não avaliada	10 (11,5)	07 (11,1)
Sítios extranodais ≥ 2	38 (43,7)	27 (42,9)
Bulky	35 (40,2)	24 (30,1)
EC Ann Arbor		
Localizado (I ou II)	22 (25,3)	12 (19,0)
Avançado (III ou IV)	65 (74,7)	51 (81,0)
Avançado e/ou bulky	80 (92,0)	60 (95,2)
IPI		
Baixo	18 (20,7)	13 (20,6)
Intermediário-baixo	16 (18,4)	11 (17,5)
Intermediário-alto	25 (28,7)	15 (23,8)
Alto	28 (32,2)	24 (38,1)
IPI adaptado		
Baixo (IPI BR + IB)	34 (39,1)	24 (38,1)
Alto (IPI IA + AR)	53 (60,9)	39 (61,9)
IPI-T	(N=77) ¹	(N=56) ¹
Baixo	13 (16,9)	10 (17,9)
Intermediário-baixo	18 (23,4)	12 (21,4)
Intermediário-alto	34 (44,2)	24 (42,9)
Alto	12 (15,6)	10 (17,9)
IPI-T adaptado	(N=85) ²	(N=56) ²
Baixo (IPI BR + IB)	31 (36,5)	29 (51,8)
Alto (IPI IA + AR)	54 (53,5)	34 (60,7)
Consolidação com RDT	26 (29,9)	17 (27,0)
Status da doença no último seguimento		
RC	36 (41,4)	25 (39,7)
RP	05 (05,7)	04 (06,3)
Progressão e/ou óbito	46 (52,9)	34 (54,0)
Consolidação com TCTH	29 (33,3)	22 (34,9)
Protocolo de tratamento		
CHOP	45 (51,7)	32 (50,8)
CHOEP	19 (21,8)	15 (23,8)
Outros	13 (14,9)	11 (17,5)
Não tratou	10 (11,0)	05 (07,9)
Óbitos	46 (52,9)	34 (54,0)
Progressão	26 (56,5) ⁴	22 (64,7) ⁴
Infecção	24 (52,2) ⁴	15 (44,1) ⁴
2ª. neoplasia	04 (08,7) ⁴	04 (11,7) ⁴

1- Foram excluídos 10 e 3 pacientes, respectivamente por ausência de biópsia de medula óssea; 2- Dos 10 pacientes com biópsia de medula óssea não avaliável, 8 já apresentavam escore IPI-T adaptado de alto

risco sem contar o envolvimento histopatológico de medula óssea, assim o N utilizado foi 85. O mesmo foi considerado para análise de subgrupos; 3- Houve 2 casos de leucemia mieloide aguda e dois casos de tumores sólidos (adenocarcinoma de pâncreas e carcinoma epidermóide de pulmão); 4- Percentual calculado entre os óbitos – quanto as causas de óbito considerado sobreposição de causas em alguns pacientes; LGCA/ALK+: linfoma de grandes células anaplásicas quinase do linfoma anaplásico positivo; LGCA/ALK-: linfoma de grandes células anaplásicas quinase do linfoma anaplásico negativo; LCTP/SOE: linfoma de células T periféricas sem outras especificações; LCTA: linfoma de células T angioimunoblástico; DHL: desidrogenase láctica; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; IPI: Índice prognóstico internacional; IPI-T: Índice prognóstico internacional para linfomas T; BR: baixo risco, IB: intermediário-baixo; IA: intermediário-alto; AR: alto risco; RDT: radioterapia; RC: remissão completa; RP: resposta parcial; TCTH: transplante de medula óssea autólogo; CHOP: ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona; CHOEP: ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina, etoposídeo e prednisona.

Gráfico 2. Distribuição dos LCTP de acordo com variantes histopatológicas

LCTA: linfoma de células T angioimunoblástico, LGCA/ALK+: linfoma de grandes células anaplásicas ALK+, LGCA/ALK-: linfoma de grandes células anaplásicas ALK-; LCTP/SOE: linfoma de células T periféricas, sem outras especificações.

Gráfico 3. Percentual de comprometimento extralinfonodal na coorte de LCTP

TCSC: tecido celular subcutâneo, SNC: sistema nervoso central, Outros: referente a testículos, seios paranasais e partes moles.

5.2.2 Características clínicas e laboratoriais por subgrupo histopatológico

As características clínicas e laboratoriais dos 63 pacientes avaliados de acordo com o subgrupo histopatológico estão disponíveis na tabela 15.

Os LCTA (N=9/63 14,3%) predominaram no sexo masculino 7/9 (77,8%). Destes, 4/9 (44,4%) apresentavam idade igual ou superior a 60 anos. Valor de DHL acima do normal ocorreu na maioria dos pacientes 8/9 (88,9%) e *performance status* ruim (ECOG ≥ 2) em 7/9 (77,8%) dos casos. Massa *bulky* não foi encontrada em nenhum caso de LCTA. Nesta subcategoria, todos os pacientes apresentavam estágio avançado III ou IV e envolvimento de medula óssea em pouco mais de 10% dos casos. A maioria dos indivíduos 7/9 (77,8%) apresentou IPI e IPI-T adaptados de alto risco.

Os LCTP/SOE (N=22/63 34,9%) apresentaram distribuição equivalente em ambos os sexos. Houve predomínio em pacientes mais jovens, 16/22 (72,7%), os quais apresentavam idade inferior a 60 anos. Valor de DHL acima do normal ocorreu na

maior parte dos pacientes 16/22 (72,7%), assim como pobre *performance status* (ECOG ≥ 2) 15/22 (68,2%). Massa *bulky* foi evidenciada em cerca de 30% (7/22) dos pacientes e doença avançada com estágio III e IV em 90,9% (20/22) dos indivíduos. Envolvimento de medula óssea foi observado em 9,1% (2/22) dos pacientes e a maioria apresentou IPI e IPI-T adaptado de alto risco, 16/22 (72,7%) e 17/22 (77,3%) respectivamente.

No subgrupo de LGCA/ALK+ (14/63 22,2%) evidenciou-se distribuição equivalente nos dois sexos. A maioria 12/14 (85,7%) ocorreu em idade inferior ou igual a 60 anos e 65% (9/14) abaixo dos 40 anos. Valor de DHL superior a 480 U/L ocorreu em cerca de 60% (8/14) dos casos e a maioria 10/14 (71,4%) apresentou ECOG ≥ 2 . Todos os pacientes (100%) apresentaram-se em estádios III ou IV, e IPI e IPI-T (PIT) adaptado de alto risco foram encontrados na metade dos pacientes. Massa *bulky* ocorreu em 7/14 (50%) dos casos e envolvimento de medula óssea em 14,3% (2/14).

No subgrupo de LGCA/ALK- composto por 18/63 (28,6%) pacientes, evidenciou-se predomínio no sexo masculino 11/18 (61,2%). Idade inferior a 60 anos foi encontrada em 14/18 (77,7%) dos casos, sendo 7/14 (50%) na faixa etária inferior a 40 anos. Valor de DHL acima do limite superior da normalidade foi encontrado em 55,6% (10/18) dos casos e ECOG ≥ 2 em 44,4% (8/18). Doença localizada ocorreu na minoria dos casos (1/18 5,6%), porém 50% (9/18) apresentavam prognóstico favorável pelo IPI e IPI-T adaptado. Doença *bulky* foi detectada em 55,6% (10/18) e 22,3% (4/18) apresentavam comprometimento de medula óssea.

Tabela 15. Características clínico-laboratoriais por variante histopatológica

Características	LCTA (N/%) 9/63 (14,3)	LGCA/ALK- (N/%) 18/63 (28,6)	LGCA/ALK+ (N/%) 14/63 (22,2)	LCTP/SOE (N/%) 22/63 (34,9)
Sexo				
Feminino	(2) (22,2)	(7) (38,8)	(7) (50,0)	(11) (50,0)
Masculino	(7) (77,8)	(11) (61,2)	(7) (50,0)	(11) (50,0)
Idade				
≤60 anos	(5) (55,6)	(14) (77,7)	(12) (85,7)	(16) (72,7)
> 60 anos	(4) (44,4)	(4) (22,3)	(2) (14,3)	(6) (27,3)
DHL				
<VSN	(1) (11,1)	(8) (44,4)	(6) (42,8)	(6) (27,3)
≥VSN	(8) (88,9)	(10) (55,6)	(8) (57,2)	(16) (72,7)
ECOG				
<2	(2) (22,2)	(10) (55,6)	(4) (28,6)	(7) (31,8)
≥2	(7) (77,8)	(8) (44,4)	(10) (71,4)	(15) (68,2)
Medula óssea				
Positiva	(1) (11,1)	(4) (22,3)	(2) (14,3)	(2) (9,1)
Negativa	(8) (88,9)	(14) (77,7)	(12) (85,7)	(20) (90,9)
Bulky				
Presente	(0) (0,0)	(10) (55,6)	(7) (50,0)	(7) (31,8)
Ausente	(9) (100,0)	(8) (44,4)	(7) (50,0)	(15) (68,2)
EC Ann Arbor				
Localizado (I/II)	(0) (0,0)	(1) (5,6)	(0) (0,0)	(2) (9,1)
Avançado (III/IV)	(9) (100,0)	(17) (94,4)	(14) (100,0)	(20) (90,9)
IPI adaptado				
Baixo (BR+IB)	(2) (22,2)	(9) (50,0)	(7) (50,0)	(6) (27,3)
Alto (IA+AR)	(7) (77,8)	(9) (50,0)	(7) (50,0)	(16) (72,7)
IPI-T adaptado				
Baixo (BR+IB)	(2) (22,2)	(9) (50,0)	(7) (50,0)	(5) (22,7)
Alto (IA+AR)	(7) (77,8)	(9) (50,0)	(7) (50,0)	(17) (77,3)
Radioterapia				
Não realizada	(0) (0,0)	(13) (72,2)	(9) (64,3)	(16) (72,7)
Realizada	(9) (100,0)	(6) (27,8)	(5) (35,7)	(6) (27,3)
TMO				
Não realizado	(8) (88,9)	(7) (38,8)	(10) (71,4)	(17) (68,2)
Realizado	(1) (11,1)	(12) (61,2)	(4) (28,6)	(5) (31,8)
Óbitos				
Sim	(6) (66,6)	(4) (22,3)	(7) (50,0)	(17) (68,2)
Não	(3) (33,4)	(14) (77,7)	(7) (50,0)	(5) (31,8)
Causa de óbito	(N=6)	(N=4)	(N=7)	(N=17)
Progressão	(4) (66,6) ¹	(2) (50,0) ¹	(5) (71,4) ¹	(11) (64,8) ¹
Infecção	(2) (33,4) ¹	(2) (50,0) ¹	(2) (28,6) ¹	(3) (17,6) ¹
Outros	(0) (0,0) ¹	(0) (0,0) ¹	(0) (0,0) ¹	(3) (17,6) ¹
Tratamento				
CHOP	(5) (55,6)	(10) (55,6)	(8) (57,2)	(9) (40,9)
CHOEP	(1) (11,1)	(4) (22,2)	(3) (21,4)	(6) (27,2)
Outros	(3) (33,3)	(4) (22,2)	(3) (21,4)	(7) (31,9)
Resposta após 1º. tratamento				
RC	(4) (44,4)	(11) (61,1)	(7) (50,0)	(7) (31,9)
RP	(0) (0,00)	(3) (16,7)	(3) (21,4)	(2) (9,1)
Progressão e/ou óbito	(5) (55,6)	(4) (22,2)	(4) (28,6)	(13) (59,0)

1 – Percentual calculado entre o número de óbitos. LCTA: linfoma de células T angioimunoblástico; LGCA/ALK-: linfoma de grandes células anaplásicas, quinase do linfoma anaplásico negativa; LGCA/ALK+: linfoma de grandes células anaplásicas, quinase do linfoma anaplásico positiva; LCTP/SOE: linfoma de células T periféricas, sem outras especificações; DHL: desidrogenase láctica;

VSN: valor superior da normalidade; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; EC: estágio clínico; IPI: *International Prognostic Index*; IPI-T: *International Prognostic Index for T-cell lymphomas*; BR: baixo risco, IB: intermediário-baixo; IA: intermediário-alto; AR: alto risco; TMO: transplante de medula óssea; CHOP: ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona; CHOEP: ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, etoposídeo e prednisona; RC: resposta completa; RP: resposta parcial.

5.2.3 Taxas de resposta

Dos 63 pacientes com LCTP nodais, 34/63 (54%) foram a óbito, sendo 20/63 (31,7%) durante o tratamento quimioterápico de primeira linha. A causa mais comum de óbito deveu-se a progressão de doença em 22/34 (64,7%) casos. Complicações infecciosas causaram óbito em 15/34 (44,1%) casos. Neoplasias concomitantes ou segunda neoplasia representou 11,7% (4/34) dos óbitos.

As segundas neoplasias mais comuns foram leucemia mieloide aguda, carcinoma epidermóide de pulmão e adenocarcinoma de pâncreas. Ressalta-se que em parcela considerável dos pacientes houve superposição de causas de óbito com associação frequente de progressão de doença e complicações infecciosas (gráfico 4).

Gráfico 4. Distribuição quanto às causas de óbito em portadores de LCTP

Outros: outras neoplasias: 2 casos de leucemia mieloide aguda, 1 adenocarcinoma de pâncreas e 1 carcinoma epidermóide de pulmão.

Quanto ao tratamento quimioterápico de primeira linha, em 32/63 (50,8%) casos utilizou-se o esquema CHOP, e em 15/63 (23,8%) o protocolo CHOEP. Outros 11/63 (17,5%) pacientes receberam esquemas menos intensivos devido a condições clínicas ruins ao diagnóstico. Em 5/63 (7,9%) casos não foi instituído nenhum tratamento quimioterápico pois os pacientes faleceram muito precocemente. Dos 58/63 pacientes tratados com quimioterapia, apenas 26/58 (41,3%) conseguiram completar integralmente o tratamento proposto.

Resposta global (RG) foi obtida em 60,3% (38/63) dos pacientes, sendo 46% (29/63) de remissão completa (RC) e 14,3% (9/63) de resposta parcial (RP). Observou-se ainda que 5/63 (7,9%) apresentaram doença refratária primária ou primariamente progressiva ao término da terapia de primeira linha e 20/63 (31,7%) evoluíram a óbito antes mesmo de completar 6 a 8 ciclos de indução quimioterápica com protocolo CHOP ou CHOP-símile, conforme demonstrado no gráfico 5. Destaca-se que 17/63 (27%) casos receberam radioterapia adjuvante e 22/63 (34,9%) consolidação com transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas.

Gráfico 5. Taxa de resposta em toda a corte de LCTP após terapia de primeira linha

Em análise de subgrupo, de acordo com as diferentes variantes histopatológicas de LCTP nodais, observamos RG em 41% (9/22) dos LCTP/SOE, em 77,8% (14/18) dos LGCA/ALK-, em 71,4% (10/14) dos LGCA/ALK+ e em 44,4% (4/9) dos linfomas angioimunoblásticos (Tabela 15).

Desfechos desfavoráveis englobando progressão de doença após o tratamento inicial resultando em óbito predominaram nos subtipos angioimunoblástico e nos LNH-T sem outras especificações, com taxas de óbito de 66,6% (6/9) e 68,2% (17/22) respectivamente. Destaca-se também elevada proporção de óbitos nos LGCA/ALK+ 7/14 (50%) e menor nos LGCA/ALK- 4/18 (22,3%). A causa mais frequente de óbito em todas as variantes deveu-se à progressão de doença (Tabela 15).

5.3 Curvas de sobrevida

5.3.1 Sobrevida global de toda a coorte de LCTP

A SG em 5 anos de toda a coorte de LCTP nodais analisada foi de 45,6%, com mediana de 20,6 meses (0,29 a 232 meses) (gráfico 6).

Gráfico 6. Sobrevida global dos portadores de LCTP

5.3.2 Sobrevida livre de progressão de toda a coorte de LCTP

A SLP em 5 anos de toda a coorte de LCTP analisada foi de 34,3%, com mediana de 11,6 meses (0,30 a 148,6 meses) (Gráfico 7).

Gráfico 7. Sobrevida livre de progressão dos pacientes com LCTP

5.3.3 Sobrevida livre de doença de toda a coorte de LCTP

A SLD em 5 anos de toda a coorte de LCTP foi 63,0%, com mediana de 39,8 meses (0,59 a 224,2 meses) (gráfico 8).

Gráfico 8. Sobrevida livre de doença dos pacientes portadores de LCTP

5.3.4 Sobrevida global por variante histopatológica de LCTP

A SG em 5 anos foi de 19,2% para o LCTP/SOE, 83,3% para o LGCA/ALK-, 45,7% para o LGCA/ALK+; e de 27,8% para o LCTA ($p = 0,002$) (gráfico 9).

Gráfico 9. Sobrevida global dos pacientes incluídos por variante histopatológica de LCTP

5.3.5 Sobrevida livre de progressão por variante histopatológica de LCTP

A SLP em 5 anos foi de 0,0% (zero) nos LGCA/ALK+ e LCTP/SOE; 77,4% nos LGCA/ALK-; e 37,5% nos LCTA ($p < 0,001$) (gráfico 10).

Gráfico 10. Sobrevida livre de progressão por variante histopatológica de LCTP

5.3.6 Sobrevida livre de doença por variante histopatológica

A SLD em 5 anos foi de 50% nos LGCA/ALK+; 100% nos LGCA/ALK-; 23,3% nos LCTP/SOE e 66,7% nos LCTA ($p < 0,001$) (gráfico 11).

Gráfico 11. Sobrevida livre de doença por variante histopatológica de LCTP

5.4 Características moleculares e imunohistoquímicas

5.4.1 Expressão relativa dos genes

O resultado da normatização dos genes estudados pode ser encontrado no ANEXO C. A mediana de expressão relativa dos genes *CCNA2*, *TOP2A*, *CHEK1*, *VEGF1*, *NFkB1* e *IKKB* foi respectivamente, 2,00; 4,22; 6,20; 0,49; 10,59 e 8,35. A expressão relativa dos genes foi avaliada como variável quantitativa contínua, com posterior validação por variável categórica em função de mediana de expressão, tendo como ponto de corte valores $<$ ou $\geq$ à mediana de expressão gênica.

5.4.2 Expressão relativa dos genes e correlação com desfechos

A análise univariada entre a expressão contínua dos genes e os desfechos de SG, SLP e SLD na coorte dos 63 portadores de LCTP encontra-se disposta na tabela 16.

Tabela 16. Expressão contínua dos genes e associação com desfechos nos LCTP

Gene	SLP			SG			SLD		
	HR	p-value	IC 95%	HR	p-value	IC 95%	HR	p-value	IC 95%
CCNA2	0,955	0,679	0,768-1,188	1,243	0,014	1,057-1,462	1,251	0,158	0,933-1,677
TOP2A	0,976	0,656	0,878-1,085	1,058	0,219	0,969-1,155	0,997	0,964	0,867-1,146
CHEK1	0,968	0,452	0,889-1,054	1,039	0,293	0,968-1,115	1,006	0,888	0,917-1,105
NFkB	0,982	0,517	0,929-1,037	0,968	0,238	0,917-1,022	1,022	0,616	0,938-1,113
IKBkB	1,008	0,720	0,961-1,058	1,046	0,018	1,011-1,082	0,928	0,091	0,839-1,027
VEGF1	0,950	0,861	0,535-1,688	0,870	0,602	0,506-1,496	0,936	0,851	0,462-1,894

HR: razão de risco, IC: intervalo de confiança, SLP: sobrevida livre de progressão, SG: sobrevida global, SLD: sobrevida livre de doença

A partir dos dados acima dispostos, em análise univariada, nota-se que, de forma estatisticamente significativa, somente a expressão contínua dos genes *CCNA2* ($p = 0,014$) e *IKBkB* ($p = 0,018$) foram associadas a pior SG em 5 anos na coorte de LCTP nodais, independentemente do subgrupo histopatológico.

A SG em 5 anos de todos os 63 portadores de LCTP nodais, utilizando-se análise por variável categórica, em função da mediana de expressão gênica, foi de 59,5% para os indivíduos com expressão do gene *CCNA2* inferior à mediana e de 30,1% para aqueles com expressão $\geq$ à mediana ($p = 0,030$).

A SG em 5 anos foi de 53,4% para expressão do gene *TOP2A* inferior à mediana e de 37,1% para expressão $\geq$ à mediana ($p = 0,180$). A SG em 5 anos foi de 50,1% para os portadores de LCTP com expressão do gene *CHEK1* inferior à mediana e de 40,8% para expressão $\geq$ à mediana ($p = 0,452$). A SG em 5 anos foi de 42,5% para pacientes com expressão do gene *NFkB* inferior à mediana e de 49,5% para expressão $\geq$ a mediana ($p = 0,151$). A SG em 5 anos foi de 50,7% para indivíduos com expressão do gene *IKBkB* inferior à mediana e de 40,5% para expressão $\geq$ a mediana ($p = 0,557$).

Finalmente, a SG em 5 anos foi de 42,2% para expressão do gene *VEGF1* menor que a mediana e de 49,7% para expressão $\geq$ a mediana ($p = 0,775$).

Em resumo, em análise univariada, a expressão do gene *CCNA2* $\geq$ mediana foi associada a pior sobrevida global em 5 anos em portadores de LCTP nodais de forma estatisticamente significativa ($p = 0,030$) (tabela 17 e gráfico 12).

Tabela 17. Análise univariada de SG em portadores de LCTP em função da mediana de expressão dos genes estudados

Genes	SG 5 anos (%)	HR	p value	IC
CCNA2				
<mediana	59,5	2,125	0,030	1,066-4,235
$\geq$ mediana	30,1			
TOP2A				
<mediana	53,4	1,593	0,180	0,806-3,147
$\geq$ mediana	37,1			
CHEK1				
<mediana	50,1	1,296	0,452	0,658-2,552
$\geq$ mediana	40,8			
NFkB				
<mediana	42,5	0,609	0,151	0,309-1,199
$\geq$ mediana	49,5			
IKBkB				
<mediana	50,7	1,225	0,557	0,620-2,417
$\geq$ mediana	40,5			
VEGF1				
<mediana	42,2	0,905	0,775	0,459-1,787
$\geq$ mediana	49,7			

SG: sobrevida global, HR: razão de risco, IC: intervalo de confiança 95%.

Gráfico 12. SG em 5 anos em função da mediana de expressão do gene *CCNA2* em portadores de LCTP

Em análise univariada para os desfechos de SLP e SLD em 5 anos na coorte dos 63 portadores de LCTP nodais, os resultados encontrados apresentam-se sumarizados nas tabelas 18 e 19.

Tabela 18. SLP de portadores de LCTP em função da mediana de expressão dos genes estudados

Genes	SLP 5 anos (%)	HR	p value	IC
CCNA2				
<mediana	26,5	0,720	0,373	0,347-1,497
≥mediana	47,9			
TOP2A				
<mediana	32,4	0,853	0,665	0,415-1,754
≥mediana	36,9			
CHEK1				
<mediana	29,7	0,730	0,386	0,356-1,498
≥mediana	40,9			
NFkB				
<mediana	37,1	1,122	0,750	0,547-2,302
≥mediana	32,5			
IKBkB				
<mediana	24,2	0,895	0,759	0,441-1,817
≥mediana	44,4			
VEGF1				
<mediana	33,1	1,013	0,970	0,505-2,031
≥mediana	36,2			

SLP: sobrevida livre de progressão, HR: razão de risco, IC: intervalo de confiança 95%.

Tabela 19. SLD de portadores de LCTP em função da mediana de expressão dos genes estudados

Genes	SLD 5 anos (%)	HR	p value	IC
CCNA2				
<mediana	69,1	1,147	0,790	0,418-3,148
≥mediana	57,3			
TOP2A				
<mediana	71,9	1,445	0,467	0,542-3,852
≥mediana	50,6			
CHEK1				
<mediana	70,1	1,051	0,919	0,395-2,797
≥mediana	55,6			
NFkB				
<mediana	70,5	1,457	0,470	0,511-4,150
≥mediana	60,7			
IKBkB				
<mediana	64,7	0,436	0,108	0,153-1,236
≥mediana	62,0			
VEGF1				
<mediana	50,6	0,513	0,194	0,185-1,422
≥mediana	79,3			

SLD: sobrevida livre de doença, HR: razão de risco, IC: intervalo de confiança 95%.

Portanto, podemos concluir, que em análise univariada, assim como os resultados demonstrados utilizando-se expressão gênica como variável contínua, a expressão categórica destes genes em relação à mediana de expressão não demonstrou correlação estatisticamente significativa para os desfechos SLP e SLD em 5 anos nos LCTP predominantemente nodais quando não estratificados por subgrupos histológicos.

5.4.3 Expressão relativa dos genes por variante histopatológica de LCTP e correlação com desfechos

Na análise univariada, a expressão contínua de nenhum dos genes pesquisados demonstrou associação prognóstica com os desfechos SG, SLP e SLD de forma estatisticamente significativa no subgrupo de LGCA/ALK+ (tabela 20).

Tabela 20. Expressão contínua dos genes estudados e associação com desfechos em portadores de LGCA/ALK+ em análise univariada

Genes	SG			SLP			SLD		
	HR	p-value	IC 95%	HR	p-value	IC 95%	HR	p-value	IC 95%
CCNA2	1,740	0,058	1,001-3,026	1,159	0,714	0,536-2,507	NA	NA	NA
TOP2A	0,892	0,394	0,672-1,184	0,867	0,314	0,639-1,177	1,477	0,265	0,664-3,288
CHEK1	0,977	0,829	0,795-1,202	0,987	0,901	0,811-1,202	1,192	0,300	0,834-1,704
NFkB1	0,962	0,591	0,837-1,106	1,003	0,965	0,862-1,166	0,891	0,390	0,673-1,181
IKBkB	0,982	0,827	0,832-1,159	1,073	0,271	0,952-1,209	1,047	0,657	0,857-1,278
VEGF1	0,305	0,191	0,03-3,058	1,355	0,632	0,414-4,432	38,987	0,221	0,036-41,523

SG: sobrevida global, SLP: sobrevida livre de progressão, SLD: sobrevida livre de doença, HR: razão de risco, IC: intervalo de confiança, NA: não avaliável.

Quanto ao desfecho SG em 5 anos, no subgrupo de 14/63 (22,2%) pacientes com LGCA/ALK+, utilizando-se a mediana de expressão gênica, demonstramos SG de 50,9% para expressão *CCNA2* inferior à mediana e 0,0% (zero) para expressão de $CCNA2 \geq$ mediana ($p=0,258$); SG de 33,3% para expressão de *TOP2A* inferior a mediana e 66,7% para expressão de $TOP2A \geq$ a mediana ($p = 0,446$); SG de 33,3% para expressão de *CHEK1* inferior a mediana e 66,7% para expressão de $CHEK1 \geq$ a mediana ($p = 0,446$); SG de 50,0% para expressão de *NFkB* inferior a mediana e 44,4% para $NFkB \geq$ a mediana ($p = 0,785$); SG de 41,7% para expressão de *IKBkB* inferior a mediana e 50,0% para $IKBkB \geq$ a mediana ($p = 0,798$) e SG de 37,5% para expressão de *VEGF1* inferior a mediana e 55,6% se expressão $\geq$ a mediana ($p = 0,282$) (tabela 21). Podemos concluir que a expressão gênica estratificada como variável categórica em função da mediana não apresentou correlação prognóstica com desfecho de SG nos LGCA/ALK+. Resultados semelhantes foram obtidos com análise por variável contínua.

O desfecho de SLP em 5 anos nos LGCA/ALK+ não pôde ser mensurado, pois todos os 14 pacientes apresentaram progressão de doença antes de 5 anos a partir do momento do diagnóstico.

Quanto ao desfecho SLD em 5 anos nos portadores de LGCA/ALK+ os resultados encontrados são demonstrados na tabela 21 e careceram de significância estatística.

Tabela 21. SG, SLP e SLD em portadores de LGCA/ALK+ em função da mediana de expressão dos genes estudados

Genes	N=14 (%)	SG (%)	p value	SLP (%)	p value	SLD (%)	p value
CCNA2							
<mediana	11(78,6)	50,9	0,258	0,0	0,852	50,0	NA
≥mediana	03(21,4)	0,0		0,0		0,0	
TOP2A							
<mediana	08(57,1)	33,3	0,446	0,0	0,216	50,0	0,691
≥mediana	06(42,9)	66,7		0,0		50,0	
CHEK1							
<mediana	08(57,1)	33,3	0,446	0,0	0,624	50,0	0,691
≥mediana	06(42,9)	66,7		0,0		50,0	
NFkB							
<mediana	08(57,1)	50,0	0,785	0,0	0,733	50,0	0,691
≥mediana	06(42,9)	44,4		0,0		50,0	
IKBkB							
<mediana	08(57,1)	41,7	0,798	0,0	0,209	66,7	0,535
≥mediana	06(42,9)	50,0		0,0		0,0	
VEGF1							
<mediana	08(57,1)	37,5	0,282	0,0	0,784	50,0	0,691
≥mediana	06(42,9)	55,6		0,0		50,0	

SG, SLP e SLD calculadas para 5 anos; SG: sobrevida global; SLP: sobrevida livre de progressão; SLD: sobrevida livre de doença; NA: não avaliável.

Na análise univariada, a expressão contínua dos genes *CCNA2* ($p=0,011$) e *TOP2A* ($p=0,013$) demonstrou associação prognóstica com melhor SLP em 5 anos, de forma estatisticamente significativa no subgrupo de pacientes com LGCA/ALK-. Porém, não houve associação estatisticamente significativa com os desfechos de SG e SLD (tabela 22).

Tabela 22. Expressão contínua dos genes estudados e associação com desfechos em portadores da variante LGCA/ALK-

Genes	SG			SLP			SLD		
	HR	p-value	IC 95%	HR	p-value	IC 95%	HR	p-value	IC 95%
CCNA2	0,696	0,309	0,320-1,511	0,195	0,011	0,029-1,307	1,449	0,072	0
TOP2A	0,862	0,333	0,616-1,207	0,375	0,013	0,121-1,159	0,699	0,351	0,256-1,905
CHEK1	0,968	0,741	0,794-1,179	0,674	0,059	0,401-1,134	0,769	0,314	0,374-1,582
NFkB	0,951	0,562	0,804-1,126	1,019	0,844	0,839-1,237	1,039	0,814	0,753-1,432
IKBkB	0,977	0,722	0,858-1,113	0,903	0,334	0,696-1,171	0,011	0,072	0
VEGF1	1,457	0,704	0,230-9,233	1,290	0,794	0,205-8,102	7,939	NA	NA

SG: sobrevida global, SLP: sobrevida livre de progressão, SLD: sobrevida livre de doença, HR: razão de risco; IC: intervalo de confiança, NA: não avaliável.

Ao analisar-se o desfecho de SG em 5 anos por variável categórica no subgrupo de LGCA/ALK- (N=18/63 28,6%), demonstramos SG de 85,7% para expressão de *CCNA2* inferior a mediana e 81,2% para expressão de *CCNA2* $\geq$ a mediana ($p = 0,869$); SG de 80,0% para expressão de *TOP2A* inferior a mediana e 87,5% para expressão $\geq$ a mediana ($p = 0,468$); SG de 77,8% para expressão de *CHEK1* inferior a mediana e de 88,9% quando $\geq$ mediana ($p = 0,272$); SG 75,0% para expressão de *NFkB* inferior a mediana e de 90,0% quando $\geq$ a mediana ($p = 0,709$); SG 77,8% para expressão de *IKBkB* inferior a mediana e de 88,9% para expressão de *IKBkB* $\geq$ a mediana ($p = 0,177$) e SG 87,5% para expressão de *VEGF1* inferior a mediana e 80,0% quando $\geq$ a mediana ($p = 0,549$). Conclui-se portanto, que para o desfecho SG, a expressão gênica avaliada por variável contínua ou categórica em função de mediana em LGCA/ALK- não apresentou correlação prognóstica.

Quanto a análise do desfecho de SLP mensurada em 5 anos nos LGCA/ALK-, encontramos significância estatística em função da mediana de expressão gênica para *CCNA2* e *CHEK1*. Observamos melhor SLP, com $p=0,025$ e $p = 0,047$, respectivamente

para *CCNA2* e *CHEK1* $\geq$ mediana. Por outro lado, a hiperexpressão de *VEGF1* $\geq$ mediana foi associada a prognóstico desfavorável ($p=0,041$).

Portanto, usando-se variáveis contínuas e categóricas a hiperexpressão dos genes de assinatura proliferativa/regulação do ciclo celular *CCNA2* e *CHEK1* foram associadas a melhor SLP em LGCA/ALK-. Porém, a hiperexpressão do regulador de angiogênese *VEGF1* foi associada a pior SLP (tabela 23).

Tabela 23. SG e SLP em portadores de LGCA/ALK- em função da mediana de expressão dos genes estudados

Genes	N=18 (%)	SG (%)	p value	SLP (%)	p value
CCNA2					
<mediana	07(38,9)	85,7	0,869	53,6	0,025
$\geq$ mediana	11(61,1)	81,2		100,0	
TOP2A					
<mediana	10(55,6)	80,0	0,468	64,8	0,079
$\geq$ mediana	08(44,4)	87,5		100,0	
CHEK1					
<mediana	09(50,0)	77,8	0,272	60,0	0,047
$\geq$ mediana	09(50,0)	88,9		100,0	
NFkB					
<mediana	08(44,4)	75,0	0,709	100,0	0,104
$\geq$ mediana	10(55,5)	90,0		66,7	
IKBkB					
<mediana	09(50,0)	77,8	0,177	65,6	0,517
$\geq$ mediana	09(50,0)	88,9		85,7	
VEGF1					
<mediana	08(44,4)	87,5	0,549	100,0	0,041
$\geq$ mediana	10(55,5)	80,0		57,1	

SG e SLP calculadas para 5 anos; SG: sobrevida global; SLP: sobrevida livre de progressão.

Na análise univariada, a expressão contínua dos genes *CCNA2* ($p=0,0003$), *TOP2A* ($p=0,002$), *CHEK1* ($p=0,003$) e *IKBkB* ($p=0,0007$) demonstrou associação prognóstica com pior SG em 5 anos, de forma estatisticamente significativa, no subgrupo de LCTP/SOE. Da mesma forma, a expressão contínua de *CCNA2* ($p=0,031$), de *TOP2A* ($p=0,007$) e de *IKBkB* ($p=0,019$) estiveram associadas a pior SLP em 5 anos. A expressão contínua de *CCNA2* ($p=0,001$) foi relacionada a pior SLD em 5 anos neste subgrupo, com significância estatística. (Tabela 24).

Tabela 24. Expressão contínua dos genes estudados e associação com desfechos em portadores da variante LCTP/SOE

Genes	SG			SLP			SLD		
	HR	p-value	IC 95%	HR	p-value	IC 95%	HR	p-value	IC 95%
CCNA2	1,611	0,0003	1,243-2,088	1,372	0,031	1,043-1,804	2,486	0,001	1,218-5,075
TOP2A	1,216	0,002	1,079-1,369	1,264	0,007	1,070-1,494	1,158	0,176	0,948-1,414
CHEK1	1,241	0,003	1,077-1,429	1,127	0,149	0,961-1,321	1,234	0,064	0,986-1,544
NFkB	9,966	0,319	0,902-1,035	0,946	0,177	0,871-1,030	0,997	0,963	0,890-1,117
IKBkB	1,084	0,0007	1,034-1,136	1,109	0,019	1,011-1,217	1,027	0,849	0,779-1,353
VEGF1	0,793	0,377	0,458-1,374	0,627	0,198	0,273-1,439	0,351	0,056	0,066-1,862

SG: sobrevida global, SLP: sobrevida livre de progressão, SLD: sobrevida livre de doença, HR: razão de risco, IC: intervalo de confiança.

A análise do desfecho de SG mensurada em 5 anos em função da expressão dos genes estudados por variável categórica nos 22/63 (34,9%) casos de LCTP/SOE avaliados, encontramos SG de 57,1% para expressão *CCNA2* inferior a mediana e 0,0% para *CCNA2* $\geq$ mediana ($p = < 0,0001$); SG de 57,1% para expressão *TOP2A* inferior a mediana e 0,0% para *TOP2A* $\geq$ mediana ($p = 0,0001$); SG de 50,0% para expressão *CHEK1* inferior a mediana e 0,0% quando expressão *CHEK1* foi $\geq$ mediana ($p = 0,0005$); SG de 13,3% para expressão *NFkB* inferior a mediana e 20,0% para *NFkB* $\geq$ mediana ($p = 0,083$); SG de 49,1% para expressão *IKBkB* inferior a mediana e 0,0% para *IKBkB* $\geq$ mediana ($p = 0,006$), e SG de 15,6% para expressão *VEGF* inferior a mediana e 26,7% quando a expressão de *VEGF* foi $\geq$ mediana ($p = 0,681$) (tabela 25) .

Quanto ao desfecho de SLP em 5 anos para os portadores de LCTP/SOE em função da expressão dos genes estudados, utilizando-se como referencial expressão mediana, não foi possível realizar sua mensuração pois todos os pacientes progrediram antes de completar 5 anos de seguimento. No entanto, quando este desfecho foi calculado considerando-se a expressão dos genes de interesse como variável contínua a hiperexpressão de *CCNA2*, *TOP2A* e *IKBkB* foram associadas a menor SLP, com

$p=0,031$, $p=0,007$ e $p=0,019$, respectivamente, conforme demonstrado anteriormente.

Levando-se em consideração o desfecho SLD em 5 anos em função da expressão dos genes de interesse nos portadores de LCTP/SOE, a expressão dos genes *CCNA2*, *TOP2A* e *CHEK1* acima de suas medianas de expressão foi associada a pior SLD. A SLD foi de 41,7% nos casos de expressão inferior à mediana para os 3 genes e de 0,0% se expressão $\geq$ mediana, com $p=0,003$, $p=0,013$ e $p=0,009$, respectivamente (tabela 25)

Tabela 25. SG e SLD em 5 anos para portadores de LCTP/SOE em função da mediana de expressão dos genes pesquisados

Genes	N=22 (%)	SG (%)	p value	SLD (%)	p value
CCNA2					
<mediana	08(36,4)	57,1	< 0,0001	41,7	0,003
$\geq$ mediana	14(63,6)	0,0		0,0	
TOP2A					
<mediana	07(31,8)	57,1	0,0001	41,7	0,013
$\geq$ mediana	15(68,2)	0,0		0,0	
CHEK1					
<mediana	08(36,4)	50,0	0,0005	41,7	0,009
$\geq$ mediana	14(63,6)	0,0		0,0	
NFkB					
<mediana	10(45,4)	13,3	0,083	33,3	0,878
$\geq$ mediana	12(54,6)	20,0		16,9	
IKBkB					
<mediana	11(50,0)	49,1	0,006	38,9	0,221
$\geq$ mediana	11(50,0)	0,0		0,0	
VEGF1					
<mediana	12(54,6)	15,6	0,681	11,4	0,377
$\geq$ mediana	10(45,4)	26,7		53,3	

SG e SLD estimadas em 5 anos; SG: sobrevida global; SLD: sobrevida livre de doença.

Desta forma, a hiperexpressão de genes associados a proliferação/regulação do ciclo celular (*CCNA2*, *TOP2A* e *CHEK1*) e do gene pertencente ao cluster inflamatório *IKBkB* foram associados a piores desfechos de SG, SLP e SLD no subgrupo de portadores de LCTP/SOE; resultado oposto ao obtido para a variante LGCA/ALK-.

Em análise univariada, somente a expressão contínua do gene regulador de angiogênese *VEGF1* demonstrou associação prognóstica com pior SG em 5 anos ($p=0,026$) e pior SLP em 5 anos ($p=0,028$), de forma estatisticamente significativa, quando analisou-se o subgrupo de pacientes portadores da variante LCTA. A expressão

contínua de nenhum dos outros genes (de padrão proliferativo ou inflamatório) pôde ser relacionada aos desfechos SG, SLP e SLD em 5 anos nesse grupo de tumores, de forma estatisticamente significativa (tabela 26).

Tabela 26. Expressão contínua dos genes estudados e associação com desfechos em portadores de LCTA

Genes	SG			SLP			SLD		
	HR	p-value	IC 95%	HR	p-value	IC 95%	HR	p-value	IC 95%
CCNA2	1,038	0,857	0,691-1,559	0,907	0,763	0,470-1,751	3,829	NA	NA
TOP2A	0,990	0,964	0,662-1,481	0,648	0,291	0,253-1,661	6,459	NA	NA
CHEK1	1,031	0,762	0,844-1,260	1,000	0,995	0,765-1,309	1,354	0,599	0,364-5,033
NFkB	1,017	0,836	0,859-1,205	1,106	0,358	0,878-1,393	0,0001	0,138	0
IKBkB	0,967	0,737	0,797-1,174	0,885	0,338	0,680-1,153	0,009	0,706	NA
VEGF1	20,433	0,026	1,288-32,413	66,578	0,028	0,408-109,999	NA	NA	NA

SG: sobrevida global, SLP: sobrevida livre de progressão, SLD: sobrevida livre de doença, HR: razão de risco, IC: intervalo de confiança, NA: não avaliável.

A análise do desfecho SG mensurada em 5 anos em função da expressão gênica relativa pela mediana nos 9/63 (14,3%) pacientes com a variante histopatológica LCTA demonstrou: SG de 33,3% versus 0,0% para expressão de *CCNA2* inferior e $\geq$ mediana, respectivamente ($p = 0,849$); SG 28,6% versus 0,0% para expressão de *TOP2A* inferior e $\geq$ mediana, respectivamente ($p = 0,917$); SG 28,6% versus 0,0% para expressão de *CHEK1* inferior e $\geq$ mediana, respectivamente ($p = 0,917$); SG 30,0% versus 25,0% para expressão de *NFkB* inferior e $\geq$ mediana, respectivamente ($p = 0,915$); SG 0,0% versus 44,4% para expressão de *IKBkB* inferior e $\geq$ mediana, respectivamente ($p = 0,276$) e SG 33,3% versus 25,0% para expressão de *VEGF1* inferior e $\geq$ mediana, respectivamente ($p = 0,495$).

Para os portadores de LCTA alistados nesse estudo, os desfechos insatisfatórios associados ao significado da expressão gênica contínua do regulador de angiogênese

VEGF1, não foram validados quando analisados frente à variável categórica, utilizando-se como referencial o parâmetro mediana de expressão gênica (tabela 27).

Tabela 27. Análise de SG, SLP e SLD em 5 anos para portadores de LCTA em função da mediana de expressão dos genes de interesse

Genes	N=9 (%)	SG (%)	p value	SLP (%)	p value	SLD (%)	p value
CCNA2							
<mediana	06(66,7)	33,3	0,849	40,0	0,673	100,0	0,138
≥mediana	03(33,3)	0,0		0,0		0,0	
TOP2A							
<mediana	07(77,8)	28,6	0,917	33,3	0,263	66,7	NA
≥mediana	02(22,2)	0,0		0,0		0,0	
CHEK1							
<mediana	07(77,8)	28,6	0,917	33,3	0,263	66,7	NA
≥mediana	02(22,2)	0,0		0,0		0,0	
NFkB							
<mediana	05(55,6)	30,0	0,915	50,0	0,186	100,0	0,367
≥mediana	04(44,4)	25,0		25,0		50,0	
IKBkB							
<mediana	03(33,3)	0,0	0,276	0,0	0,069	0,0	NA
≥mediana	06(66,7)	44,4		66,7		100,0	
VEGF1							
<mediana	03(33,3)	33,3	0,495	50,0	0,164	50,0	0,367
≥mediana	06(66,7)	25,0		30,0		100,0	

SG, SLP e SLD estimadas para 5 anos; SG: sobrevida global; SLP: sobrevida livre de progressão; SLD: sobrevida livre de doença; NA: não avaliável.

5.4.4 Estudo de agrupamento gênico e discriminação de variantes histopatológicas em função dos genes estudados

A tabela 28 disponibiliza a mediana de expressão dos seis genes estudados (*CCNA2*, *TOP2A*, *CHEK1*, *NFkB1*, *IKBkB* e *VEGF1*) em função das quatro diferentes variantes histopatológicas dos LCTP nodais.

Tabela 28. Mediana de expressão dos seis genes estudados de acordo com as variantes histopatológicas de LCTP nodais

Gene	Variante	N	Mediana	DP	IC 95%
<i>CCNA2</i>	LGCA/ALK+	14	1,72	1,48	0,86-2,57
	LGCA/ALK-	18	2,60	1,88	1,66-3,54
	LCTP/SOE	22	3,12	2,27	2,11-4,12
	LCTA	9	2,50	2,29	0,73-4,26
	Total	63	2,57	2,03	2,06-3,08
<i>TOP2A</i>	LGCA/ALK+	14	4,87	3,67	2,75-6,99
	LGCA/ALK-	18	5,02	3,90	3,07-6,96
	LCTP/SOE	22	6,57	4,55	4,56-8,59
	LCTA	9	3,92	2,47	2,02-5,82
	Total	63	5,37	3,96	4,37-6,37
<i>CHEK1</i>	LGCA/ALK+	14	6,45	3,85	4,22-8,68
	LGCA/ALK-	18	6,96	5,10	4,42-9,50
	LCTP/SOE	22	7,89	3,91	6,15-9,62
	LCTA	9	5,34	4,44	1,92-8,75
	Total	63	6,94	4,33	5,85-8,03
<i>NFkB1</i>	LGCA/ALK+	14	8,91	5,56	5,70-12,13
	LGCA/ALK-	18	10,58	6,05	7,57-13,59
	LCTP/SOE	22	10,96	9,54	6,72-15,19
	LCTA	9	8,93	5,28	4,86-12,99
	Total	63	10,10	7,20	8,29-11,92
<i>IKBkB</i>	LGCA/ALK+	14	8,93	5,23	5,91-11,96
	LGCA/ALK-	18	10,90	8,67	6,58-15,21
	LCTP/SOE	22	15,03	13,62	8,98-21,07
	LCTA	9	10,96	5,15	7,00-14,92
	Total	63	11,91	9,92	9,41-14,41
<i>VEGF1</i>	LGCA/ALK+	14	0,65	0,62	0,29-1,00
	LGCA/ALK-	18	0,59	0,48	0,35-0,83
	LCTP/SOE	22	0,77	0,86	0,38-1,15
	LCTA	9	0,57	0,17	0,43-0,70
	Total	63	0,66	0,64	0,50-0,82

*N: número de casos da amostra, DP: desvio padrão, IC 95%: intervalo de confiança 95%, LGCA/ALK+: linfoma de grandes células anaplásicas ALK positivo, LGCA/ALK-: linfoma de grandes células anaplásicas ALK negativo, LCTP/SOE: linfoma de células T periféricas sem outras especificações, LCTA: linfoma de células T angioimunoblástico.

O teste estatístico de múltiplas comparações de Tamhane, que utiliza a mediana de expressão de cada gene em função das diferentes variantes histopatológicas de LCTP nodais foi usado para determinar o poder destes genes em discriminar os distintos subtipos morfológicos. Nenhum dos seis genes estudados conseguiu discriminar as quatro diferentes variantes patológicas de LCTP nodais. Estes resultados foram validados pelos testes de Dunnett T3, Dunnett C e Games-Howell (tabela 29)

Tabela 29. Análise discriminatória das variantes histopatológicas de LCTP nodais em função do painel gênico estudado

Gene	Subtipo	Subtipo	Significância	IC 95%
<i>CCNA2</i>	1	2	0,62	-2,55-0,79
		3	0,17	-3,14-0,35
		4	0,94	-3,46-1,91
	2	1	0,62	-0,79-2,55
		3	0,96	-2,34-1,30
		4	1,00	-2,61-2,81
	3	1	0,17	-0,35-3,14
		2	0,96	-1,30-2,34
		4	0,98	-2,12-3,36
	4	1	0,94	-1,91-3,46
		2	1,00	-2,81-2,61
		3	0,98	-3,36-2,12
<i>TOP2A</i>	1	2	1,00	-3,95-3,65
		3	0,78	-5,57-2,16
		4	0,97	-2,77-4,67
	2	1	1,00	-3,65-3,95
		3	0,82	-5,27-2,15
		4	0,94	-2,45-4,65
	3	1	0,78	-2,16-5,57
		2	0,82	-2,15-5,27
		4	0,25	-0,97-6,27
	4	1	0,97	-4,67-2,77
		2	0,94	-4,65-2,45
		3	0,25	-6,27-0,97
<i>CHEK1</i>	1	2	1,00	-4,97-3,95
		3	0,86	-5,18-2,31
		4	0,99	-4,32-6,55
	2	1	1,00	-3,95-4,97
		3	0,98	-5,04-3,18
		4	0,95	-4,00-7,24
	3	1	0,86	-2,31-5,18
		2	0,98	-3,18-5,04
		4	0,64	-2,68-7,78
	4	1	0,99	-6,55-4,32
		2	0,95	-7,24-4,00
		3	0,64	-7,78-2,68
<i>NFkB1</i>	1	2	0,95	-7,48-4,14
		3	0,96	-9,08-5,00
		4	1,00	-6,82-6,80
	2	1	0,96	-4,14-7,48
		3	1,00	-7,29-6,54
		4	0,97	-5,02-8,33
	3	1	0,96	-5,00-9,08
		2	1,00	-6,54-7,29
		4	0,97	-5,63-9,69
	4	1	1,00	-6,80-6,82
		2	0,97	-8,33-5,02
		3	0,97	-9,69-5,63

Continua

Gene	Subtipo	Subtipo	Significância	Continuação
				IC 95%
<i>IKBkB</i>	1	2	0,96	-8,97-5,03
		3	0,34	-15,18-3,00
		4	0,93	-8,59-4,54
	2	1	0,96	-5,03-8,97
		3	0,82	-14,01-5,76
		4	1,00	-7,71-7,59
	3	1	0,34	-3,00-15,18
		2	0,82	-5,76-14,01
		4	0,80	-4,45-13,59
	4	1	0,93	-4,54-8,59
		2	1,00	-7,59-7,71
		3	0,80	-13,59-5,45
<i>VEGFI</i>	1	2	1,00	-0,52-0,63
		3	0,99	-0,81-0,57
		4	0,99	-0,44-0,60
	2	1	1,00	-0,63-0,52
		3	0,96	-0,78-0,42
		4	1,00	-0,34-0,39
	3	1	0,99	-0,57-0,81
		2	0,96	-0,42-0,78
		4	0,88	-0,35-0,75
	4	1	0,99	-0,60-0,44
		2	1,00	-0,39-0,34
		3	0,88	-0,75-0,35

*IC 95%: Intervalo de confiança 95%; 1 – LGCA/ALK+; 2 – LGCA/ALK-; 3 – LCTP/SOE; 4 – LCTA

A despeito de não conseguir discriminar as diferentes variantes histopatológicas de LCTP nodais, todos os genes avaliados, com exceção do *VEGFI*, apresentaram um padrão de distribuição característico e linear da intensidade das medianas de expressão gênica obedecendo a ordem decrescente: LCTP-SOE > LGCA-ALK- > LGCA-ALK+ (gráfico 13).

Gráfico 13. Padrão de distribuição da intensidade de mediana de expressão dos genes estudados em função das variantes morfológicas de LCTP nodais

Eixo Y: mediana de expressão dos genes estudados; Eixo X: variantes histopatológicas de LCTP nodais – 1: LGCA/ALK+, 2: LGCA/ALK-, 3: LCTP/SOE; 4: LCTA.

5.4.5 Perfil de metilação dos genes *p15INK4b* e *p16INK4a* e correlação com desfechos clínicos

Dos 52 pacientes com LCTP nodais avaliáveis para estudo de metilação, demonstrou-se que o fenótipo metilado para ambos os genes *p15* e *p16* não apresentou correlação prognóstica de forma estatisticamente significativa para SG em análise

univariada (SG 5 anos 49,4% para *p15* não-metilado versus SG 5 anos 36,1% para *p15* metilado, com $p = 0,675$; bem como, SG 5 anos 47,1% para *p16* não-metilado versus SG 5 anos 34,9% para *p16* metilado, com $p = 0,409$). Quando foram analisadas SLP e SLD em 5 anos o estado metilacional dos genes *p15* e *p16* também não apresentou impacto prognóstico (tabela 30 e gráficos 14, 15, 16 e 17).

Tabela 30. SG, SLP e SLD em LCTP em função do estado de metilação dos genes supressores tumorais *p15INK4b* e *p16INK4a*

Genes	N=52 (%)	SG (%)	p value	SLP (%)	p value	SLD (%)	p value
<i>p15INK4b</i>							
Não metilado	34(65,4)	49,4	0,675	33,3	0,936	65,5	0,469
Metilado	18(34,6)	36,1		34,7		60,0	
<i>p16INK4a</i>							
Não metilado	27(51,9)	47,1	0,409	26,5	0,406	58,4	0,506
Metilado	25(48,1)	34,9		46,9		69,2	

SG, SLP e SLD calculadas para 5 anos; SG: sobrevida global; SLP: sobrevida livre de progressão; SLD: sobrevida livre de doença.

Gráfico 14. Sobrevida global em portadores de LCTP em função do estado de metilação do gene *p15INK4b*

Gráfico 15. Sobrevida global em portadores de LCTP em função do estado de metilação do gene *p16INK4a*

Gráfico 16. Sobrevida livre de progressão em portadores de LCTP em função do estado de metilação do gene *p15INK4b*

Gráfico 17. Sobrevida livre de progressão em portadores de LCTP em função do estado de metilação do gene *p16INK4a*

5.4.5.1 Perfil metilacional dos genes *p15INK4b* e *p16INK4a* e correlação com desfechos clínicos – análise univariada de subgrupos histopatológicos

Todos os resultados referentes ao padrão de metilação descritos nesta sessão foram obtidos a partir de análise univariada.

Em relação aos portadores da variante histopatológica LGCA/ALK+, nenhum paciente (0/10) apresentou metilação do gene *p15*. Desta forma, para este subgrupo de pacientes, não foi possível estabelecer correlação entre prognóstico e estado metilacional deste gene (Gráfico 18).

Por outro lado, em relação ao gene *p16*, o fenótipo metilado apresentou SG e SLD inferiores ao não metilado, porém sem significância estatística. As SG e SLD em 5 anos foram de 0,0% para *p16* metilado versus 66,7% para *p16* não-metilado, $p = 0,357$ e p não avaliável, respectivamente. Correlação com SLP não pôde ser estabelecida pois todos os pacientes progrediram antes de completar 5 anos do diagnóstico dessa neoplasia. (Tabela 31).

Gráfico 18. Sobrevida global em pacientes portadores de LGCA-ALK+ de acordo com estado metilacional do gene *p15INK4b*

Quanto aos indivíduos com a variante histopatológica LGCA/ALK- observou-se distribuição semelhante entre os fenótipos metilado e não-metilado para ambos *p15* e *p16*. Não houve correlação entre estado de metilação de *p15* e *p16* e os desfechos de SG, SLP e SLD (Tabela 32).

No subgrupo da variante LCTP/SOE também não houve correlação prognóstica entre o estado metilacional de ambos os genes e os desfechos SG e SLP. Porém, em relação à SLD foi demonstrado, de forma estatisticamente significante, que o fenótipo não-metilado do gene *p16* foi associado a SLD inferior à dos pacientes com fenótipo metilado (SLD em 5 anos de 0,0% para *p16* não-metilado e de 55,6% para *p16* metilado, com $p = 0,019$) (Tabela 33 e Gráfico 19).

Gráfico 19. SLD em 5 anos em portadores de LCTP-SOE de acordo com o estado metilacional do gene *p16INK4a*

Novamente, para os portadores de LCTA não houve diferença estatisticamente significativa entre prognóstico e o estado metilacional de ambos os genes *p15* e *p16* para SG, SLP e SLD (Tabela 34).

Tabela 31. SG, SLP e SLD em 5 anos para portadores de LGCA/ALK+ em função do perfil metilacional dos genes *p15* e *p16*

Genes	N=10 (%)	SG (%)	p-value	SLP (%)	p-value	SLD (%)	p-value
<i>p15</i>							
Não metilado	10(100)	50,0	0,589	0	NA	66,7	NA
Metilado	0 (0)						
<i>p16</i>							
Não metilado	6(60)	66,7	0,357	0	0,908	66,7	NA
Metilado	4(40)	0		0		0	

SG, SLP e SLD estimada em 5 anos; SG: sobrevida global; SLP: sobrevida livre de progressão; SLD: sobrevida livre de doença; NA: não avaliável.

Tabela 32. SG, SLP e SLD para portadores de LGCA/ALK- em função do perfil metilacional dos genes *p15* e *p16*

Genes	N=14 (%)	SG (%)	p-value	SLP (%)	p-value	SLD (%)	p-value
<i>p15</i>							
Não metilado	7(50,0)	85,7	0,589	100,0	0,113	0	NA
Metilado	7(50,0)	71,4		62,5		100,0	
<i>p16</i>							
Não metilado	9(64,3)	88,9	0,433	71,0	0,263	100,0	0,367
Metilado	5(35,7)	60,0		100,0		100,0	

SG, SLP e SLD estimada em 5 anos; SG: sobrevida global; SLP: sobrevida livre de progressão; SLD: sobrevida livre de doença; NA: não avaliável.

Tabela 33. SG, SLP e SLD para portadores de LCTP/SOE em função do perfil metilacional dos genes *p15* e *p16*

Genes	N=19 (%)	SG (%)	p-value	SLP (%)	p-value	SLD (%)	p-value
<i>p15</i>							
Não metilado	12(63,2)	35,2	0,086	0	0,182	52,5	0,128
Metilado	7(36,8)	0		0		0	
<i>p16</i>							
Não metilado	9(47,4)	0	0,203	0	0,102	0	0,019
Metilado	10(52,6)	31,1		0		55,5	

SG, SLP e SLD estimada em 5 anos; SG: sobrevida global; SLP: sobrevida livre de progressão; SLD: sobrevida livre de doença.

Tabela 34. SG, SLP e SLD para portadores de LCTA em função do perfil metilacional dos genes *p15* e *p16*

Genes		N=9 (%)	SG (%)	p-value	SLP (%)	p-value	SLD (%)	p-value
<i>p15</i>								
Não metilado	5(55,6)	20,0	0,477	37,5	0,504	50,0	0,367	
Metilado	4(44,4)	37,5		37,5		100,0		
<i>p16</i>								
Não metilado	3(33,3)	0	0,689	0	0,260	0	NA	
Metilado	6(66,7)	33,3		53,3		66,7		

SG, SLP e SLD estimada em 5 anos; SG: sobrevida global; SLP: sobrevida livre de progressão; SLD: sobrevida livre de doença; NA: Não avaliável.

Em análise multivariada, o fenótipo metilado do gene *p15INK4b* representou fator de prognóstico independente de pior SLP em 5 anos na coorte global de LCTP nodais (HR = 9,888; p = 0,003, IC 95%: 2,235–43,737).

5.4.6 Análise da expressão protéica por imunohistoquímica nos LCTP e correlação com desfechos clínicos

O diagnóstico histopatológico original baseado em critérios morfológicos específicos e no padrão de expressão protéica por imunohistoquímica dos 87 pacientes avaliáveis encontra-se disponível no ANEXO B. Neste anexo, também encontram-se o diagnóstico histopatológico de toda a coorte de pacientes definido após revisão histopatológica centralizada realizada por 3 observadores com experiência na área. A taxa de discordância entre diagnóstico original e após revisão histopatológica foi de 10,3% (9/87). Dos diagnósticos discordantes, em 66,6% (6/9) houve mudança de diagnóstico de LGCA/ALK- para LCTP/SOE CD30+. Em 22,2% (2/9) o diagnóstico de LCTP/SOE foi modificado para LCTA e em 11,2% (1/9) houve alteração do diagnóstico de LGCA/ALK+ para LGCA/ALK-.

Quanto à expressão imunohistoquímica das proteínas codificadas pelos genes de interesse nas amostras de LCTP nodais observou-se mediana de expressão de 50% para CCNA2, 70% para TOP2A e CHEK1, 40% para NFkB (ANEXO E).

Nas diferentes variantes histopatológicas, as medianas de expressão nos LGCA/ALK+ foi de 30% para CCNA2, 70% para TOP2A, 85% para NFkB e 80% para CHEK1. No grupo de LGCA/ALK- a mediana de expressão foi de 60% para CCNA2, 80% para TOP2A, 45% para NFkB e 70% para CHEK1. Nos LCTP/SOE, a mediana de expressão foi de 50% para CCNA2 e NFkB, 70% para TOP2A e CHEK1. Nos LCTA, encontramos mediana de expressão de 50% para CCNA2, 40% para TOP2A, 30% para NFkB e 50% para CHEK1. A mediana de expressão de cada proteína foi utilizada na construção de um modelo para testar a capacidade de discriminação de prognóstico tendo como valor de *cut off* de positividade previamente definido de 50% para CCNA2, 70% para TOP2A, 30% para NFkB e 60% para CHEK1.

Em análise univariada com os valores de *cut off* dispostos no parágrafo anterior, observou-se pior SG de forma estatisticamente significativa para CHEK1 $\geq 60\%$ (HR: 2,874; p=0,023 e IC 95%: 1,155-7,155) na coorte global dos LCTP. A expressão das proteínas CCNA2, TOP2A e NFkB não demonstrou associação com SG, com p = 0,322; p=0,101 e p=0,126, respectivamente. Para a SLP, a expressão de TOP2A $\geq 70\%$ apresentou associação com melhor SLP em 5 anos nos LCTP nodais (HR: 0,319; p=0,041 e IC 95%: 0,107-0,953). Para este mesmo desfecho a expressão das proteínas CCNA2 (p=0,998), NFkB (p=0,237) e CHEK1 (p=0,776) não demonstrou associação prognóstica estatisticamente significativa. Finalmente, para a SLD em 5 anos, a expressão imunohistoquímica de CHEK1 $\geq 60\%$ foi associada a SLD inferior (HR: 3,543; p=0,031 e IC 95% 1,124-11,160),. O mesmo não foi verificado para as proteínas CCNA2 (p=0,409), TOP2A (p=0,465) e NFkB (p=0,378).

Na figura 12 disponibilizamos exemplos de colorações imunohistoquímica referente às proteínas CCNA2, TOP2A, NFkB1 e CHEK1. .

Figura 12. Expressão imunohistoquímica das proteínas codificadas pelos genes pesquisados. A: Ciclina A2 evidencia padrão de expressão nuclear em 80% dos núcleos (paciente L14 de LGCA/ALK+); B: Topoisomerase 2A com padrão de expressão nuclear em 70% dos núcleos (caso L27 de LGCA/ALK-); C: Fator nuclear kappa B com padrão de expressão nuclear em 90% dos núcleos (caso L21 de LGCA/ALK-), D: Check 1, padrão de expressão nuclear em 70% dos núcleos (caso L67 de LGCA/ALK-).

5.5 Fatores de prognóstico para sobrevida global

5.5.1 Análise univariada

Em análise univariada para a coorte de LCTP nodais, as variantes LGCA/ALK+ ($p=0,047$), LCTP/SOE ($p=0,00003$) e LCTA ($p=0,010$), DHL acima do valor superior da normalidade ($p=0,005$), estado funcional ≥ 2 ($p=0,002$), acometimento de 2 ou mais sítios extralinfonodais ($p=0,014$), estágio clínico III ou IV ($p=0,020$), IPI intermediário-alto e alto risco ($p=0,0095$), IPI adaptado de alto risco ($p=0,002$), PIT intermediário-alto e alto risco ($p=0,0374$), PIT adaptado de alto risco ($p=0,001$), *status* de resposta parcial (RP) ou progressão de doença no último seguimento clínico ($p<0,001$), ausência de consolidação com TCTH autólogo ($p<0,001$), doença refratária primária ou progressiva na avaliação ínterina de tratamento ($p=0,007$), doença refratária primária ou progressiva

na avaliação de final de tratamento quimioterápico ($p=0,001$), ausência de realização de tratamento quimioterápico ($p<0,001$), expressão gênica de *CCNA2* $\geq$ mediana ($p=0,030$) e expressão imunohistoquímica de *CHEK1* $\geq 60\%$ ($p = 0,016$) foram associadas a pior SG.

5.5.1.1 Análise univariada por subgrupo histológico

Em análise univariada considerando-se os quatro principais subgrupos histológicos de LCTP nodais, nenhuma variável de expressão gênica ou de metilação gênica apresentou correlação significativa com SG nos subgrupos de LGCA/ALK+ e LGCA/ALK-. Em relação aos LCTP/SOE, a expressão dos genes *CCNA2* $\geq$ mediana ($p<0,001$), *TOP2A* $\geq$ mediana ($p=0,0001$), *CHEK1* $\geq$ mediana ($p=0,0005$), *IKBkB* $\geq$ mediana ($p=0,06$) estiveram associados a pior SG.

5.5.2 Análise multivariada

Em análise multivariada, utilizando o modelo de regressão logística de Cox identificamos como variáveis independentes de pior SG a expressão do gene *CCNA2* $\geq$ a mediana ($p = 0,002$) e o estado funcional pelo ECOG ≥ 2 ($p = 0,008$) (Tabela 35).

Tabela 35. Fatores de prognósticos independentes associados a pior SG em análise multivariada em portadores de LCTP nodais

Variável	HR	DP	z	p-value	IC 95%
Expressão do gene <i>CCNA2</i> $\geq$ mediana	1,352	0,131	3,12	0,002	1,118-1,635
ECOG	3,475	1,641	2,64	0,008	1,377-8,769

HR: razão de risco; DP: desvio padrão; IC: intervalo de confiança.

Em análise multivariada pelo modelo de regressão logística de Cox combinando-se as variáveis IPI, expressão gênica $\geq$ mediana de cada gene estudado, *status*

metilacional dos genes *p15* e *p16* e expressão protéica por imunohistoquímica $\geq$ aos *cut offs* anteriormente definidos (p do modelo = 0,005), observamos como variáveis prognósticas associadas a pior SG de forma independente do IPI, a expressão imunohistoquímica de CHEK1 $\geq$ 60% ($p=0,005$) (Tabela 36). Em oposição, a expressão das proteínas TOP2A $\geq$ 70% ($p = 0,005$) e NFkB $\geq$ 30% ($p=0,046$) foram associadas a melhor SG.

Tabela 36. Fatores de prognóstico de SG independentes do IPI em análise multivariada em portadores de LCTP nodais

Variável	HR	DP	z	p-value	IC 95%
IPI	2,042	0,600	2,43	0,015	1,148-3,632
Proteína NFkB $\geq$ 30%	0,302	0,183	-1,99	0,046	0,104-0,982
Proteína CHEK1 $\geq$ 60%	5,581	3,951	2,62	0,009	1,557-21.979
Proteína TOP2A $\geq$ 70%	0,894	0,773	-2,79	0,005	0,164-0,487

HR: razão de risco; DP: desvio padrão; IC: intervalo de confiança.

Em análise multivariada com as variáveis PIT (*Prognostic Index for T-cell Lymphomas*), expressão de cada gene avaliado $\geq$ mediana, *status* metilacional dos genes *p15* e *p16*, e expressão protéica $\geq$ aos *cut offs* estabelecidos (p do modelo = 0,006), destacaram-se como variáveis prognósticas associadas a pior SG de forma independente do PIT, expressão imunohistoquímica de CHEK1 $\geq$ 60% ($p=0,011$) (Tabela 37). A expressão das proteínas NFkB $\geq$ 30% e TOP2A $\geq$ 70% estiveram relacionadas a melhor SG de forma independente do PIT.

Tabela 37. Fatores de prognósticos independentes do PIT associados a pior SG em análise multivariada

Variável	HR	DP	z	p-value	IC 95%
PIT	2,792	1,187	2,42	0,016	1,213-6,425
Proteína	0,318	0,183	-1,98	0,048	0,102-0,987
NFkB $\geq$ 30%					
Proteína	0,080	0,072	-2,81	0,005	0,014-0,468
TOP2A $\geq$ 70%					
Proteína	5,570	3,781	2,53	0,011	1,472-21.072
CHEK1 $\geq$ 60%					

HR: razão de risco; DP: desvio padrão; IC: intervalo de confiança.

5.6 Fatores de prognóstico para sobrevida livre de progressão

5.6.1 Análise univariada

Em análise univariada para coorte de pacientes com LCTP nodais foi demonstrado que, as variantes morfológicas LGCA/ALK+ ($p = 0,002$), LCTP/SOE ($p < 0,001$), LCTA ($p = 0,0178$), estado funcional ≥ 2 ($p = 0,026$), IPI alto risco ($p = 0,037$), PIT de alto risco ($p = 0,025$), RP ou progressão de doença após obtenção de resposta ($p < 0,0001$), ausência de consolidação com TCTH autólogo ($p = 0,009$), RP ou progressão na análise ínterina de tratamento ($p = 0,004$), progressão ou refratariedade primária ao término da quimioterapia ($p < 0,001$), não realização de quimioterapia ($p = 0,031$) e expressão imunohistoquímica de TOP2A $< 70\%$ ($p = 0,023$) foram associadas a pior SLP.

5.6.1.1 Análise univariada nos subgrupos histológicos

Em análise univariada considerando-se os quatro principais subgrupos histopatológicos de LCTP nodais, nenhuma variável molecular de expressão gênica ou metilação gênica apresentou correlação estatisticamente significativa no LGCA/ALK+. No grupo de LGCA/ALK-, a expressão dos genes *CCNA2* contínua ($p=0,011$) e expressão de *TOP2A* contínua ($p=0,013$) foram relacionadas a melhor SLP, enquanto *CCNA2* < mediana ($p=0,025$), *CHEK1* < mediana ($p = 0,047$), *VEGF1* $\geq$ mediana ($p = 0,041$) estiveram associados a pior SLP.

Para o subgrupo de LCTP/SOE, a expressão contínua de *CCNA2* ($p=0,031$), *TOP2A* ($p=0,007$) e *IKBkB* ($p=0,019$) estiveram associadas a SLP inferior, bem como dos genes *CCNA2* $\geq$ mediana ($p=0,036$) e *IKBkB* $\geq$ mediana ($p=0,036$).

5.6.2 Análise multivariada

Em análise multivariada, tomando-se os fatores que apresentaram significância estatística na análise univariada, construiu-se um modelo de regressão logística (p do modelo = 0,005). A única variável de prognóstico independente para pior SLP foi o estado funcional ≥ 2 pelo ECOG ($p = 0,006$) (Tabela 38)

Tabela 38. Fatores de prognósticos independentes associados a pior SLP em análise multivariada

Variáveis	HR	DP	z	p-value	IC 95%
ECOG	3,488	1,597	2,73	0,006	1,421-8,557

HR: razão de risco; DP: desvio padrão; IC: intervalo de confiança

Em análise multivariada, contruindo-se um modelo de regressão logística onde foram combinadas as variáveis constituíndes do IPI, PIT, expressão dos genes estudados

$\geq$ a mediana, o *status* metilacional dos genes *p15* e *p16*, e a expressão protéica por imunohistoquímica $\geq$ ao valor de *cut off* determinado para cada proteína (p do modelo = 0,004), destacaram-se como variáveis de prognóstico independentes para pior SLP, idade ≥ 60 anos (p = 0,040), DHL $\geq$ ao valor superior da normalidade (p = 0,016), estado funcional pelo ECOG ≥ 2 (p = 0,002), ≥ 2 sítios extralinfonodais comprometidos (p = 0,003), estado metilado do gene *p15* (p = 0,003) e IPI intermediário-alto e de alto risco (p = 0,006), conforme disposto na Tabela 39.

Tabela 39. Fatores prognósticos independentes associados a pior SLP em análise multivariada por modelo específico

Variáveis	HR	DP	Z	p-value	IC 95%
Idade ≥ 60 anos	8,463	8,797	2,05	0,040	1,103-64,922
DHL $\geq$ VSN	6,626	11,545	2,41	0,016	2,178-201,566
ECOG ≥ 2	12,678	20,088	3,06	0,002	5,681-282,944
≥ 2 sítios EN	22,293	40,116	3,00	0,003	6.553-275,831
p15 metilado	9,888	7,501	3,02	0,003	2,235-43,737
IPI alto risco	10,020	2,967	-2,73	0,006	1,967-30,567

HR: razão de risco, DP: desvio padrão, IC: intervalo de confiança, DHL: desidrogenase láctica; VSN: valor superior da normalidade, EN: extralinfonodais, IPI: índice prognóstico internacional.

Em análise multivariada, construindo-se um modelo de regressão logística combinando-se as variáveis IPI, expressão gênica $\geq$ mediana, *status* metilacional dos genes *p15* e *p16*, e expressão protéica $\geq$ aos *cut offs* anteriormente determinados (p do modelo = 0,002), destacaram-se como variáveis de prognóstico independentes do IPI associadas a pior SLP, presença de envolvimento extralinfonodal de dois ou mais sítios (p = 0,040) e expressão imunohistoquímica de CHEK1 $\geq 60\%$ (p = 0,034) (Tabela 40). A expressão da proteína TOP2A $\geq 70\%$ foi associada a melhor SLP.

Tabela 40. Fatores prognósticos independentes do IPI associados a pior SLP em análise multivariada

Variáveis	HR	DP	z	p-value	IC 95%
TOP2A $\geq$ 70%	0,724	0,641	-2,96	0,003	0,127-0,411
$\geq$ 2 sítios EN	3,184	1,795	2,05	0,040	1,054-9,616
CHEK1 $\geq$ 60%	4,000	2,617	2,12	0,034	1,109-14,424

HR: razão de risco, DP: desvio padrão, IC: intervalo de confiança, EN: extralinfonodais.

Em análise multivariada, construindo-se outro modelo de regressão logística onde foram combinadas as variáveis PIT, expressão gênica $\geq$ mediana de cada gene estudado, *status* metilacional dos genes *p15* e *p16*, e expressão protéica por imunohistoquímica $\geq$ aos *cut offs* (p do modelo = 0,006), destacou-se como variável de prognóstico associada a pior SLP de forma independente do PIT a expressão imunohistoquímica de CHEK1 $\geq$ 60% (p = 0,041), enquanto expressão de TOP2A $\geq$ 70% foi associada a bom prognóstico.(Tabela 41).

Tabela 41. Fatores prognósticos independentes do PIT associados a pior SLP em análise multivariada

Variáveis	HR	DP	Z	p-value	IC 95%
CHEK1 $\geq$ 60%	3,712	2,384	2,04	0,041	1,054-13,069
TOP2A $\geq$ 70%	0,100	0,873	-2,65	0,008	0,018-0,551

HR: razão de risco, DP: desvio padrão, IC: intervalo de confiança.

5.7 Fatores de prognósticos para sobrevida livre de doença

5.7.1 Análise univariada de toda a coorte de LCTP

Em análise univariada para a coorte de LCTP demonstrou-se que a variante LGCA/ALK+ (p=0,0006), LCTP/SOE (p=0,001), LCTA (p=0,0035), PIT

intermediário-alto e alto risco ($p=0,0184$), *status* de RP ou progressão no último seguimento clínico ($p=0,0005$) e ausência de consolidação com TCTH autólogo ($p=0,041$) estiveram associados a piora SLD em 5 anos.

5.7.1.1 Análise univariada por subgrupos histológicos

Em análise univariada considerando-se os quatro subgrupos histológicos de LCTP, nenhuma variável molecular de expressão ou de metilação foi associada a pior SLD nos LGCA/ALK+, LGCA/ALK- e LCTA. Entretanto, no subgrupo de LCTP/SOE evidenciou-se que o estado não-metilado do gene *p16INK4a* ($p = 0,019$), expressão do gene *CCNA2* $\geq$ mediana ($p=0,003$), *TOP2A* $\geq$ mediana ($p=0,013$) e *CHEK1* $\geq$ mediana ($p = 0,009$) foram associados a pior SLD.

5.7.2 Análise multivariada

Em análise multivariada com as variáveis estatisticamente significantes no estudo univariado não encontramos nenhum fator de prognóstico independente para SLD.

6. DISCUSSÃO

6.1 Características clínico-laboratoriais e epidemiológicas

Este estudo representa a mais completa avaliação de características clínico-patológicas e epidemiológicas de linfomas de células T periféricas nodais disponível na literatura nacional.

No que se refere à distribuição dos casos por variante histopatológica, assim como demonstrado por outros autores em projetos cooperativos internacionais (*International T-cell Lymphoma Project*, 2008; FOSS et al, 2011; PETRICH et al, 2014), no presente estudo, prevaleceu o subtipo LCTP/SOE que ocorreu em 34,9% (22/63) dos casos. Porém, diferentemente do encontrado em outro estudo com 1153 casos de LCTP provenientes de distintas regiões do mundo, catalogados no *International T-cell Lymphoma Project* (ITLP), onde o LCTA foi a segunda variante histopatológica mais frequente, em nossa casuística o segundo subtipo mais comum foi o LGCA/ALK-. O terceiro mais prevalente foi o LGCA/ALK+ e o LCTA foi encontrado em número menor de pacientes.

A prevalência dos LCTP apresenta variação geográfica substancial. Entre todos os LNH, os de linhagem T corresponderam a 21% dos casos em Hong Kong e a 4% dos casos em Vancouver (Canadá) (ANDERSON et al, 1998).

De forma interessante, encontramos maior incidência de linfomas de grandes células anaplásicas ALK+ e ALK- e pequeno número de casos de LCTA. Nossos resultados diferem dos dados europeus e assemelham-se ao encontrado na população asiática e da América do Norte, que apresentam menor incidência do linfoma de células T angioimunoblástico.

Possivelmente, esta diferença regional pode ser aplicada à América Latina conforme demonstrado em nossos resultados. É, entretanto, essencial reconhecer que o

pequeno número de casos de LCTA encontrados em nossa população pode estar associada à dificuldade diagnóstica desta variante patológica.

Este subtipo de linfoma pode mimetizar situações clínicas corriqueiras na prática médica a exemplo de infecções virais, reações medicamentosas e doenças do tecido conjuntivo. Em geral apresentam-se com sintomas anêmicos, febre, artralgias, rash cutâneo, emagrecimento e pequeno volume tumoral.

Além disso, usualmente são necessários espécimes teciduais bem representativos, obtidos preferencialmente por biópsia excisional para um diagnóstico adequado. Entretanto, em nosso meio tem se tornado cada vez mais comum a obtenção de amostras por agulha grossa, dificultando dessa forma a obtenção de diagnósticos de certeza dessa variante histopatológica.

Destacamos também a grande prevalência do linfoma de grandes células anaplásicas verificada em nossa população. Embora em desacordo com os dados obtidos pelo ITLP, onde houve menor prevalência destes casos, estudo recente envolvendo 8802 casos de LCTP provenientes do banco de dados americano *Surveillance Epidemiology and End Results* (SEER-18) demonstrou que este linfoma representa o segundo subtipo de LNH de células T mais comum na América do Norte. Neste estudo, os LGCA representaram 24,2% dos casos, principalmente às custas da variante ALK+ (PETRICH et al, 2014). Assim, reforçamos a real possibilidade de maior prevalência dos linfomas anaplásicos no continente americano, incluindo a América Latina.

Por outro lado, em nosso estudo excluímos muitos pacientes com idade igual ou superior a 60 anos. A mediana de idade de nossa casuística foi de 47 anos (16-81 anos). A maior inclusão de pacientes com idade inferior a 40 anos, onde sabidamente

predomina o subtipo anaplásico ALK+, também pode ter influenciado a discrepância epidemiológica observada em nossa coorte.

Desta forma, em relação à frequência dos subtipos de LCTP nodais em nossa coorte, concluímos que possuímos maior semelhança com o padrão norte-americano do que com o europeu ou asiático. Isto reforça a existência de possível heterogeneidade biológica ainda não esclarecida para o padrão característico de distribuição geográfica dos LCTP predominantemente nodais.

No presente estudo observou-se taxa de discordância entre o diagnóstico inicial e após revisão histopatológica de 10,3% (9/87 casos). Este resultado foi similar ao encontrado pelo grupo ITLP, que evidenciou discrepância de diagnóstico em 10,4% dos casos. Estes dados sugerem que marcadores diagnósticos mais específicos são claramente necessários para melhorar a acurácia e reprodutibilidade do diagnóstico dessas neoplasias.

Em nosso estudo, utilizamos novos marcadores imunohistoquímicos para identificar as células T *helper* foliculares (células neoplásicas de origem dos LCTA), como CXCL-13, PD-1 e ICOS, os quais permitiu-nos readequar o diagnóstico de LCTP/SOE para LCTA em parcela considerável dos casos. Além disso, o uso de critérios morfológicos mais restritos, capazes de identificar células “*hallmark*” e o padrão de expressão forte e homogêneo do antígeno ki-1 (CD30) foi fundamental para estabelecer o diagnóstico diferencial entre o LGCA/ALK- e o LCTP/SOE com expressão de CD30. Esta diferenciação é fundamental devido à diferença de prognóstico destas duas neoplasias.

Dados publicados por diferentes autores demonstraram que a concordância histopatológica dos LCTP varia amplamente entre os hematopatologistas. Entretanto, esta concordância tem se mostrado elevada e acima de 90% nos linfomas

LGCA/ALK+, na leucemia-linfoma de células T do adulto e no linfoma de células NK/T extranodal tipo nasal. Isto se deve à existência de marcadores diagnósticos específicos, como a proteína ALK1, soropositividade para HTLV-1 e imunoexpressão de proteínas específicas do vírus Epstein-Barr, respectivamente. Contrariamente, a concordância e a reprodutibilidade diagnóstica tem se mostrado inferior a 85% para outros subtipos de linfoma de células T como o LCTP/SOE, LGCA/ALK- e angioimunoblástico (VOSE et al, 2008).

A busca de melhores estratégias de subclassificação dos LCTP com base histopatológica tem se intensificado nos últimos anos, devido às evidências incontestáveis dessa subcategorização no impacto prognóstico global dessas neoplasias. Além disso, o tratamento tem sido cada vez mais diferenciado pelo subtipo histológico a exemplo da necessidade de consolidação com o uso de transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas (WENT et al, 2006; PETRICH et al, 2014).

Estudo recente com 8802 pacientes norte-americanos com LCTP, demonstrou que os subtipos de alto risco como LCTP/SOE, LCTA, LGCA/ALK- e LLTA e de muito alto risco, a exemplo dos linfomas T hepatoesplênico, T enteropático e NK/T extranodal tipo nasal apresentavam pior sobrevida global. Variáveis significantes foram utilizadas na construção de novo índice de prognóstico, com base na histologia, idade superior a 55 anos, raça negra e o estágio clínico do paciente (PETRICH et al, 2014).

Assim como demonstrado nas maiores séries contendo pacientes com LCTP disponíveis, neste estudo observamos predomínio dessas neoplasias no sexo masculino. Entretanto, nossos pacientes apresentaram mediana etária inferior à literatura, de 47 anos. No estudo do ITLP, a mediana de idade foi de 62 anos. Uma das possíveis explicações para esse resultado deve-se ao número elevado de pacientes com

LGCA/ALK+ encontrado em nossa casuística, pois esta neoplasia é mais frequente em jovens, particularmente com idade inferior a 40 anos. Por outro lado, também observamos elevado número de pacientes jovens com LGCA/ALK- e de LCTP/SOE, os quais usualmente ocorrem preferencialmente em indivíduos acima de 60 anos.

De forma surpreendente, nossos pacientes apresentaram excessivo número de variáveis associadas a prognóstico desfavorável. DHL elevada foi observada em 66,7% dos casos, 81% apresentaram doença avançada (estádios III ou IV) e observou-se ainda envolvimento de dois ou mais sítios extralinfonodais em 42,9% dos casos. Pacientes com *performance status* ruim (ECOG $\geq$ 2) foram observados na maior parte dos casos (60,9%), com exceção do LGCA/ALK-, sendo encontrado em somente 44,4% dos casos. Este fato, pode explicar, ao menos em parte, os melhores desfechos de SG e SLP encontrados neste subgrupo de LCTP. Os escores de prognóstico IPI e PIT foram eficazes em predizer desfechos desfavoráveis para todos os subtipos de LCTP nodais. Foi surpreendente, entretanto, que isso tenha ocorrido também para o linfoma angioimunoblástico, neoplasia caracteristicamente não associada a elevado volume tumoral, mas onde o desfecho reservado deve-se em grande parte aos fenômenos de desregulação imune associados a esses tumores.

Os pacientes que apresentaram pior IPI/PIT pertenciam as variantes LCTP/SOE e LCTA. Este dado encontra-se em concordância com a literatura e justifica o mau prognóstico associado a estas neoplasias. Porém, diferente do observado na maior parte dos estudos, em nossa casuística, os portadores da variante LGCA/ALK- apresentaram idade inferior a 60 e IPI/PIT de risco baixo e intermediário-baixo em parcela considerável dos casos.

Por outro lado, nos pacientes com LGCA/ALK+ notou-se proporção elevada de IPI e PIT de risco intermediário-alto e alto. Este dado pode explicar, pelo menos em

parte, as reduzidas taxas de SG e SLP destes pacientes em nossa casuística, contrariamente ao descrito na literatura.

A imunoexpressão da proteína ALK1 é classicamente considerada como variante associada a bom prognóstico, de forma independente no LGCA (GAYSCONE et al, 1999; ten BERGE et al, 2000). Entretanto, estudos recentes demonstraram resultados contraditórios.

Reconhece-se cada vez mais que o prognóstico associado à expressão desta proteína depende da idade de apresentação da neoplasia, do IPI, da expressão do antígeno CD56 pela célula neoplásica e da dosagem de B2-microglobulina (FALLINI et al, 1999; SUZUKI et al, 2000; SIBON et al, 2012). Em trabalho pioneiro, Fallini et al. em 1999, avaliaram 78 portadores de LGCA, dos quais 53 casos foram ALK+ e 25 casos ALK-. A SG em 5 anos foi de 71% para o grupo ALK+ e em 15% no ALK-. No entanto, ao estratificar os pacientes do grupo ALK+ de acordo com o IPI, a SG em 5 anos foi de 94% verificada para o IPI de 0-1 e reduziu para 41% em pacientes com $IPI \geq 2$. Desta forma, o bom prognóstico associado à expressão de ALK variou substancialmente de acordo com o IPI.

Paralelamente, Suzuki e colaboradores avaliaram 143 portadores de LGCA. Os autores demonstraram que a expressão da proteína ALK sofreu influência do IPI e da expressão do antígeno CD56.

Recentemente, Sibon e colaboradores, analisando 138 casos de LGCA, demonstraram que indivíduos com idade inferior a 40 anos apresentavam SG semelhante independentemente da expressão de ALK. Por outro lado, em indivíduos acima de 40 anos, a presença de ALK foi associada a maior SG em relação aos casos ALK- (SIBON et al, 2012). Portanto, a ausência de expressão de ALK em jovens, particularmente com idade inferior a 40 anos não está associada a pior prognóstico nos

LGCA. Ou seja, indivíduos com idade inferior a 40 anos com o subtipo LGCA ALK- apresentam prognóstico semelhante aos com LGCA ALK+.

Outro dado surpreendente do nosso estudo refere-se às altas taxas de SG e SLP encontrada para os linfomas anaplásicos ALK-. Acreditamos, que este resultado tenha decorrido do fato de que em nossa casuística houve predomínio deste linfoma em indivíduos jovens, metade dos casos apresentavam idade inferior a 40 anos e 80% estavam abaixo dos 60 anos. Além disso, a maioria apresentava bom *performance status*, com 55,6% dos casos apresentando ECOG < 2).

Por outro lado, os desfechos desfavoráveis encontrados no subgrupo ALK+ podem ter decorrido do elevado número de pacientes com pobre *performance status*, pois 71,4% apresentavam ECOG ≥ 2 e 50% apresentavam IPI de risco intermediário-alto ou alto. Desta forma, concluímos que no presente estudo, a expressão da proteína ALK1 não se comportou como variável independente associada a bom prognóstico. Desta forma, outros fatores como idade e IPI foram capazes de suplantarem o impacto prognóstico favorável associado a expressão desta proteína.

Em concordância com a maioria dos estudos epidemiológicos, observamos também um elevado número de óbitos em nossa casuística. Após o tratamento quimioterápico de primeira linha, 31,7% dos indivíduos foram a óbito. Entretanto, 54% dos pacientes da nossa coorte apresentavam-se em óbito quando foram censurados para data do último seguimento clínico (taxa de mortalidade total).

Esta elevada mortalidade pode ser explicada pela associação de diversos fatores, que em conjunto, conferiram prognóstico adverso. Destacamos a presença de características clínico-laboratoriais desfavoráveis como idade avançada, níveis elevados de DHL, estágio clínico III ou IV, pobre *performance status* e IPI ou PIT de alto risco. Outros fatores também estão associados a maior agressividade biológica

neste grupo de doença. Dentre eles, podemos enfatizar a elevada expressão de glicoproteína P (gpP), associada a fenótipo de resistência a múltiplas drogas, bem como, inativação de genes supressores tumorais como *TP53* e a pobre resposta primária a poliquimioterapia. Usualmente os linfomas de fenótipo T apresentam-se resistentes aos esquemas contendo agentes antracíclicos. Em geral apresentam duração de resposta curta e recidivas precoces e frequentes. Assim como demonstrado no estudo de Vose et al. (2008) e Petrich et al. (2014), também encontramos como principal causa de óbito, a progressão de doença, seguida por complicações infecciosas. Não infreqüentemente houve associação destes dois fatores em nossa casuística (VOSE et al., 2008; PETRICH et al., 2014).

Acreditamos ainda, que essa elevada proporção de óbitos que encontramos em nossa casuística, esteja associada ao longo tempo transcorrido entre início dos sintomas da neoplasia e o acesso ao sistema público de saúde. Verificamos que em nosso meio, os pacientes demoram para ter acesso aos serviços de saúde. Primeiro para fazer o diagnóstico e posteriormente para obterem tratamento específico. Isto faz com que quando os pacientes consigam chegar ao serviço terciários se apresentem com doença em estágio avançado e pobre *performance status*, inviabilizando a aplicação de tratamento com intuito curativo. Consequentemente, eleva-se a probabilidade de óbito, o qual, muitas vezes, ocorre antes mesmo do início do tratamento quimioterápico específico. Estudo de Xavier et al. (2013), envolvendo portadores de linfoma difuso de grandes células B, tratados em centro público universitário brasileiro de referência de tratamento de câncer, demonstrou associação direta entre o tempo transcorrido desde o início dos sintomas até o acesso à serviços especializados e sobrevida (XAVIER et al, 2013).

Os pacientes incluídos em nosso estudo, experimentaram poliquimioterapia contendo antracíclico como CHOP ou CHOEP em 74,6% (47/63) dos casos. Entretanto, entre os pacientes tratados, somente 44,8%/(26/58) completaram todos os ciclos propostos. A quimioresistência primária foi 7,9% (5/63). Observamos também 31,7% (20/63) de óbitos antes do término do tratamento de primeira linha, devido a progressão de doença. A taxa de resposta global foi de 60,3% (38/63) e apenas 34,9% (22/63) puderam experimentar TCTH autólogo como terapia de consolidação.

Nossos resultados estão em acordo com os observados na maior parte dos estudos. Na série de 1153 casos de LCTP avaliados no ITLP, 85% receberam regime quimioterápico contendo antracíclico. Porém, ao contrário do demonstrado para pacientes com linfoma difuso de grandes células B, a maior parte dos casos, excluindo-se os anaplásicos ALK+ não se beneficiaram destes esquemas (VOSE et al, 2008).

A maior parte dos LCTP nodais tem sido tratados com quimioterapia CHOP-símile, com taxa de RC variável de 50% a 70%. Entretanto, apresentam SG a longo prazo de apenas 30% a 40% (REISER et al., 2002; EVENS et al., 2004; KANSARA et al., 2014). Em nosso estudo, encontramos RC de 46% com terapia de primeira linha, com SG em 5 anos de 45,6%. Nossos resultados confirmam o mau prognóstico associado aos LCTP nodais e corroboram a necessidade de novas estratégias terapêuticas para este grupo de neoplasia.

A causa do o mau prognóstico dos LCTP em comparação aos de fenótipo B agressivo não são bem conhecidas. Porém, dados emergentes revelam que a elevada expressão de glicoproteína P em células T podem estar associadas à pobre resposta com quimioterapia CHOP-símile. A glicoproteína P, codificada pelo gene *MDR-1*, funciona como transportador transmembrana dependente de ATP, responsável pelo efluxo

intracelular de determinadas drogas, particularmente os antracíclicos e alcalóides de vinca, que fazem parte dos esquemas CHOP-símbles (KANSARA et al, 2014).

Obervamos ainda que os LGCA apresentaram desfechos de sobrevida superiores aos LCTP não-anaplásicos. A RG foi de 71,4% nos LGCA/ALK+ e de 77,8% nos LGCA/ALK-. Os LCTA e os LCTP/SOE apresentarm RG de 44,4% e 41%, respectivamente. Os LGCA/ALK+ apresentarm pior SG em 5 anos (45,7%) do que os LGCA/ALK- (83,3%). Nos LCTA a SG em 5 anos foi de 27,8% e nos LCTP/SOE de 19,2%.

No estudo de Savage et al. (2008), os LGCA ALK+ e negativos apresentaram RG superior a 75% e SG em 5 superior a 60% (SAVAGE et al, 2008). Além disso, em contraposição aos nossos resultados, Savage et al. demonstraram maior SLP e SG em LGCA/ALK+ em compração aos LGCA/ALK-. Entretanto, a própria autora sugere que isso pode ser resultado das diferenças etárias no momento do diagnóstico dessas neoplasias, visto que casos ALK positivos tendem a ser mais jovens que àqueles ALK negativos.

Em nossa casuística, os casos ALK+ ocorreram em faixa etária maior do que os ALK-. Encontramos proporção elevada de pacientes com idade inferior a 40 anos nos anaplásicos ALK-. Da mesma forma, Sibon et al. (2012) observaram que a expressão da proteína ALK1 não foi associada de forma independente ao prognóstico em pacientes abaixo dos 40 anos. Nesta faixa etária, os desfechos foram independentes da expressão de ALK (SIBON et al, 2012).

Além da idade, acreditamos que o desfecho favorável observado em nosso grupo de linfoma anaplásico ALK- possa ter decorrido do bom *performance status* dos pacientes, sendo que ECOG < 2 foi observado em 55,6% dos casos. Além disso, a maior

parte destes pacientes (61,2%) foram submetidos a consolidação com TCTH autólogo em primeira RC ou RP.

O papel do TCTH autólogo em primeira linha no LCTP nodais permanece controverso. Porém, os dois principais estudos nesta área favorecem o uso desta abordagem terapêutica. Reimer et al. (2009) publicaram resultados de estudo prospectivo multicêntrico com TCTH autólogo em primeira linha em 83 casos LCTP nodais. Dos pacientes selecionados para o estudo, apenas 66% realizaram o procedimento. A progressão de doença foi a principal razão impeditiva de realizar o TCTH autólogo. A SG em 3 anos foi de 71% para o grupo que experimentou o transplante e de 11% para os que não realizaram o procedimento (REIMER et al., 2009).

Em outro estudo, foram avaliados 160 casos de LCTP nodais não ALK+. A maioria dos pacientes apresentava doença avançada e $IPI \geq 2$. Os pacientes foram tratados com seis ciclos de CHOEP e, os responsivos à esta terapia, submetidos a TCTH autólogo. Dos 160 pacientes, 115 (71%) realizaram o procedimento. As SG e SLP em 5 anos foram de 51% e 44%, respectivamente. Análise de subgrupo demonstrou que os pacientes que mais se beneficiaram do transplante apresentavam LGCA-ALK negativo, com SG em 5 anos de 70% versus 47% e 52% para LCTP/SOE e LCTA, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com os nossos dados, corroborando a hipótese de que os nossos pacientes com linfoma anaplásico ALK- apresentaram melhor sobrevida devido à indicação precoce do TCTH autólogo (d'AMORE et al., 2012).

Como possíveis explicações para os nossos desfechos desfavoráveis nos LGCA ALK+, destacamos a elevada proporção de casos com estado funcional ruim ($ECOG \geq 2$ em 71,4%) e de IPI de alto risco (50%). No estudo de Savage et al. (2008), os

LGCA/ALK+ também apresentaram sobrevida livre de falha em 5 anos de 49%. Isto sugere a necessidade de novas terapias ou tratamento mais intensificado para este grupo de pacientes. Especula-se que a adição de etoposídeo ao CHOP ou quimioterapia em altas doses seguida de TCTH autólogo possa ter papel mais robusto no tratamento de primeira linha desta neoplasia, particularmente para os casos com IPI de risco intermediário-alto ou alto.

6.2 Marcadores moleculares e de imunohistoquímica

Neste estudo verificamos que a hiperexpressão do gene regulador do ciclo celular *CCNA2* foi associada a pior SG nos LCTP nodais. De forma semelhante, Cuadros et al. (2007) em estudo de 35 casos de LCTP nodais, sendo 23 LCTP/SOE e 12 LCTA, utilizando a plataforma *Oncochip microarray* identificaram cinco distintos agrupamentos (*clusters*) gênicos. O *cluster* composto de 55 genes de proliferação e de controle do ciclo celular, incluindo o *CCNA2*, foi associado a pior prognóstico. A SG nos grupos com baixa e alta expressão deste gene foi de 31 meses e 15 meses respectivamente (CUADROS et al., 2007).

Por outro lado, os *clusters* gênicos C e D compreendendo respectivamente, 277 e 194 genes de resposta inflamatória, em especial os genes da via do fator nuclear kappa B (*NFkB1* e *IKBkB*) apresentaram correlação inversa em termos de sobrevida ao cluster proliferativo. Pacientes com alta expressão de *NFkB1* e *IKBkB* apresentaram melhores desfechos de sobrevida. Em nosso estudo a hiperexpressão do gene *IKBkB* $\geq$ mediana apresentou tendência de associação com pior SG em 5 anos. A SG em 5 anos foi de 51,2% para expressão de *IKBkB* $<$ mediana e de 28,2% para *IKBkB* $\geq$ mediana, $p = 0,06$. Em oposição, observamos que a expressão da proteína *NFKB* foi associada a

melhor prognóstico na coorte geral de LCTP nodais (SG 50,4% expressão *NFKB* positiva e de 22,8% *NFKB* negativa, com $p = 0,046$).

Martinez-Delgado et al., em estudo com 39 LCTP/SOE encontraram que pacientes com alta expressão de genes da via NFkB apresentaram maior SG em relação àqueles com hipoeexpressão destes genes, apresentando SG em 5 anos de 40% e 0% respectivamente. (MARTINEZ-DELGADO et al, 2005).

A hiperexpressão do gene bloqueador do inibidor do fator *NFkB* (*IKBkB*) ativa a via *NFkB*. Consequentemente, produz acúmulo deste fator no núcleo celular promovendo sua contínua ativação. Outros autores demonstraram que portadores de linfoma de Hodgkin e mieloma múltiplo tem a via NFkB envolvida em sua patogênese. Neste contexto, sua hiperexpressão está associada a progressão tumoral, ativação da migração celular, da oncogênese e da proliferação vascular (FEINMAN et al., 2004; DEMCHENKO et al., 2010). Desta forma, possível efeito “protetor” dos genes e proteínas relacionados a resposta inflamatória na progressão dos LCTP nodais permanece duvidoso, e demais estudos devem ser conduzidos endereçando essa questão.

De forma surpreendente, verificamos que a hiperexpressão relativa dos genes *CCNA2*, *TOP2A* e *CHEK1*, relacionados a proliferação e regulação do ciclo celular, foi associada com diferentes prognósticos nos vários subtipos histológico de LCTP nodal. A hiperexpressão dos genes *CCNA2*, *TOP2A* e *CHEK1* associou-se a pior SG e SLP em 5 anos no LCTP/SOE e a melhor SLP em 5 anos nos LGCA/ALK-.

Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo disponível na literatura médica que associa significado prognóstico distinto de genes relacionados a proliferação e regulação do ciclo celular em função de diferentes variantes patológicas de LCTP nodais. Vale destacar, que para portadores de LCTP-SOE o significado adverso destes genes de cunho proliferativo, observado em nossa corte, esteve de acordo com o

encontrado no estudo conduzido por Martinez-Delgado, no entanto, pacientes portadores de LGCA não foram contemplados na análise conduzida por este autor, e segundo nossos dados, nesse subgrupo de pacientes esses mesmos genes não foram associados a progressão de doença determinando desfechos desfavoráveis, o que nos leva a hipotetizar que outras vias moleculares estejam implicadas na gênese e progressão tumoral dos LGCA-ALK negativos.

Diversos estudos, a exemplo dos conduzidos por de Leval et al. (2007) e Piccaluga et al. (2007) demonstraram que diversos genes envolvidos na angiogênese, encontram-se hiperexpressos no linfoma T angioimunoblástico, notavelmente o gene secretor do fator de crescimento derivado do endotélio vascular (*VEGF1*). de Leval (2007) sugeriu que a expressão de VEGF é estimulada pelo componente não-neoplásico do microambiente tumoral. Porém, Piccaluga et al (2007) et al., usando preparações teciduais de alta pureza, com mais de 70% de células tumorais, enfatizaram que a secreção anormal de VEGF origina-se em células neoplásicas.

Em nosso estudo, demonstramos que a hiperexpressão do gene *VEGF1* está associada a pior SG e SLP em 5 anos nos linfomas anaplásicos ALK- e LCTA. Desta forma, o *VEGF* pode ser explorado como alvo molecular em futuras experimentações terapêuticas nestes linfomas.

Estudo conduzido por Zhao et al. (2007) explorou o papel da expressão de *VEGF* e seu significado clínico em portadores de LCTA. Neste estudo as células neoplásicas foram isoladas por microdissecção tumoral a laser. A expressão de *VEGF* foi mensurada por técnica de PCR quantitativo no tecido de microambiente tumoral não neoplásico e nas células tumorais microdissecadas. Comparando-se os resultados encontrados em células neoplásicas com amostras de hiperplasia linfóide reativa, os autores notaram que o *VEGF* era superexpresso nos tecidos não-neoplásicos de

pacientes com LCTA (microambiente tumoral inflamatório), bem como nas células neoplásicas microdissecadas.

Observaram ainda que altos níveis de VEGF foram associados com infiltração tumoral de medula óssea ($p=0,0039$), envolvimento cutâneo ($p=0,0046$) e IPI de alto risco ($p=0,0032$). A partir desses resultados, os autores sugeriram que a expressão de *VEGF1* poderia ser utilizado como biomarcador de progressão no LCTA. Os dados encontrados em nosso estudo, reforçam essa possibilidade desde que demonstramos associação entre a hiperexpressão contínua deste gene e menor SG ($p=0,026$) e SLP ($p=0,028$).

Em nosso estudo, além da análise de expressão gênica por PCR, avaliamos em paralelo a expressão protéica dos respectivos genes por imunohistoquímica. O emprego de duas técnicas distintas foi baseado no princípio de que nem sempre a expressão de um gene está diretamente associada à correspondente expressão da proteína por ele codificada.

Desta forma, não necessariamente os resultados obtidos na imunohistoquímica devem ser concordantes com os obtidos no perfil de expressão gênica. Entretanto, não conseguimos padronizar as reações imunohistoquímicas para IKBk β e VEGF1. Assim, não foi possível correlacionar a expressão destes genes com suas respectivas proteínas.

Não demonstramos particularidade de expressão das proteínas avaliadas nos diferentes subgrupos histopatológicos de LCTP nodais. Porém, demonstramos que a imunoexpressão de CHEK1 foi associada a prognóstico adverso, com pior SG, SLP e SLD na coorte geral de LCTP. Este resultado não foi concordante com o estudo molecular. Porém na variante histológica de LCTP-SOE os dados imunohistoquímicos corroboraram os moleculares.

Ainda dentro da coorte geral a expressão das proteínas codificadas pelos genes *TOP2A* e *NFkB* foram associadas a desfechos favoráveis de SG e SLP. Este resultado foi também verificado para os respectivos genes no subgrupo de LGCA-ALK negativo, que representavam aproximadamente 30% do total de pacientes com LCTP nodais, podendo assim influenciar de forma direta os resultados obtidos no estudo de expressão protéica utilizando-se técnica histoquímica.

Além de sua aplicabilidade na identificação e determinação de variáveis genéticas relacionadas a prognóstico, os estudos de expressão gênica também são importantes para o refinamento da classificação morfológica das neoplasias. Diferentes estudos que utilizaram a tecnologia de análise de perfil de expressão gênica demonstraram sua importância também no diagnóstico diferencial dos subtipos de LCTP nodais (THOMPSON et al., 2005; BALLESTER et al., 2006; LAMANT et al., 2007; PIVA et al., 2010; PICCALUGA et al., 2013).

Dentro deste racional, nosso estudo foi o primeiro a testar um painel gênico composto pelos genes *CCNA2*, *TOP2A*, *CHEK1*, *NFkB1*, *IKBkB* e *VEGF1* com objetivo de auxiliar o diagnóstico clínico-patológico das variantes de LCTP predominantemente nodal. No estudo conduzido por Cuadros et al., 2007, todos esses genes, com exceção do gene *VEGF1*, também foram avaliados. Porém estes autores avaliaram apenas o impacto prognóstico destes genes nos LCTP/SOE e LCTA. Não foram realizadas análises do papel discriminatório desse painel gênico específico para os diferentes subtipos histológicos.

O presente estudo, objetivou também tentar estabelecer *clusters* gênicos capazes de discriminar as variantes patológicas dos LCTP nodais. Após análise estatística, não conseguimos demonstrar nenhum grupo gênico dentre estes genes, específico de determinada variante histopatológica. Dessa forma o painel molecular utilizado em

nosso estudo não se mostrou útil para o diagnóstico diferencial dos LCTP nodais. Acreditamos que o número limitado de casos que compuseram nossa amostra possa ter colaborado para esse resultado, de forma que estudos futuros englobando mais pacientes, multicêntricos possam encontrar resultados diferentes.

Entretanto, em nosso trabalho, encontramos um dado bastante peculiar. Todos os genes testados, com exceção do gene *VEGF1*, apresentaram padrão de distribuição característico de suas medianas de expressão. Houve tendência de correlação gênica peculiar entre diferentes variantes histopatológicas dos LCTP nodais, exceto para o LCTA. Demonstramos que os genes relacionados a proliferação celular *CCNA2*, *TOP2A* e *CHEK1* e de resposta inflamatória *NFkB1* e *IKBkB* apresentaram expressão decrescente, com LCTP-SOE > LGCA/ALK- > LGCA/ALK+.

Esse dado mostra-se bastante interessante, pois parece haver correlação entre intensidade de expressão desses genes com o grau de agressividade biológica dessas neoplasias. Ou seja, podemos sugerir que tumores mais agressivos e de pior prognóstico como LCTP/SOE (SG 20-30% 5 anos) apresentaram maior expressão de genes relacionados a proliferação celular e a inflamação do que os os tumores de agressividade e prognóstico intermediário como o LGCA/ALK- (SG 40-50% 5 anos) e ou de menor agressividade biológica e melhores desfechos como o LGCA/ALK+ (SG de 70-80% em 5 anos). Dessa forma, o presente trabalho foi o primeiro a estabelecer correlação entre a expressão de genes ativadores de proliferação e diferentes variantes morfológicas de LCTP nodais.

Os fenômenos de modulação epigenética como a hipermetilação das ilhas 5' CpG do DNA e a deacetilação de histonas contribuem para a oncogênese e a determinação do fenótipo maligno em neoplasias sólidas e hematológicas (MOMPARLER et al., 2000; BIRD et al., 2002). A hipermetilação dos resíduos citosina

das ilhas 5'CpG do DNA dos genes supressores tumorais *p15INK4b* e *p16INK4a* tem sido descrita como um dos mecanismos mais frequentes de inativação desses genes em neoplasias hematológicas (PHILLIPS et al., 2008).

Estudo pioneiro de García et al. (2002) analisou o *status* metilacional dos genes *p15* e *p16* em 53 casos de linfomas não-Hodgkin CD30+ (25 LGCA, 13 LCTP/SOE e 15 DGCB de morfologia anaplásica) e 26 linfomas de Hodgkin, com objetivo de comparar o *status* metilacional desses genes entre diferentes subtipos histológicos e traçar possíveis correlações com prognóstico dessas neoplasias. A metilação de *p16* e *p15* foi detectada, respectivamente, em 28% e 60% dos LNH CD30+ e em 38% e 42% dos linfomas de Hodgkin.

Esses resultados validaram a informação obtida em estudo prévio no qual tanto a metilação do gene *p16* quanto de *p15* foram implicadas na fisiopatologia do linfoma de Hodgkin. A ocorrência de metilação desses genes ao diagnóstico e na recidiva, sugerem que este epifenômeno genético seja um evento precoce na patogênese do LGCA e esteja envolvida na progressão (evento secundário) dos casos de linfoma de Hodgkin (GARCÍA et al, 2002).

Nesse mesmo estudo demonstrou-se que no LNH a hipermetilação do gene *p16INK4a* foi associada a fenótipo mais agressivo e pior prognóstico quando se estabeleceu correlação com o escore IPI. Esse dado corrobora a proposição de que a inativação do gene *p16* possa ser preditivo de pior prognóstico em linfoma de alto grau. Na tentativa de validar tais resultados e observar se a hipermetilação do DNA dos genes *p15* e *p16* estão associados à fisiopatologia nos LCTP nodais e, se o padrão metilacional exibe correlação com prognóstico nestas neoplasias, analisamos 52 LCTP nodais, incluindo as variantes LGCA/ALK+, LGCA/ALK-, LCTP/SOE e LCTA pela técnica de PCR em tempo real com ensaio metilação específico.

A análise de todos os pacientes com LCTP nodais, sem discriminação pela variante histopatológica, demonstrou ocorrência de hipermetilação dos genes *p15* e *p16* em nossa casuística. A metilação dos gene *p15INK4b* foi encontrada em 34,6% (18/52) dos casos e do gene *p16INK4a* em 48,1% (25/52) dos casos.

Estes dados, se melhor caracterizados em futuros estudos, poderão definir de forma mais contundente o impacto da utilização da análise de metilação destes genes no seguimento e na predição de desfechos dos LCTP nodais. Além de auxiliar na determinação de potenciais alvos a serem explorados para terapias específicas, tal como o emprego de fármacos hipometilantes como 5-azacitidina e decitabina na condução de portadores dessas malignidades.

Em relação às potenciais implicações prognósticas do fenótipo hipermetilado, em nosso estudo, encontramos dados interessantes em relação à SG. Demonstramos que pacientes com fenótipo metilado de *p15* e *p16* apresentaram SG em 5 anos inferior aos com estado não metilado (SG 49,4% *p15* não metilado, SG 36,1% *p15* metilado; SG 47,1% *p16* não metilado, SG 48,1% *p16* metilado), porém não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,675$ para *p15* e $p=0,409$ para *p16*).

Interrogamos se a ausência de significância estatística possa estar relacionada ao número restrito de pacientes avaliados em nossa casuística. Desta forma, futuros estudos, com amostras mais exuberantes, poderão validar estes resultados respaldado por significância estatística adequada. Outro comparador que não pode ser estabelecido entre nosso estudo e aquele conduzido por García et al. (2002) é o do papel do *status* metilacional frente a eventos que caracterizassem progressão de tais neoplasias, pois nossa amostra foi avaliada em um único momento (ao diagnóstico), em oposição ao estudo anteriormente citado, que analisou pacientes ao diagnóstico e no momento da recidiva-progressão.

Por outro lado, em análise multivariada, demonstramos que o estado metilado do gene *p15INK4b* exibiu, de forma estatisticamente significativa ($p=0,003$), associação com pior SLP em 5 anos em LCTP nodais não-ALK+. Isto sugere que o fenótipo metilado de *p15* deve ser considerado como marcador de prognóstico adverso nessas neoplasias. Da mesma forma vislumbramos uma oportunidade para o uso de fármacos demetilantes na terapêutica destas neoplasias, com o objetivo de tentar reduzir o prognóstico desfavorável com o uso de esquemas contendo antracíclicos.

A análise do perfil metilacional dos genes *p15* e *p16* em função de subgrupos histopatológicos de LCTP nodais, demonstrou resultado muito interessante. Todos os pacientes com LGCA/ALK+ apresentaram fenótipo não metilado para o gene supressor tumoral *p15INK4b*. Este fato nos permite sugerir, que muito possivelmente, este fenômeno epigenético não faça parte da fisiopatologia desses tumores. Isso pode, explicar, em parte, o melhor prognóstico demonstrado em literatura desta neoplasia em relação aos outros subtipos de LCTP nodais.

Este resultado está de acordo com os princípios fisiopatológicos do LGCA/ALK+ descritos até o momento. Nesta neoplasia, demonstrou-se que vias de sinalização intracelulares estão hiperativadas pela ação oncogênica da molécula híbrida NPM/ALK ou suas variantes. Além disso, participam também as vias de proliferação e regulação do ciclo celular de Ras-ERK e a apoptose é bloqueada por ativação inapropriada das vias JAK3-STAT3 e PI3k-Akt. Portanto, não se verificou interferência de fenômenos epigenéticos, como metilação de *p15INK4b*, no desenvolvimento e regulação dessa neoplasia (BOI et al, 2015).

Outro resultado surpreendente e aparentemente paradoxal refere-se ao fato de que o fenótipo não-metilado do gene *p16INK4a* associou-se a pior SLD em 5 anos em LCTP/SOE. Este resultado pode ser explicado se a interpretação de não-metilação

estiver sendo confundida com o fenômeno verdadeiro de deleção do referido gene , o que somente poderá ser comprovado sequenciando-se o DNA.

A deleção dos genes *p15* e *p16* constitui-se mecanismo conhecido de inativação da sua atividade supressora tumoral, e tem sido descrita em diversas neoplasias. Nakamura et al (2001) demonstraram que a deleção homozigótica dos genes *p14ARF* e *p16INK4a* representa importante marcador molecular na patogênese do linfoma difuso de grandes células B primário de sistema nervoso central (NAKAMURA et al., 2001).

Outro estudo, conduzido por Tone et al. (2003) demonstrou associação entre deleção de *p15* e *p16* e fenótipo neoplásico maligno. Os autores identificaram que em população de crianças com leucemia linfóide aguda a deleção do éxon 2 do gene *p15* foi considerada marcador molecular para diagnóstico e recaída de LLA. Entretanto, nenhuma correlação entre deleção desses genes e prognóstico foi identificada na literatura. Ao contrário do que pode ser sugerido em nosso trabalho, se for comprovada realmente inativação do *p16* em LCTP-SOE como consequência de sua deleção (TONE et al., 2003).

7. CONCLUSÕES

- A hiperexpressão do gene de proliferação/regulação do ciclo celular *CCNA2* e do gene associado a inflamação *IKBkB* foram relacionados a pior SG em 5 anos em LCTP nodais, independentemente da subcategorização morfológica;
- A imunexpressão da proteína CHEK1 associou-se a prognóstico adverso em relação aos desfechos de SG, SLP e SLD nos LCTP nodais. Em oposição, a expressão das proteínas TOP2A e NFkB foram associadas a melhor SG e SLP nos LCTP nodais;
- Os genes relacionados a proliferação celular (*CCNA2*, *CHEK1* e *TOP2A*), de resposta inflamatória (*IKBkB*) e angiogênese (*VEGF1*) não discriminaram as diferentes variantes histopatológicas de LCTP nodais. Portanto, não se constituíram em ferramenta eficaz para auxiliar no diagnóstico dessas neoplasias. Entretanto, observamos preliminarmente padrão de distribuição característico e linear de intensidade de expressão dos genes avaliados, excetuando-se o *VEGF1*, obedecendo a ordem decrescente com LCTP/SOE > LGCA/ALK- > LGCA/ALK+;
- A hiperexpressão dos genes de perfil proliferativo *CCNA2*, *TOP2A* e *CHEK1* foi associada a melhor SLP em 5 anos no nos LGCA/ALK-; Entretanto, a hiperexpressão do gene VEGF-1 foi associada a pior SLP nesta coorte de pacientes;
- Contrariamente, a hiperexpressão de genes de perfil proliferativo *CCNA2*, *TOP2A* e *CHEK1* correlacionaram-se a pior prognóstico para os desfechos de SG, SLP e SLD em 5 anos nos LCTP/SOE. O mesmo foi encontrado para o gene *IKBkB*;

- A hiperexpressão do gene regulador de angiogênese *VEGF1* foi relacionada a pior SG e SLP no LCTA;
- Observamos ausência de metilação do gene *p15INK4b* nos LGCA/ALK+. Possivelmente o fenômeno epigenético de metilação não participa da fisiopatologia desta neoplasia;
- A presença de do gene *p15INK4b* metilado associou-se a pior SLP em 5 anos em LCTP nodais não-ALK+. É possível, portanto, que estes pacientes possam se beneficiar da terapia com agentes hipometilantes;
- Os índices IPI e PIT demonstraram elevada capacidade em prever prognóstico quando aplicados á nossa casuística de LCTP nodais independentemente da variante histopatológica;
- A imunoexpressão da proteína ALK não demonstrou ser variável independente de bom prognóstico nos LGCA/ALK+ da coorte estudada. Possivelmente outros fatores adversos como estágio avançado ao diagnóstico, pobre estado funcional e IPI de alto risco influenciaram o prognóstico dos LGCA/ALK+ em nossa coorte.

8. ANEXOS

ANEXO A- Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E RESPOSTA INFLAMATÓRIA E DO PADRÃO DE METILAÇÃO DOS GENES SUPRESSORES TUMORAIS P15INK4B E P16INK4A E SUAS IMPLICAÇÕES NO PROGNÓSTICO DE LINFOMAS DE CÉLULAS T PERIFÉRICAS

Pesquisador Responsável: Juliana Pereira

Versão: 2

Pesquisador Executante: Luis Alberto de Pádua Covas Lage

CAAE: 02975012.0.0000.0068

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Instituição: HCFMUSP

Departamento: CLÍNICA MÉDICA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 8995

Número do Parecer: 97631

Data da Relatoria: 19/09/2012

Apresentação do Projeto: O projeto apresentado é de relevância clínica e está fundamentado em dados científicos já publicados. Trata-se de estudo retrospectivo, onde serão estudados pacientes portadores de linfomas de células T periféricas (PTCL) predominantemente nodais atendidos no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da FMUSP e do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo- ICESP de Janeiro de 2000 a Dezembro de 2012 e submetidos a tratamento com intuito curativo. Os dados serão obtidos a partir da análise de prontuário médico e as análises moleculares serão realizadas a partir de material de biópsias linfonoidais previamente armazenadas.

Objetivo da Pesquisa: O projeto tem como objetivo avaliar padrão de expressão dos genes ativadores de proliferação celular CCNA2, TOP2A e CHECK1, dos genes relacionados a resposta inflamatória NFKB1 e IKKB e do gene associado a angiogênese VEGF nos subgrupos de PTCL. Correlacionar o padrão de expressão destes genes com as variantes histopatológicas dos PTCL propondo critérios de diagnóstico. Determinar se diferentes padrões de expressão dos genes CCNA2, TOP2A, CHECK1, NFKB1, IKKB e VEGF e de metilação dos genes p16INK4a e p15INK4b apresentam relevância prognóstica nos PTCL, determinando suas possíveis interdependências e com variáveis do Índice Prognóstico Internacional (IPI) tendo como desfechos mensuráveis a taxa de resposta global, a sobrevida global e a sobrevida livre de progressão.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não há riscos diretos aos pacientes, pois serão utilizadas apenas amostras previamente estocadas. Os benefícios da pesquisa serão melhor caracterização histopatológica dos linfomas de células T periféricas com base em padrões moleculares; proposta de eventuais novos marcadores prognósticos biológicos e correlação com sobrevida dos pacientes; proposta de potenciais alvos terapêuticos moleculares a partir do estudo do padrão de expressão gênica e metilação de genes importadores de linfomas de células T periféricas.

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.

55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O projeto está apresentado de maneira clara e os objetivos são justificáveis para melhor entendimento da etiologia da doença. Os dados clínicos serão retirados dos prontuários dos pacientes e não haverá coleta de material biológico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Não há necessidade de utilização de TCLE, uma vez que as amostras a serem utilizadas são blocos de parafina previamente armazenados. A pesquisadora apresentou carta de concordância para o uso dessas amostras pelos responsáveis nas duas instituições envolvidas.

Recomendações: Nenhuma pendência.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: A pesquisadora esclareceu todas as questões formuladas anteriormente e realizou satisfatoriamente as modificações solicitadas.

Situação do Parecer: Aprovado

São Paulo, 19 de Setembro de 2012

Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa-CAPPesq

ANEXO B – Diagnósticos histopatológicos iniciais e após revisão centralizada

Nome do paciente / Número da amostra	Variante histopatológica	Após revisão
DAS / Sem biologia molecular	LGCA/ALK-	LGCA/ALK-
DHK / L20	LGCA/ALK+	LGCA/ALK+
CLC / L58	LGCA/ALK?	LGCA/ALK-
DSM / L25	LGCA/ALK-	LCTP/SOE
ERC / L62	LGCA/ALK+	LGCA/ALK+
FCS / L15	LGCA/ALK-	LGCA/ALK-
JGX / L50	LGCA/ALK-	LGCA/ALK-
LJ / L22	LGCA/ALK-	LGCA/ALK-
MCRA / L48	LGCA/ALK-	LGCA/ALK-
MPM / L56	LGCA/ALK-	LGCA/ALK-
SSS / Sem biologia molecular	LGCA/ALK+	LGCA/ALK+
SEM / L60	LGCA/ALK-	LGCA/ALK-
ASS / L6	LGCA/ALK+	LGCA/ALK+
MLAD / L27	LGCA/ALK-	LGCA/ALK-
JPS / L52	LGCA/ALK-	LGCA/ALK-
MIFP / L31	LGCA/ALK+	LGCA/ALK+
IPS / Sem biologia molecular	LGCA/ALK-	LGCA/ALK-
NAGS / L18	LGCA/ALK-	LGCA/ALK-
IFS / L72	LGCA/ALK+	LGCA/ALK+
MR / L19	LGCA/ALK-	LGCA/ALK-
ACJS / L26	LGCA/ALK-	LGCA/ALK-
VMP / Sem biologia molecular	LGCA/ALK-	LGCA/ALK-
NMOS / L17	LGCA/ALK-	LGCA/ALK-
FWV / L21	LGCA/ALK-	LGCA/ALK-
OC / L36	LGCA/ALK+	LGCA/ALK+
MSB / L23	LGCA/ALK-	LGCA/ALK-
PGB / L30	LGCA/ALK+	LGCA/ALK+
RPAS / L40	LGCA/ALK-	LGCA/ALK-
PJE / L12	LCTP/SOE	LCTP/SOE
KJS / L47	LGCA/ALK+	LGCA/ALK+
AR / L39	LGCA/ALK+	LGCA/ALK+
FSS / L29	LGCA/ALK+	LGCA/ALK+
CSF / L33	LCTP/SOE	LCTP/SOE
ECGA / L1	LGCA/ALK+	LGCA/ALK+
APMC / L14	LGCA/ALK+	LGCA/ALK+
ACAS / L28	LCTA	LCTA
CMS / L37	LCTP/SOE	LCTP/SOE
IRS / L41	LCTP/SOE	LCTP/SOE
JSOC / L63	LCTA	LCTA

Continua

Continuação		
Nome do paciente / Número da amostra	Variante histopatológica	Após revisão
JCM / L3	LCTA	LCTA
JMCN / L10	LCTP/SOE	LCTA
JJM / Sem biologia molecular	LCTP/SOE	LCTP/SOE
MJS / Sem biologia molecular	LCTP/SOE	LCTP/SOE
NRM / L38	LCTA	LCTA
TN / Sem biologia molecular	LCTP/SOE	LCTP/SOE
WRS / L27	LCTP/SOE	LCTP/SOE
LCR / L16	LGCA/ALK?	LGCA/ALK-
AFS / L32	LCTA	LCTA
RR / L54	LCTP/SOE	LCTP/SOE
EPS / L34	LCTP/SOE	LCTP/SOE
PG / L35	LCTP/SOE	LCTP/SOE
EAS / L13	LCTP/SOE	LCTP/SOE
SU / Sem biologia molecular	LCTP/SOE	LCTP/SOE
PLS / L11	LCTP/SOE	LCTP/SOE
PAL / L71	LCTP/SOE	LCTP/SOE
AM / L53	LGCA/ALK-	LCTP/SOE
CLMS / L64	LCTP/SOE	LCTP/SOE
FMS / L70	LCTA	LCTA
RPG / L59	LGCA/ALK-	LGCA/ALK-
FFM / L4	LGCA/ALK-	LCTP/SOE
ASD / L7	LGCA/ALK+	LGCA/ALK-
BAS / L65	LGCA/ALK-	LCTP/SOE
DSL / L66	LGCA/ALK-	LCTP/SOE
JMM / L67	LGCA/ALK-	LGCA/ALK-
JLV / L2	LCTP/SOE	LCTA
JSS / Sem biologia molecular	LCTP/SOE	LCTP/SOE
LCFJ / L69	LCTP/SOE	LCTP/SOE
LCA / Sem biologia molecular	LGCA/ALK-	LGCA/ALK-
MMT / L68	LCTP/SOE	LCTP/SOE
MMP / Sem biologia molecular	LGCA/ALK-	LGCA/ALK-
SLM / Sem biologia molecular	LGCA/ALK-	LGCA/ALK-
SMN / L43	LCTP/SOE	LCTP/SOE
MLSS / L75	LCTA	LCTA
MCM / L74	LCTP/SOE	LCTP/SOE
MNIM / L49	LGCA/ALK-	LCTP/SOE
MAPSC / L57	LGCA/ALK+	LGCA/ALK+
FPM / L61	LGCA/ALK+	LGCA/ALK+
SGF / L55	LCTP/SOE	LCTP/SOE
ARA / L73	LGCA/ALK-	LGCA/ALK-

Continua

Continuação		
Nome do paciente / Número da amostra	Variante histopatológica	Após revisão
DSA / L42	LGCA/ALK+	LGCA/ALK+
ALMM / Sem biologia molecular	LCTP/SOE	LCTP/SOE
OWD / L45	LCTP/SOE	LCTP/SOE
EAB / L44	LGCA/ALK+	LGCA/ALK+
FCD / L46	LGCA/ALK-	LGCA/ALK-
GON / L76	LGCA/ALK-	LGCA/ALK-
DSFS / L77	LGCA/ALK+	LGCA/ALK+
VAS / L78	LCTA	LCTA

LCTA: Linfoma de células T tipo angioimunoblástico.

LCTP/SOE: Linfoma de células T periféricas, sem outras especificações.

LGCA/ALK-: Linfoma de grandes células anaplásicas, quinase do linfoma anaplásico negativo.

LGCA/ALK+: Linfoma de grandes células anaplásicas, quinase do linfoma anaplásico positivo.

ANEXO C – Tabela com dados clínico-epidemiológicos – sexo, idade, variante histopatológica, IPI-T, DHL, ECOG e medula óssea

Nome do paciente	Sexo	Idade	Variante histopatológica	IPI	IPI-T	DHL	ECOG	Medula Óssea
ASS / L6	Masculino	38 anos	LGCA/ALK+	Interm. Baixo(2)	Interm Baixo(1)	433	2	Sem infiltração
AM / L53	Masculino	58 anos	LCTP/SOE	Alto Risco (4)	Interm. Alto (2)	688	3	Sem infiltração
AR / L39	Masculino	66 anos	LGCA/ALK+	Interm. Alto (3)	Interm. Baixo (1)	260	1	Sem infiltração
ACJS / L26	Feminino	21 anos	LGCA/ALK-	Interm. Alto (3)	Interm. Alto (2)	1406	2	Sem infiltração
ALMN / Sem biomol	Feminino	62 anos	LCTP/SOE	Baixo Risco (1)	Interm. Baixo (1)	405	1	Sem infiltração
APMC / L14	Feminino	34 anos	LGCA/ALK+	Alto Risco (4)	Interm. Alto (2)	1484	3	Sem infiltração
ACAS / L28	Masculino	46 anos	LCTA	Alto Risco (4)	Interm Alto (2)	738	2	Sem infiltração
AFS / L32	Masculino	56 anos	LCTA	Alto Risco (4)	Interm. Alto (2)	715	3	Sem infiltração
ARA / L73	Masculino	55 anos	LGCA/ALK-	Baixo Risco (1)	Baixo Risco (0)	345	1	Sem infiltração
ASD / L7	Masculino	38 anos	LGCA/ALK-	Interm. Baixo(2)	Interm. Alto (2)	519	3	Sem infiltração
BAS / L65	Masculino	71 anos	LCTP/SOE	Alto Risco (5)	Alto Risco (4)	1807	3	Com infiltração
CMS / L37	Feminino	66 anos	LCTP/SOE	Interm. Baixo(2)	Interm Alto (2)	414	2	Não realizada BMO
CSF / L33	Feminino	47 anos	LCTP/SOE	Baixo Risco (1)	Baixo Risco (0)	439	1	Sem infiltração
CLC / L58	Masculino	31 anos	LGCA/ALK-	Baixo Risco (1)	Baixo Risco (0)	301	2	Sem infiltração
CLMS / L64	Feminino	32 anos	LCTP/SOE	Interm. Alto (3)	Interm. Alto (2)	1567	2	Não realizada BMO
DSA / L42	Feminino	24 anos	LGCA/ALK+	Interm. Alto (3)	Alto Risco (3)	736	3	Com infiltração
DAS / Sem biomol	Masculino	68 anos	LGCA/ALK-	Interm. Baixo(2)	Interm. Baixo (2)	306	2	Sem infiltração
DSL / L66	Masculino	43 anos	LCTP/SOE	Alto Risco (4)	Interm Alto (2)	759	3	Sem infiltração
DHK / L20	Masculino	14 anos	LGCA/ALK+	Interm. Baixo(2)	Baixo Risco (1)	429	1	Sem infiltração
DSM / L25	Masculino	39 anos	LCTP/SOE	Interm. Alto (3)	Interm. Baixo (2)	548	3	Não coletada BMO
EPS / L34	Feminino	30 anos	LCTP/SOE	Interm. Baixo(2)	Baixo Risco (0)	352	1	Sem infiltração
EAS / L13	Masculino	47 anos	LCTP/SOE	Baixo Risco (1)	Baixo Risco (0)	268	1	Sem infiltração
ERC / L62	Masculino	30 anos	LGCA/ALK+	Baixo Risco (0)	Baixo Risco (0)	414	1	Sem infiltração
EAB / L44	Feminino	51 anos	LGCA/ALK+	Baixo Risco (1)	Baixo Risco (0)	364	1	Sem infiltração
ECGA / L1	Masculino	37 anos	LGCA/ALK+	Interm. Baixo(2)	Interm. Baixo (1)	2347	1	Sem infiltração
FPM / L61	Masculino	16 anos	LGCA/ALK+	Baixo Risco (0)	Baixo Risco (0)	388	1	Sem infiltração
FCD / L46	Feminino	58 anos	LGCA/ALK-	Interm. Alto (3)	Interm. Baixo(1)	733	1	Sem infiltração
FSS / L29	Feminino	26 anos	LGCA/ALK+	Baixo Risco (1)	Interm Baixo (1)	341	2	Não realizada BMO
FCS / L15	Masculino	70 anos	LGCA/ALK-	Interm. Alto (3)	Interm. Alto (2)	669	1	Sem infiltração
FFM / L4	Masculino	49 anos	LCTP/SOE	Interm. Alto (3)	Interm. Alto (2)	1417	3	Não realizada BMO
FWV / L21	Masculino	80 anos	LGCA/ALK-	Baixo Risco(1)	Interm. Baixo (1)	369	1	Sem infiltração
FMS / L70	Masculino	55 anos	LCTA	Interm. Baixo(2)	Interm Baixo (1)	560	1	Sem infiltração
IRS / L41	Feminino	16 anos	LCTP/SOE	Interm. Alto (3)	Interm. Alto (2)	747	1	Sem infiltração
IFS / L72	Feminino	34 anos	LGCA/ALK+	Interm. Baixo(2)	Interm. Alto (2)	1131	2	Sem infiltração

Continua

								Continuação
Nome do paciente	Sexo	Idade	Variante histopatológica	IPI	IPI-T	DHL	ECOG	Medula Óssea
IPS / Sem biomol	Feminino	61 anos	LGCA/ALK-	Baixo Risco (1)	Interm Baixo (1)	306	1	Sem infiltração
JMM / L67	Masculino	21 anos	LGCA/ALK-	Alto Risco (4)	Interm. Alto (2)	1849	3	Sem infiltração
JSOC / L63	Feminino	63 anos	LCTA	Interm. Alto (3)	Interm. Alto (2)	422	1	Com infiltração
JCM / L3	Masculino	60 anos	LCTA	Alto Risco (5)	Alto Risco (4)	514	3	Com infiltração
JMCN / L10	Masculino	48 anos	LCTA	Interm. Baixo(2)	Interm. Baixo (1)	370	2	Sem infiltração
JPS/ L52	Masculino	60 anos	LGCA/ALK-	Interm. Baixo(2)	Interm. Baixo (1)	397	1	Sem infiltração
JLV / L2	Masculino	48 anos	LCTA	Alto Risco (4)	Interm. Alto (2)	939	3	Sem infiltração
JSS / Sem biomol	Masculino	22 anos	LCTP/SOE	Interm. Alto (3)	Interm. Alto (2)	3024	3	Não realizou BMO
JGX / L50	Feminino	26 anos	LGCA/ALK-	Interm. Alto (3)	Interm. Baixo(1)	405	3	Sem infiltração
JJM / Sem biomol	Masculino	38 anos	LCTP/SOE	Interm. Baixo(2)	Interm. Alto (2)	2357	2	Sem infiltração
KJS / L47	Masculino	19 anos	LGCA/ALK+	Alto Risco (4)	Interm. Alto (2)	666	2	Sem infiltração
LCFJ / L69	Masculino	71 anos	LCTP/SOE	Interm. Alto (3)	Alto Risco (3)	508	3	Sem infiltração
LCA / Sem biomol	Masculino	53 anos	LGCA/ALK-	Interm. Alto (3)	Interm. Baixo (1)	340	3	Não realizou BMO
LCR / L16	Masculino	25 anos	LGCA/ALK-	Alto Risco (4)	Alto Risco (3)	689	2	Com infiltração
LJ / L22	Feminino	59 anos	LGCA/ALK-	Interm. Alto (3)	Interm. Alto (2)	285	2	Com infiltração
MCRA / L48	Feminino	28 anos	LGCA/ALK-	Alto risco (4)	Alto Risco(3)	742	2	Com infiltração
MJS / Sem biomol	Masculino	64 anos	LCTP/SOE	Interm. Alto (3)	Interm Baixo (1)	366	1	Sem infiltração
MPM / L56	Masculino	20 anos	LGCA/ALK-	Baixo Risco (0)	Baixo Risco (0)	275	1	Sem infiltração
MAPSC / L57	Feminino	50 anos	LGCA/ALK+	Interm. Baixo(2)	Interm. Baixo (1)	422	2	Sem infiltração
MIFP/ L31	Feminino	61 anos	LGCA/ALK+	Alto Risco (5)	Alto Risco (4)	779	3	Com infiltração
MLAD / L24	Feminino	37 anos	LGCA/ALK-	Interm. Alto (3)	Alto Risco (3)	555	2	Com infiltração
MMT / L68	Feminino	58 anos	LCTP/SOE	Alto Risco (4)	Interm. Alto (2)	560	3	Não realizou BMO
MNIMS / L49	Feminino	49 anos	LCTP/SOE	Interm. Alto (3)	Interm. Alto (2)	1813	3	Sem infiltração
MMP / Sem biomol	Feminino	52 anos	LGCA/ALK-	Interm. Alto (3)	Interm. Alto (2)	1879	3	Sem infiltração
MSB / L23	Masculino	16 anos	LGCA/ALK-	Baixo Risco (1)	Baixo Risco (0)	286	1	Sem infiltração
MR / L19	Masculino	67 anos	LGCA/ALK-	Interm. Alto (3)	Interm. Alto(2)	403	2	Sem infiltração
NMOS / L17	Feminino	33 anos	LGCA/ALK-	Interm. Baixo(2)	Interm Baixo (1)	805	0	Sem infiltração
NAGS / L18	Feminino	35 anos	LGCA/ALK-	Baixo Risco (0)	Baixo Risco (0)	302	1	Sem infiltração
NRM / L38	Feminino	72 anos	LCTA	Interm. Alto (3)	Interm Alto (2)	994	1	Sem infiltração
OC / L36	Masculino	47 anos	LGCA/ALK+	Alto Risco (4)	Interm. Alto (2)	1185	2	Sem infiltração
OWD / L45	Masculino	81 anos	LCTP/SOE	Alto Risco (4)	Alto Risco (3)	379	2	Com infiltração
PAL / L71	Feminino	21 anos	LCTP/SOE	Alto Risco (4)	Interm. Alto(2)	720	3	Sem infiltração
PJE / L12	Masculino	64 anos	LCTP/SOE	Interm. Baixo(2)	Interm Baixo (1)	301	1	Sem infiltração
PGB / L30	Masculino	30 anos	LGCA/ALK+	Alto Risco (4)	Alto Risco (3)	845	3	Com infiltração
PLS / L11	Masculino	50 anos	LCTP/SOE	Alto Risco (4)	Interm. Alto (2)	1116	3	Sem infiltração
PG / L35	Masculino	59 anos	LCTP/SOE	Interm. Alto (3)	Interm. Alto (2)	519	2	Sem infiltração
RR / L54	Masculino	43 anos	LCTP/SOE	Alto Risco (4)	Interm. Alto (2)	2503	3	Sem infiltração
RPAS / L40	Masculino	64 anos	LGCA/ALK-	Interm. Alto (3)	Interm. Alto (2)	1170	1	Sem infiltração
RPG / L59	Masculino	38 anos	LGCA/ALK-	Baixo Risco (1)	Inter. Baixo (1)	638	1	Sem infiltração
SGF / L55	Feminino	78 anos	LCTP/SOE	Interm. Alto (3)	Interm. Alto (2)	638	1	Sem infiltração
SLM / Sem biomol	Masculino	63 anos	LGCA/ALK-	Alto Risco (5)	Alto Risco (3)	999	3	Não realizada BMO
SSS / Sem biomol	Masculino	28 anos	LGCA/ALK+	Interm. Baixo(2)	Interm. Alto(2)	1096	2	Sem infiltração
SU / Sem biomol	Masculino	75 anos	LCTP/SOE	Alto Risco (4)	Interm. Alto (2)	590	1	Sem infiltração

Continua

Continuação								
Nome do paciente	Sexo	Idade	Variante histopatológica	IPI	IPI-T	DHL	ECOG	Medula Óssea
SMN / L43	Feminino	47 anos	LCTP/SOE	Interm Alto (3)	Interm Alto (2)	561	3	Sem infiltração
SEM / L60	Feminino	51 anos	LGCA/ALK-	Interm. Alto (3)	Interm. Alto (2)	853	3	Sem infiltração
TN / Sem biomol	Masculino	84 anos	LCTP/SOE	Baixo Risco (0)	Interm Baixo(1)	185	1	Sem infiltração
VMP / Sem biomol	Feminino	64 anos	LGCA/ALK-	Alto Risco (4)	Interm. Alto (2)	452	2	Sem infiltração
WRS / L27	Feminino	24 anos	LCTP/SOE	Baixo Risco (0)	Baixo Risco (0)	268	1	Sem infiltração
MCN / L74	Feminino	67 anos	LCTP/SOE	Interm. Baixo(2)	Interm. Alto (2)	778	1	Sem infiltração
MLSS / L75	Feminino	68 anos	LCTA	Alto Risco (4)	Alto Risco (3)	1027	3	Sem infiltração
GON / L76	Masculino	65 anos	LGCA/ALK-	Alto Risco (4)	Interm. Alto (2)	1735	1	Sem infiltração
DSFS / L77	Masculino	17 anos	LGCA/ALK+	Alto Risco (4)	Interm. Alto (2)	719	3	Não realizada BMO
VAS / L78	Masculino	63 anos	LCTA	Alto Risco (4)	Alto Risco (3)	957	2	Sem infiltração

BMO: Biópsia de medula óssea.

DHL: Desidrogenase láctica.

ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*.

IPI: Índice Prognóstico Internacional.

IPI-T: Índice Prognóstico Internacional para linfomas T.

LCTA: Linfoma de células T tipo angioimunoblástico.

LCTP/SOE: Linfoma de células T periféricas, sem outras especificações.

LGCA/ALK-: Linfoma de grandes células anaplásicas, quinase do linfoma anaplásico negativo.

LGCA/ALK+: Linfoma de grandes células anaplásicas, quinase do linfoma anaplásico positivo.

ANEXO D – Tabela com dados clínico-epidemiológicos – sítios extranodais, No. Sítios EM, Bulky disease e EC-Ann Arbor

Nome do paciente	Sítios extralinfonodais	No. Sítios EN	Bulky disease	EC - Ann Arbor
ASS / L6	Sem comprometimento extranodal	0	Não	IIIB
AM / L53	fígado, osso, língua	3	Sim	IVXSB (IV: fígado, osso, língua / X inguinal E)
AR / L39	pele e osso (vértebra L5)	2	Não	IVB (IV: pele + osso)
ACJS / L26	pleura, pericárdio	2	Sim	IIIXEB (X: mediastino / E: pleura e pericárdio)
ALMN / Sem biomol	sacro	1	Sim	IEXA (E: sacro / X: sacro)
APMC / L14	mama, SNC (LCR+), estômago	3	Sim	IVXB (IV: mama, LCR, estômago / X: inguinal)
ACAS / L28	pele, pulmão	2	Não	IVB (IV: pele)
AFS / L32	fígado, estômago	2	Não	IVSB (IV: estômago e fígado)
ARA / L73	Sem comprometimento extralinfonodal	0	Não	IIIA
ASD / L7	parede torácica	1	Sim	IIIXEB (X: mediastino / E: parede torácica)
BAS / L65	MO, pele, subcutâneo e parede torácica	4	Não	IVB (IV: MO, pele, subcutâneo, parede tx)
CMS / L37	anel de Waldeyer (amígdala)	1	Sim	IIIXEB (X: cervical / E: amígdala)
CSF / L33	pele	1	Não	IVA (IV: pele)
CLC / L58	íleo terminal	1	Sim	IIEXB (E: íleo terminal/ X: íleo terminal)
CLMS / L64	Sem comprometimento extralinfonodal	0	Não	IIISB
DSA / L42	medula óssea	1	Não	IVSB (IV: apresentação leucêmica)
DAS / Sem biomol	Sem comprometimento extralinfonodal	0	Não	IIA
DSL / L66	fígado, pele	2	Não	IVSB (IV: fígado, pele)
DHK / L20	pulmão, SNC	2	Não	IVB (IV: pulmão + SNC/dura-mater)
DSM / L25	Sem comprometimento extralinfonodal	0	Não	IIISB
EPS / L34	pele, pulmão	2	Sim	IVXSB (IV: pele, TCSC e pulmão / X pelve)
EAS / L13	pele e TCSC	2	Não	IVB (IV: pele + TCSC)
ERC / L62	Sem comprometimento extranodal	0	Sim	IIIXB (X: mediastino)
EAB / L44	Sem comprometimento extralinfonodal	0	Não	IIIA
ECGA / L1	sem comprometimento extranodal	0	Não	IIISB
FPM / L61	anel de Waldeyer	1	Sim	IIIXEB (X: cervical / E: anel de Waldeyer)
FCD / L46	nódulos subcutâneos , mama	2	Sim	IVXB (IV: nódulos subcutâneos, mama / X submandibular)
FSS / L29	musculatura torácica por contiguidade	1	Sim	IIIXEA (X: axila / E: musculatura tórax)
FCS / L15	Sem comprometimento extralinfonodal	0	Não	IIIB
FFM / L4	pele	1	Não	IVB (IV: pele)
FWV / L21	Sem comprometimento extranodal	0	Não	IA
FMS / L70	anel de Waldeyer	1	Não	IIIEB (E: anel de Waldeyer)
IRS / L41	pele, medula óssea (leucemização - SP)	2	Não	IVB (IV: pele, MO - leucemização)
IFS / L72	Sem comprometimento extranodal	0	Sim	IIIXSB (X: inguinal esquerdo)
IPS / Sem biomol	pele	1	Não	IEA (E: pele)
JMM / L67	pele, SNC	2	Sim	IVXB (IV: pele, SNC / X: inguinal E)
JSOC / L63	pele, medula óssea e mama	3	Não	IVB (IV: pele, MO e mama)
JCM / L3	medula óssea, pleura	2	Não	IVSB (IV: medula óssea e pleura)
JMCN / L10	sem doença extranodal	0	Não	IIIA
JPS / L52	Sem comprometimento extranodal	0	Não	IIIB
JLV / L2	esôfago, estômago, duodeno, SNC	4	Não	IVB (IV: SNC, TGI extenso)

Continua

Continuação

Nome do paciente	Sítios extralinfonodais	No. Sítios EN	Bulky disease	EC - Ann Arbor
JSS / Sem biomol	Sem comprometimento extralinfonodal	0	Não	IIISB
JGX / L50	pulmão, esterno	2	Sim	IVXEB (IV: pulmão / X: mediastino / E: esterno)
JJM / Sem biomol	sem doença extranodal	0	Não	IIB
KJS / L47	pele, osso	2	Sim	IVXSEA (IV: pele, osso / E: mm paravertebral / X supraclav.)
LCFJ / L69	Sem comprometimento extralinfonodal	0	Sim	IIXSB (X: fossa ilíaca direita)
LCA / Sem biomol	íleo, ceco, cólon, estômago, fígado e rins	6	Não	IVSB (IV: TGI extenso, fígado e rins)
LCR / L16	medula óssea, estômago, fígado, pele	4	Não	IVB (IV: MO, fígado, estômago e pele)
LJ / L22	medula óssea, fígado	2	Não	IVB (IV: MO, fígado)
MCRA / L48	medula óssea, parede torácica	2	Sim	IVXEB (IV: MO / X: mediastino / E: parede torácica)
MJS / Sem biomol	parede torácica, derrame pleural neoplásico	2	Sim	IVXB (IV: parede torácica/DP // X: parede torácica)
MPM / L56	sem comprometimento extranodal	0	Sim	IXA (X: cervical)
MAPSC / L57	sem comprometimento extralinfonodal	0	Sim	IIXSB (X: inguinal)
MIFFP / L31	osso, MO, cólon, pele e fígado	5	Não	IVSB (IV: osso, MO, cólon, pele e fígado)
MLAD / L24	medula óssea	1	Sim	IVXB (IV: MO / X cervical esquerdo)
MMT / L68	pulmão, anel de Waldeyer	2	Não	IVB (IV: pulmão e anel de Waldeyer)
MNIMS / L49	anel de Waldeyer	1	Não	IIIESB (E: anel de Waldeyer)
MMP / Sem biomol	parede torácica, pulmão (E)	2	Sim	IIEXB (E: parede torácica/pulmão / X: parede torácica)
MSB / L23	ossos	1	Não	IVB (IV: ossos)
MR / L19	pulmão	1	Não	IVSB (IV: pulmão)
NMOS / L17	Sem comprometimento extranodal	0	Não	IIISB (linfonodo cervical/axilar + baço)
NAGS / L18	grandes vasos da base (E)	1	Sim	IIEXB (X: mediastino / E: vasos da base)
NRM / L38	base de língua	1	Não	IIIESB (E: base de língua)
OC / L36	pele e palato	2	Não	IVB (IV: palato, pele, musculatura de antebraço)
OWD / L45	anel de Waldeyer, medula óssea	2	Não	IVESB (IV: MO+/E: Waldeyer)
PAL / L71	fígado, ossos, cerebelo	3	Sim	IVXSB (IV: fígado, osso, duodeno / X: mediastino)
PJE / L12	pele (por contiguidade)	1	Sim	IIIXEA(X: cervico-occipital/E: pele)
PGB / L30	osso, SNC. Estômago, v. cava e m psoas	5	Sim	IVXEB (IV: osso e SNC/ X: retrop. / E: estômago, cava, psoas)
PLS / L11	anel de Waldeyer, peritônio	2	Sim	IVXEB (IV: peritônio / E anel de Waldeyer / X: med + retrop.)
PG / L35	anel de Waldeyer	1	Sim	IIIXEB (X anel de Waldeyer /E anel de Waldeyer)
RR / L54	duodeno, fleo, adrenalD, rimD	4	Sim	IVXEB (IV fleo/X: retroperitônio/E: duodeno, rim D, adrenalD)
RPAS / L40	pele	1	Não	IVSB (IV: pele)
RPG / L59	partes moles	1	Sim	IIEXB (X: fossa poplíteia / E: partes moles)
SGF / L55	anel de Waldeyer	1	Não	IIIESB (E: Waldeyer)
SLM / Sem biomol	pele e peritônio (líquido ascítico+)	2	Não	IVB (IV: pele e peritônio)
SSS / Sem biomol	Sem comprometimento extranodal	0	Sim	IIXB (X: mediastino)
SU / Sem biomol	pele, testículos	2	Não	IVA (IV: pele, TCSC e testículos)
SMN / L43	estômago com perfuração cavitária tamponada	1	Não	IVB (IV: estômago)
SEM / L60	fígado	1	Não	IVB (IV: fígado)
TN / Sem biomol	seio paranasal	1	Não	IEA (E: seio paranasal)
VMP / Sem biomol	pulmão, pele, musculatura cervical	3	Sim	IVXEB (IV: pulmão/X: cervical/ E: pele e musculatura)
WRS / L27	língua	1	Não	IEA (E: língua)
MCN / L74	laringo-traqueal	1	Não	IEA (E: laringe)
MLSS / L75	Sem comprometimento extralinfonodal	0	Não	IIISB

Continua

Continuação

Nome do paciente	Sítios extralinfonodais	No. Sítios EN	Bulky disease	EC - Ann Arbor
GON / L76	pele, pulmão	2	Sim	IVXA (IV: pele e pulmão / X: pele)
DSFS / L77	ascite neoplásica, SNC	2	Sim	IVXSB (IV: ascite e SNC / X: abdome)
VAS / L78	Sem comprometimento extralinfonodal	0	Não	IIISB

DP: Derrame pleural.

EC: Estágio clínico.

EN: Extranodal.

LCR: Líquido céfalo-raquidiano.

MO: Medula óssea.

SNC: Sistema nervoso central.

SP: Sangue periférico.

TCSC: Tecido celular subcutâneo.

TGI: Trato gastrointestinal.

ANEXO E – Tabela com dados clínico-epidemiológicos – data diagnóstico, data remissão, data progressão e óbito: data e causa

Nome do paciente	Data diagnóstico	Data remissão	Data progressão	Óbito: Data e Causa
ASS / L6	06/02/09	18/05/2009 (pós 4o. Ciclo)	04/04/12	Não houve
AM / L53	10/01/12	Não houve - refrat. 1a.	15/10/12	08/01/13 - Progressão de doença
AR / L39	21/09/11	05/04/12	Não houve	Não houve
ACJS / L26	08/08/08	23/02/2010 (pós TMO +RT)	Não houve	Não houve
ALMN / Sem biomol	09/11/12	29/07/13 (pós RDT)	Não houve	Não houve
APMC / L14	17/06/11	Não houve	Não houve	13/07/2011: Choque séptico + hemorrágico
ACAS / L28	20/05/08	17/08/2008 (pós 4o. Ciclo)	15/02/10	Progressão de doença (02/2012)
AFS / L32	06/04/09	Não houve	19/06/09	Nov/09 - progressão de doença
ARA / L73	11/01/13	03/07/2013 (pós 4o. Ciclo)	Não houve	Não houve
ASD / L7	08/05/07	Não houve	Não houve	23/06/2007 - Choque séptico pulmonar
BAS / L65	07/05/09	Não houve	16/05/09	16/05/2009 - Progressão de doença
CMS / L37	26/12/06	31/07/2007 (pós 4o. Ciclo)	10/11/08	09/12/2008: choque séptico
CSF / L33	02/08/10	20/06/11	03/02/14	Não houve
CLC / L58	20/01/00	26/10/00	Não houve	Não houve
CLMS / L64	15/03/12	Não houve	NA	29/03/2012: CIVD aguda pós esplenectomia
DSA / L42	23/05/13	Não houve	28/11/13	27/02/2014 - Progressão de doença
DAS / Sem biomol	18/04/07	25/09/07	Não houve	Não houve
DSL / L66	17/11/05	Não houve	NA	26/11/2005 - Choque séptico
DHK / L20	16/05/04	04/12/04	10/12/07	Não houve
DSM / L25	29/04/08	Não houve	Não houve	22/06/2008: Criptococose + MAVC disseminadas
EPS / L34	01/05/09	20/12/10	Não houve	Óbito - 08/2011
EAS / L13	18/02/11	07/06/2011 (pós 4o. Ciclo)	11/10/11	Nov/11 - Progressão LNH + CEC de pulmão sinc.
ERC / L62	15/02/07	28/08/07	23/08/08	Não houve
EAB / L44	10/08/12	30/10/12	Não houve	06/12/12 - Complicação infecciosa
ECGA / L1	27/06/08	22/09/2008 (pós 4o. Ciclo)	21/01/09	Não houve
FPM / L61	11/12/12	06/05/13	Não houve	Não houve
FCD / L46	12/04/13	16/09/13 (pos 4o. Ciclo)	Não houve	Não houve
FSS / L29	26/07/11	Não houve (refratária)	27/10/2011	Não houve
FCS / L15	08/04/05	22/11/05	Não houve	Não houve
FFM / L4	11/06/12	26/11/12 (pós 4o. Ciclo)	12/02/13	15/03/2013 - progressão de doença
FWV / L21	10/02/10	01/06/10 (pós 4o. Ciclo)	Não houve	Não houve
FMS / L70	04/03/11	Não houve	01/04/12	Abr/12 - Progressão de doença + DPOC infectado
IRS / L41	03/09/04	05/05/05	07/06/06	Óbito 23/03/2011 - progressão de doença
IFS / L72	25/06/09	22/01/10	08/02/12	Não houve
IPS / Sem biomol	25/11/02	05/05/03	Não houve	Não houve
JMM / L67	02/06/06	Não houve	NA	11/07/2006 - choque séptico + lise tumoral
JSOC / L63	05/06/07	Não houve (RP dç estavel)	Não houve (estavel)	Não houve (término tto 08/2008)
JCM / L3	18/04/08	Não houve remissão	08/07/08	Óbito 08/08/2008 - Progressão de LNH
JMCN / L10	11/06/07	10/11/07	Não houve	Não houve
JPS / L52	22/05/09	25/11/09	Não houve	Não houve
JLV / L2	22/12/09	Não houve	NA	22/02/2010 - choque séptico urinário

Continua

Continuação

Nome do paciente	Data diagnóstico	Data remissão	Data progressão	Óbito: Data e Causa
JSS / Sem biomol	10/06/03	Não houve	NA	21/06/2003 - Choque séptico + CIVD aguda
JGX / L50	24/03/08	06/11/08	14/09/10	17/10/2010: progressão de dc + infecção
JJM / Sem biomol	19/04/07	01/08/2007 (pós 4o. Ciclo)	Não houve	Não houve
KJS / L47	22/07/11	24/01/2012 (pós 4o. Ciclo)	Não houve	Não houve
LCFJ / L69	27/08/07	Não houve	NA	30/08/2007 - Choque séptico
LCA / Sem biomol	10/03/03	Não houve	02/04/03	02/04/2003 - Progressão de LNH + choque séptico
LCR / L16	01/12/94	25/07/95	29/11/95	Não houve
LJ / L22	20/02/08	Não houve (refrat. Iario)	24/06/2008	06/09/2008: progressão LNH + infecção
MCRA / L48	09/10/05	17/04/06	Não houve	Não houve
MJS / Sem biomol	09/03/07	Não houve (refratário)	27/11/08	Óbito - 27/11/2008
MPM / L56	10/12/02	20/09/2003 (pós ATMO)	Refratária primária	Não houve
MAPSC / L57	18/01/13	Não houve	01/04/13	25/05/13 - progressão de doença
MIFP / L31	05/05/09	Não houve	27/07/09	29/10/2009: progressão de doença
MLAD / L24	12/03/09	13/10/09	Não houve	Não houve
MMT / L68	21/03/07	Não houve	NA	04/04/07 - Choque séptico
MNIMS / L49	30/01/12	17/12/12	Não houve	07/04/2013 - adenocarcinoma de pâncreas
MMP / Sem biomol	06/02/03	Não houve	NA	05/04/2003 - Choque séptico
MSB / L23	21/04/05	13/10/05	16/10/09	Óbito - progressão de doença 07/06/2013
MR / L19	11/09/09	26/04/10	02/10/2012	21/05/13: Progressão de linfoma + infecção
NMOS / L17	10/12/09	02/06/10 (pós 4o. Ciclo)	Não houve	Não houve
NAGS / L18	29/05/09	15/12/09	Não houve	Não houve
NRM / L38	03/08/07	15/11/2007 (pós 4o. Ciclo)	27/11/12	Não houve
OC / L36	21/12/09	09/04/2010 (pós 4o. Ciclo)	27/12/12	31/01/13 - Progressão LNH + Seps pulmonar
OWD / L45	12/09/12	22/04/13	Não houve	Não houve
PAL / L71	01/12/11	Não houve	11/01/12	Abr/12 - Progressão de doença
PJE / L12	02/02/09	12/11/09	06/03/10	24/04/13: Progressão LNH + LMA secundária
PGB / L30	26/03/10	21/09/10	01/01/11	Não houve
PLS / L11	09/06/11	14/12/11	25/03/12	11/09/12 - Progressão de dc com leucemização
PG / L35	22/12/10	16/03/11	11/11/11	Nov/11 - Progressão LNH + Choque séptico
RR / L54	28/07/10	31/01/11	28/04/11	Dez/11 - Progressão LNH + Pneumocistose
RPAS / L40	28/06/10	03/12/10	Não houve	Não houve
RPG / L59	27/02/12	Não houve	Não houve	04/08/12 - Choque séptico pós 1o. quimioterapia
SGF / L55	23/08/12	Não houve	20/02/13	14/09/13 - Progressão de doença
SLM / Sem biomol	07/08/03	Não houve	NA	24/08/2003 - Choque séptico cutâneo + pulm.
SSS / Sem biomol	03/08/01	Não houve refratario	13/01/02	Não houve
SU / Sem biomol	11/02/11	NA	NA	Abr/11 - Choque séptico (erisipela)
SMN / L43	24/04/13	Não houve refratario	10/02/14	Não houve
SEM / L60	01/10/05	12/06/06	02/09/08	21/11/2008: progressão de dc + IAM
TN / Sem biomol	06/12/96	01/06/97	Não houve	Não houve
VMP / Sem biomol	08/12/09	20/05/2010 (pós 4o. Ciclo)	Não houve	Não houve
WRS / L27	14/11/07	01/04/08	15/05/09	Não houve
MCN / L74	29/07/13	27/11/2013(pós 4o.ciclo)	Não houve	Não houve
MLSS / L75	22/10/13	Não houve	Não houve	12/03/2014 - complicação infecciosa

Continuação

Continuação

Nome do paciente	Data diagnóstico	Data remissão	Data progressão	Óbito: Data e Causa
GON / L76	25/11/13	28/03/14	Não houve	Não houve
DSFS / L77	03/07/14	Não houve	27/07/14	27/07/2014 - progressão de doença
VAS / L78	23/07/14	05/12/14	Não houve	Não houve

ATMO: Transplante autólogo de medula óssea.

CEC: Carcinoma espinocelular / epidermoide.

CIVD: Coagulação intravascular disseminada.

DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica .

IAM: Infarto agudo do miocárdio.

LMA: Leucemia mieloide aguda.

LNH: Linfoma não-Hodgkin.

MAVC: *Mycobacterium avium* complex.

NA: Não avaliável ou não se aplica.

RDT/RT: Radioterapia.

RC: Resposta completa.

RP: Resposta parcial.

ANEXO F – Tabela com dados clínico-epidemiológicos – TC pós 4º ciclo, TC ao final tto, protocolo de tto, início tto, término tto e número de ciclos

Nome do paciente	TC pós 4o. Ciclo	TC ao final tto	Protocolo de tto	Início tto	Término tto	Número ciclos
ASS / L6	RC	RC	8 CHOP	08/02/09	30/08/09	8
AM / L53	RP	Progressão	CVP + 8 Ciclos de CHOEP + 4QTIT	27/01/12	15/07/12	8
AR / L39	RC	RC	8 CHOP	04/11/11	05/04/12	8
ACJS / L26	RP	RP	1 CVP + 8 CHOP	30/09/08	16/03/09	8
ALMN / Sem biomol	RP	RP	1 CVP + 6 CHOEP + 4QTIT	21/11/12	22/03/13	6
APMC / L14	NA	NA	1 CVP + 1 MADIT	01/07/11	NA (óbito antes)	1
ACAS / L28	RC	RC	8 CHOP	28/05/08	12/11/08	8
AFS / L32	Progressão	NA	CVP + 4 CHOP	01/04/09	13/07/09	4
ARA / L73	RC	RC	8 CHOEP	17/04/13	23/09/13	8
ASD / L7	NA	NA	1 CHOP	13/06/07	NA	1
BAS / L65	NA	NA	Óbito antes de iniciar tto	NA	NA	NA
CMS / L37	RC	RC	6 CHOP	26/04/07	04/09/07	6
CSF / L33	RP	RP	3 CHOP + 5 CHOEP	10/01/11	20/06/11	8
CLC / L58	RC	RC	m-BACOD	24/02/00	26/10/00	6
CLMS / L64	NA	NA	Não realizou tto (óbito antes)	NA	NA	NA
DSA / L42	RP	RP	8 CHOEP + 4QTIT	23/05/13	30/10/13	8
DAS / Sem biomol	RC	RC	6 CHOP	23/04/07	25/09/07	6
DSL / L66	NA	NA	Óbito antes de iniciar tto	Óbito antes	NA	NA
DHK / L20	RC	RC	8 CHOP + 4 QTIT prof	20/05/04	04/12/04	8
DSM / L25	NA	NA	Não realizou tto (óbito antes)	NA	NA	NA
EPS / L34	RC	RC	8 CHOEP + 4 QTIT prof.	06/10/10	09/03/11	8
EAS / L13	RC	RC	6 ciclos de CHOP	24/03/11	13/07/11	6 (int. prec. CEC)
ERC / L62	RP	RC	8 CHOP	02/03/07	28/08/07	8
EAB / L44	RP	RP	3 IVAC	24/09/12	12/11/12	3
ECGA / L1	RC	RC	6 CHOP	28/06/08	25/11/08	6
FPM / L61	RC	RC	1CVP + 6 CHOEP + 4QTIT	18/12/12	06/05/13	6
FCD / L46	RC	RC	8 CHOEP + 4 QTIT prof.	24/06/13	19/11/13	8
FSS / L29	Progressão	RP	3 CHOP + 2IVAC + 3 ESHAP+RDT	12/08/11	05/03/12	3 + 2 + 3
FCS / L15	RC	RC	8 CHOP	10/04/05	22/11/05	8
FFM / L4	RC	NA	1CVP + 4 CHOEP 50%	12/07/12	NA	4
FWV / L21	RC	RC	6 mini-CHOP	09/03/10	05/07/10	6
FMS / L70	NA	NA	2 ABVD + 1 pred com talidomida	01/12/11	NA - óbito antes	2
IRS / L41	RP	RC	8 CHOP	15/10/04	05/05/05	8
IFS / L72	RP	RC	1 CVP + 8 CHOP	01/07/09	22/01/10	8
IPS / Sem biomol	NA	NA	Dexametasona (1 ciclo)	10/02/03	NA - remissão esp.	1
JMM / L67	NA	NA	1 CHOMP	27/06/06	NA	1
JSOC / L63	RP	RP	8 CHOP	12/02/08	18/08/08	8
JCM / L3	NA	NA	2 COP-Bleomicina	10/05/08	08/07/08	2
JMCN / L10	RC	RC	8 CHOP(14)	30/06/07	10/11/07	8
JPS/ L52	RP	RC	8 CHOP	25/06/09	25/11/09	8
JLV / L2	NA	NA	2 CHOP	13/01/10	NA	2

Continua

						Continuação
Nome do paciente	TC pós 4o. Ciclo	TC ao final tto	Protocolo de tto	Início tto	Término tto	Número ciclos
JSS / Sem biomol	NA	NA	Óbito antes de iniciar tto	Óbito antes	NA	NA
JGX / L50	RP	RC	8 CHOP	13/05/08	06/11/08	8
JJM / Sem biomol	RC	RC	7 CHOP	22/05/07	16/10/07	7
KJS / L47	RC	Rcu	1 CVP + 8 CHOEP	14/09/11	02/05/12	8
LCFJ / L69	NA	NA	Óbito antes de iniciar tto	Óbito antes	NA	NA
LCA / Sem biomol	NA	NA	Óbito antes de iniciar tto	Óbito antes	NA	NA
LCR / L16	RP	RC	7 m-BACOD	10/12/94	22/07/95	7
LJ / L22	Progressão SNC	NA	4 CHOP -> 1 ABREY	04/03/08	NA - óbito antes	4
MCRA / L48	RP	RC	8 CHOP	10/10/05	17/04/06	8
MJS / Sem biomol	RP	Refratário	8 CHOP	21/03/07	22/11/07	8
MPM / L56	Progressão	RP	4 CHOP com progressão	10/01/03	15/03/03	4
MAPSC / L57	Refratária	NA	2 CHOEP	07/02/13	01/04/13	2
MIFP / L31	Progressão	Progressão	1 CVP + 3 CHOP com progressão	10/05/09	27/07/09	3
MLAD / L24	RP	Rcu	8 CHOP	15/03/09	13/10/09	8
MMT / L68	NA	NA	Óbito antes de iniciar tto	Óbito antes	NA	NA
MNIMS / L49	RP	NA	6 CHOEP	16/08/12	17/12/12	6
MMP / Sem biomol	NA	NA	Óbito antes de iniciar tto	Óbito antes	NA	NA
MSB / L23	NA	NA	2 OPPA + 4 COPP	21/04/05	13/10/05	6
MR / L19	RP	RC	1 CVP + 8 CHOP	08/10/09	26/04/10	8
NMOS / L17	RC	RC	5 CHOEP + 3 CHOP	23/03/10	18/08/10	8
NAGS / L18	RP	RC	8 CHOP	10/06/09	15/12/09	8
NRM / L38	RC	RC	6 CHOP	03/08/07	12/01/08	6
OC / L36	RC	RC	8 CHOP	15/01/10	20/06/10	8
OWD / L45	RP	RP	7 mini CHOP	29/11/12	22/04/13	7
PAL / L71	Progressão	NA	1CHOP+1CHOMP+Abrey+1IVAC	21/12/11	NA - obito antes	4
PJE / L12	RP	RC	8 CHOP	02/02/09	12/11/09	8
PGB / L30	RP	RC	8 CHOMP + 4 QTIT	09/04/10	21/09/10	8
PLS / L11	RP	RP	CVP + 8 ciclos de CHOEP	15/06/11	14/12/11	8
PG / L35	RC	Dç refrataria	CVP + 12CHOP 75% + 4QTIT prof.	02/12/10	31/08/11	12 - 75% dose
RR / L54	RC	RC	CVP + 8CHOP + 4QTIT prof.	01/08/10	10/12/10	8
RPAS / L40	RP	RC	1 CVP + CHOP	30/06/10	03/12/10	8
RPG / L59	NA	NA	CHOEP 75% dose 1 ciclo	05/07/12	NA - óbito antes	1
SGF / L55	Progressão	Progressão	3 COEP	01/11/12	20/02/13	3
SLM / Sem biomol	NA	NA	Óbito antes de iniciar tto	Óbito antes	NA	NA
SSS / Sem biomol	RP	RP/Refratário	8 CHOP	06/08/01	13/01/02	8
SU / Sem biomol	NA	NA	CVP + 2 ciclos de CHOEP + 2QTIT	17/03/11	NA - obito antes	2
SMN / L43	Progressão	Progressão	8 CHOEP	03/05/13	16/10/13	8
SEM / L60	RP	RC	8 CHOP	15/10/05	12/06/06	8
TN / Sem biomol	RC	RC	8 CHOP + 4QTIT prof + RDT local	06/12/96	01/06/97	8
VMP / Sem biomol	RC	RC	1 CVP + 8 CHOP	19/02/10	02/08/12	8
WRS / L27	RC	RC	4 CHOP + RDT local	01/12/07	00/06/2009	4
MCN / L74	RC	RC	6CHOEP + 4QTITprof + RDT local	11/09/13	06/01/14	6
MLSS / L75	Progressão	NA	2VP + 3CVP + CsA	29/10/13	09/01/14	5

Continua

						Continuação
Nome do paciente	TC pós 4o. Ciclo	TC ao final tto	Protocolo de tto	Início tto	Término tto	Número ciclos
GON / L76	RP	RP	6 CHOEP	11/12/13	28/03/14	6
DSFS / L77	NA	NA	1 IVAC + 1QTIT prof.	03/07/14	27/07/14	1
VAS / L78	RC	RC	8 CHOEP	30/07/14	05/12/14	8

ABREY: protocolo quimioterápico baseado em altas doses de citarabina e metotrexato.

ABVD: Adriblastina, doxorrubicina, vimblastina e dacarbazina.

CEC: Carcinoma espinocelular/ epidermoide.

COP/CVP: Ciclofosfamida, vincristina, prednisona.

CHOP: Ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona.

CHOEP: Ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina, etoposídeo e prednisona.

CHOMP: Ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina, metotrexato e prednisona.

COEP: Ciclofosfamida, vincristina, etoposídeo, prednisona.

CsA: Ciclosporina A.

ESHAP: Etoposídeo, solumedrol, citarabina e cisplatina.

IVAC: Ifosfamida, citarabina e etoposídeo.

m-BACOD: Metotrexato, bleomicina, adriblastina, ciclofosfamida, vincristina e dexametasona.

MADIT: Metotrexato, citarabina intra-tecal.

NA: Não avaliável / não se aplica.

QT/QTIT: quimioterapia/quimioterapia intratecal.

RDT/RT: Radioterapia.

RC: Resposta completa.

RP: Resposta parcial.

SNC: Sistema nervoso central.

TC: Tomografia computadorizada.

TTO: tratamento.

ANEXO G – Tabela com dados clínico-epidemiológicos – radioterapia, ATMO, data ATMO, status pré ATMO, resgate pre ATMO, status atual da doença e data última consulta

Nome do paciente	Radioterapia	ATMO	Data ATMO	Status pré ATMO	Resgate pré ATMO	Status atual da doença	Data última consulta
ASS / L6	Não	Sim	29/10/09	1a. RC	Não	2a. RC pós aloTMO	16/12/14
AM / L53	Não	Não	NA	NA	1 IVAC + 1 GEMOX	Progressão de doença + óbito	08/01/13
AR / L39	Sim	Não	NA	NA	Na	1a. RC	06/05/14
ACJS / L26	Sim	Sim	24/09/09	RP	Não fez resgate	Mantém 1a. RC	06/01/15
ALMN / Sem biomol	Sim	Não	NA	NA	NA	1a. RC	21/10/14
APMC / L14	Não	Não	NA	NA	NA	óbito (choque séptico + hemorrágico)	13/07/11
ACAS / L28	Não	Não	Não	NA	4 IVAC + MTX manut	Óbito (02/2012 - progressão LNH)	14/02/12
AFS / L32	Não	Não	NA	NA	1 IVAC	Progressão durante resgate + obito	06/08/09
ARA / L73	Não	Sim	23/09/14	1a. RC	Não fez resgate	1a. RC pós ATMO	11/12/14
ASD / L7	Não	Não	NA	NA	NA	Óbito por complicação infecciosa pós QT	23/06/07
BAS / L65	Não	Não	NA	NA	NA	Óbito por progressão de doença	16/05/09
CMS / L37	Sim	Não	NA	NA	2 IMVP16	Óbito (09/12/08 - compl. Infecciosa)	09/12/08
CSF / L33	Sim	Sim	24/02/12	1a. RC	Não	2a. RC	03/02/14
CLC / L58	Sim	Não	NA	NA	NA	1a. RC	05/06/12
CLMS / L64	Não	Não	NA	NA	NA	Progressão de dc + CIVD	29/03/12
DSA / L42	Não	Não	NA	NA	1 IVAC + 1 GIFOX	Óbito por progressão de doença	27/02/14
DAS / Sem biomol	Não	Não	NA	NA	NA	1a. RC	11/11/14
DSL / L66	Não	Não	NA	NA	NA	Óbito por complicação infecciosa	26/11/05
DHK / L20	Sim	sim	03/02/08	2a. RC	04 IVAC	2. RC pós ATMO	15/10/14
DSM / L25	Não	Não	NA	NA	NA	Óbito: Progressão LNH + SIDA	22/06/08
EPS / L34	Não	Sim	25/05/11	1a. RC	Não	Óbito no TMO - 08/2011	02/08/11
EAS / L13	Não	Não	NA	NA	NA	Progressão de doença LNH/CEC + óbito	25/10/11
ERC / L62	Sim	Sim	24/07/09	2a. RC	04 IVAC	2a. RC pós ATMO	19/08/14
EAB / L44	Não	Não	NA	1a. RP	NA	Óbito pré TMO - 06/12/12 complicação infecciosa	06/12/12
ECGA / L1	Não	Sim	20/04/09	2a. RC	3 GIV	2a. RC pós TMO alog (recidiva pós ATMO)	04/12/14
FPM / L61	Sim	Não	NA	NA	NA	1a. RC	18/12/14
FCD / L46	Não	Sim	07/03/14	1a. RC	Não fez resgate	1a. RC pós ATMO	30/12/14
FSS / L29	Sim	Sim	27/07/12	RP	2 IVAC+3ESHAP+RT	1a. RC pós ATMO	09/10/14
FCS / L15	Não	Não	NA	NA	NA	1a. RC	12/04/08
FFM / L4	Não	Não	NA	NA	NA	Óbito - 15/03/2013 (progressão)	15/03/13
FWV / L21	Não	Não	NA	NA	Não	Mantém 1a. RC	21/08/14
FMS / L70	Não	Não	NA	NA	NA	Progressão de doença + óbito	01/04/12
IRS / L41	Sim	Sim	12/12/06	1a. RC	IVAC (politratada)	Óbito - 22/03/11	22/03/11
IFS / L72	Sim	Sim	05/11/12	RC	3 Ian Magrath	2a. RC pós ATMO	13/10/14
IPS / Sem biomol	Não	Não	NA	NA	Não	1a. RC	16/12/14
JMM / L67	Não	Não	NA	NA	NA	Óbito por infecção + lise tumoral	11/07/06
JSOC / L63	Não	Não	Não	NA	Não	RP com doença estável em uso de CsA	16/09/14
JCM / L3	Não	Não	NA	NA	NA	Óbito - 08/08/08 Progressão doença	08/08/08

Continua

Continuação

Nome do paciente	Radioterapia	ATMO	Data ATMO	Status pré ATMO	Resgate pré ATMO	Status atual da doença	Data última consulta
JMCN / L10	Não	Sim	08/04/08	1a. RC	Não	Mantém 1a. RC	14/08/14
JPS/ L52	Não	Sim	25/05/10	1a. RC	Não	1a. RC pós ATMO	07/08/14
JLV / L2	Não	Não	NA	NA	NA	óbito por complicação infecciosa	22/02/10
JSS / Sem biomol	Não	Não	NA	NA	NA	Óbito por complicação infecciosa + CIVD	21/06/03
JGX / L50	Sim	Sim	08/06/09	RC	Não	Óbito por progressão de dc	17/10/10
JJM / Sem biomol	Não	Sim	08/02/08	1a. RC	Não	1a. RC, acompanha em outro centro	10/10/13
KJS / L47	Não	Não	NA	NA	NA	1a. RC	27/02/14
LCFJ / L69	Não	Não	NA	NA	NA	Óbito por complicação infecciosa	30/08/07
LCA / Sem biomol	Não	Não	NA	NA	NA	Óbito por progressão de dc + infecção	02/04/03
LCR / L16	Não	Sim	15/03/96	2a. RP	2 MOPP	Mantém 2a. RC pós ATMO	27/03/14
LJ / L22	Não	Não	NA	NA	1 ABREY	Óbito: progressão dc + infecção	06/09/08
MCRA / L48	Sim	Sim	23/07/06	RC	Não	1a. RC pós ATMO	18/03/14
MJS / Sem biomol	Sim	Não	NA	NA	6 GIV	Óbito: progressão de doença	27/11/08
MPM / L56	Sim	Sim	20/09/03	RP	01 IVAC + 2 MTX HD	1a. RC pós ATMO	07/04/14
MAPSC / L57	Sim	Não	NA	NA	2 IVAC	Óbito por progressão de doença	23/05/13
MIFP/ L31	Não	Não	NA	NA	4 IVAC	Progressão pós resgate + obito	27/10/09
MLAD / L24	Não	Sim	03/03/10	1a. RC	Não	1a. RC pós ATMO	18/12/12
MMT / L68	Não	Não	NA	NA	NA	Óbito por complicação infecciosa	04/04/07
MNIMS / L49	Não	Não	NA	NA	NA	Óbito por segunda neoplasia metastática	07/04/13
MMP / Sem biomol	Não	Não	NA	NA	NA	Óbito por complicação infecciosa	05/04/03
MSB / L23	Sim	Sim	24/08/10	2a. RC	4 IVAC	Óbito pós aloTMO	07/06/13
MR / L19	Não	Não	NA	NA	3 RCOEP	Óbito por progressão + infecção	21/05/13
NMOS / L17	Não	Sim	03/12/11	1a. RC	Não	Mantém 1a. RC	23/10/14
NAGS / L18	Sim	Sim	15/04/10	1a. RC	Não	1a. RC pós ATMO	29/07/14
NRM / L38	Não	Não	Não	NA	6 ICE 75%	2a. RP pós 6o. ICE.	02/12/14
OC / L36	Não	Não	NA	1a. RC	1 Dexa + 1 CVP	Óbito: progressão LNH + infecção	31/01/13
OWD / L45	Não	Não	NA	NA	NA	RP com doença estável pós 7 miniCHOP	27/11/14
PAL / L71	Não	Não	NA	NA	NA	Progressão de doença + óbito	05/04/12
PJE / L12	Sim	Sim	24/03/11	RP	4 IVAC	Óbito: progressão LNH + LMA secundária	24/04/13
PGB / L30	Sim	Sim	16/08/11	RC	2 IVAC	Mantém RC pós ATMO	12/01/15
PLS / L11	Não	Não	NA	NA	1 ICE + 2 IVAC	Progressão de doença + óbito	11/09/12
PG / L35	Não	Não	NA	NA	NA	Progressão de doença + óbito	29/11/11
RR / L54	Não	Não	NA	NA	5 IVAC + 4QTIT	Progressão durante resgate + obito	10/12/11
RPAS / L40	Não	Não	NA	NA	Não	Mantém 1a. RC	14/08/14
RPG / L59	Não	Não	NA	NA	NA	Óbito por complicação infecciosa pos QT	04/08/12
SGF / L55	Não	Não	NA	NA	3 GDP	Óbito por progressão de doença	14/09/13
SLM / Sem biomol	Não	Não	NA	NA	NA	Óbito por complicação infecciosa	24/08/03
SSS / Sem biomol	Sim	Sim	08/10/02	RC	3 IVAC	1a. RC pós ATMO	15/05/14
SU / Sem biomol	Não	Não	NA	NA	NA	Óbito antes de reavaliação (pós 2CHOEP)	05/04/11
SMN / L43	Não	Não	NA	NA	GDP	RP com doença estável	14/01/15
SEM / L60	Não	Não	NA	NA	1 IVAC 75%	Óbito: progressão dc + IAM (cor anêmico)	21/11/08
TN / Sem biomol	Sim	Não	Não	NA	Não	mantém 1a. RC	08/04/14

Continua

Continuação

Nome do paciente	Radioterapia	ATMO	Data ATMO	Status pré ATMO	Resgate pré ATMO	Status atual da doença	Data última consulta
VMP / Sem biomol	Sim	Não	NA	NA	Não	Mantém 1a. RC	25/04/13
WRS / L27	Sim	Sim	11/02/10	RC	3 IVAC	2a. RC (pós ATMO de consolidação)	16/09/14
MCN / L74	Sim	Sim	Aguarda	RC	Não	1a. RC - aguarda ATMO	17/07/14
MLSS / L75	Não	Não	NA	NA	NA	Óbito: complicação infecciosa	12/03/14
GON / L76	Não	Sim	Aguarda	RP	NA	1a. RP - aguarda ATMO consolidação	22/08/14
DSFS / L77	Não	Não	NA	NA	NA	Óbito: progressão de doença	27/07/14
VAS / L78	Não	Não	NA	NA	NA	1a. RC pós 8 CHOEP - aguarda ATMO	23/12/14

ATMO: Transplante autólogo de medula óssea.

CVP: Ciclofosfamida, vincristina e prednisona.

GDP: Gemcitabina, dexametasona e cisplatina.

GEMOX: Gemcitabina e oxaliplatina.

GIFOX: Gemcitabina, ifosfamida e oxaliplatina.

GIV: Gemcitabina, ifosfamida e vinorelbina.

Ian Magrath: protocolo quimioterápico baseado em metotrexato em altas doses.

ICE: Ifosfamida, carboplatina e etoposídeo.

IVAC: Ifosfamida, citarabina e etoposídeo.

MTX: Metotrexato.

MTX HD: Metotrexato altas doses (high doses).

NA: Não avaliável / não se aplica.

RC: Resposta completa.

RCOEP: Rituximab, ciclofosfamida, vincristina, etoposídeo e prednisona.

RP: Resposta parcial.

ANEXO H - Valores de expressão relativa dos genes pesquisados normalizados em relação ao gene endógeno

	<i>CCNA2</i>	<i>TOP2A</i>	<i>CHEK1</i>	<i>NFkB1</i>	<i>IkBKB</i>	<i>VEGF1</i>
L01	0,27	1,73	1,34	14,85	8,32	0,52
L02	0,83	1,53	2,43	9,96	9,55	0,90
L03	1,65	3,17	3,89	13,89	3,49	0,59
L04	6,50	7,26	7,33	13,05	3,25	0,21
L06	0,63	5,61	6,83	6,14	5,45	0,44
L07	2,03	2,98	3,76	9,17	4,84	0,38
L10	0,53	3,48	0,00	7,75	10,95	0,33
L11	4,90	4,96	6,12	12,03	4,04	0,09
L12	1,26	2,03	4,30	14,31	10,94	0,18
L13	3,37	7,13	11,94	34,04	12,21	0,49
L14	5,36	5,78	6,21	9,99	4,43	0,38
L16	0,33	0,00	0,00	12,89	11,66	0,50
L17	5,38	2,65	4,59	10,59	4,41	0,44
L18	2,00	1,12	1,89	22,09	18,12	2,21
L21	4,29	4,89	9,21	10,53	4,30	0,21
L22	1,20	2,08	6,11	13,06	5,50	0,57
L23	0,13	1,36	1,71	11,12	3,09	1,01
L24	0,94	1,70	2,99	14,05	5,72	0,52
L25	2,36	6,99	6,68	16,10	7,26	1,89
L26	3,44	2,99	4,67	15,26	4,68	0,41
L27	1,20	2,66	4,76	15,32	5,95	3,32
L28	2,04	3,79	3,99	14,01	6,91	0,39
L29	0,84	4,04	3,57	19,78	8,66	2,56
L31	1,88	2,78	4,74	11,39	4,61	0,26
L32	1,75	3,57	3,35	13,34	7,44	0,77
L33	0,70	3,53	2,14	12,33	8,09	0,41
L35	6,08	0,00	7,91	1,67	8,35	0,79
L36	1,54	4,13	4,71	11,56	6,69	1,16
L37	2,56	4,68	7,91	12,82	5,08	0,45
L38	1,49	2,98	4,89	13,97	10,58	0,54
L39	1,57	2,69	3,73	9,52	5,07	0,42
L40	2,68	13,40	6,35	15,40	3,92	0,24
L41	1,64	2,02	2,63	8,27	7,89	0,19
L42	0,92	1,68	4,56	8,18	5,51	0,43
L43	0,82	2,27	3,77	14,06	7,81	0,25
L44	1,16	2,35	2,29	14,22	8,48	0,28
L45	1,52	4,23	5,34	16,86	7,82	0,99
L46	2,63	8,56	9,12	9,69	7,14	0,52
L47	1,26	13,07	14,67	11,27	6,27	0,93
L48	1,13	5,62	8,78	18,72	10,66	0,65
L49	2,07	7,68	6,24	34,30	11,60	2,85
L52	1,06	3,87	4,49	15,54	8,80	0,47
L53	3,68	4,78	6,48	16,67	6,24	0,46
L54	1,41	12,79	12,88	0,00	13,07	0,23
L55	3,47	11,09	9,14	2,99	14,99	0,29
L56	2,21	11,84	18,94	2,57	15,35	0,00
L57	4,37	11,26	7,23	1,50	9,33	0,02
L58	2,98	4,11	6,55	3,10	34,86	0,52
L61	2,75	6,36	7,03	1,87	11,72	0,53
L64	2,58	7,83	10,12	3,57	55,38	0,29
L65	5,00	19,89	11,65	1,87	31,51	0,00
L66	10,20	13,68	16,95	3,96	32,84	0,87
L67	2,65	6,19	12,54	2,36	26,92	0,72

Continua

	<i>CCNA2</i>	<i>TOP2A</i>	<i>CHEK1</i>	<i>NFkB1</i>	<i>IkBKB</i>	Continuação <i>VEGFI</i>
L68	3,42	7,16	12,07	1,29	33,47	1,02
L70	1,36	1,49	4,41	2,92	18,37	0,52
L71	2,33	6,85	4,01	1,86	35,43	1,02
L72	1,02	6,76	11,64	2,66	20,69	0,37
L73	7,61	11,24	17,43	2,58	9,90	0,20
L74	1,58	5,23	13,28	3,76	7,44	0,70
L75	7,02	9,62	14,51	2,87	19,30	0,47
L76	4,17	5,80	6,26	1,83	16,40	1,11
L77	0,55	0,00	11,83	1,94	19,89	0,81
L78	5,83	5,70	10,62	1,66	12,08	0,62

CCNA2: Ciclina A 2.

CHEK1: Quinase de checagem de ponto 1.

IkBKB: Quinase inibidora do fator nuclear kappa B.

NFkB1: Fator nuclear kappa B1.

TOP2A: DNA topoisomerase 2 α .

VEGF: Fator de crescimento derivado do endotélio vascular.

ANEXO I – Estado de metilação do DNA dos genes *p15INK4b* e *p16INK4a*

Amostra	<i>p16INK4a</i>	<i>p15INK4b</i>
L1	Não metilado	Não metilado
L2	Metilado	Não metilado
L3	Não metilado	Não metilado
L4	Não metilado	Não metilado
L6	Não metilado	Não metilado
L7	Metilado	Metilado
L10	Metilado	Não metilado
L11	Não metilado	Metilado
L12	Metilado	Metilado
L13	Metilado	Metilado
L15	Metilado	Metilado
L18	Não metilado	Metilado
L19	Metilado	Não metilado
L20	Não metilado	Não metilado
L21	Metilado	Não metilado
L22	Não metilado	Metilado
L23	Não metilado	Metilado
L24	Metilado	Não metilado
L26	Não metilado	Não metilado
L27	Metilado	Não metilado
L28	Metilado	Não metilado
L30	Metilado	Não metilado
L31	Metilado	Não metilado
L32	Metilado	Metilado
L34	Não metilado	Metilado
L35	Não metilado	Metilado
L37	Não metilado	Não metilado
L38	Metilado	Metilado
L40	Não metilado	Metilado
L41	Metilado	Não metilado
L42	Metilado	Não metilado
L43	Não metilado	Não metilado
L44	Metilado	Não metilado
L45	Metilado	Não metilado
L46	Não metilado	Não metilado
L47	Metilado	Não metilado
L48	Não metilado	Metilado
L49	Metilado	Não metilado
L52	Não metilado	Não metilado
L53	Não metilado	Metilado
L54	Não metilado	Não metilado

Continua

Amostra	Continuação	
	<i>p16INK4a</i>	<i>p15INK4b</i>
L55	Metilado	Não metilado
L57	Não metilado	Não metilado
L58	Metilado	Metilado
L61	Não metilado	Não metilado
L63	Não metilado	Metilado
L64	Não metilado	Metilado
L65	Não metilado	Não metilado
L66	Metilado	Metilado
L67	Metilado	Não metilado
L68	Metilado	Não metilado
L69	Não metilado	Não metilado
L70	Não metilado	Metilado
L72	Não metilado	Não metilado
L73	Não metilado	Não metilado
L74	Metilado	Não metilado
L75	Metilado	Não metilado
L77	Não metilado	Não metilado
L78	Não metilado	Metilado

ANEXO J – Percentual de expressão imunohistoquímica das proteínas codificadas pelos genes pesquisados

Amostra	<i>CCNA2</i>	<i>TOP2A</i>	<i>NFkB1</i>	<i>CHEK1</i>
L1	10%	NA	NA	10%
L2	60%	40%	30%	90%
L3	40%	70%	NA	50%
L4	80%	70%	40%	80%
L6	80%	70%	30%	30%
L7	60%	70%	30%	70%
L10	60%	40%	30%	60%
L11	70%	40%	70%	80%
L12	20%	30%	20%	40%
L13	70%	40%	30%	70%
L14	80%	70%	40%	90%
L15	80%	90%	90%	90%
L16	40%	30%	NA	40%
L17	60%	80%	60%	70%
L18	30%	50%	40%	30%
L19	40%	90%	30%	70%
L20	90%	80%	NA	90%
L21	70%	80%	90%	90%
L22	60%	60%	30%	70%
L23	70%	50%	40%	10%
L24	10%	NA	90%	10%
L25	20%	90%	80%	NA
L27	60%	70%	60%	70%
L28	70%	60%	30%	60%
L31	30%	70%	90%	20%
L32	30%	30%	80%	40%
L33	40%	90%	60%	80%
L34	NA	80%	NA	10%
L35	70%	70%	40%	70%
L36	10%	NA	80%	NA
L37	30%	NA	90%	70%
L38	50%	70%	40%	40%
L39	NA	70%	90%	90%
L40	80%	80%	30%	90%
L41	30%	70%	70%	40%
L43	20%	NA	NA	30%
L44	5%	NA	90%	NA
L45	50%	80%	80%	70%
L46	80%	90%	40%	90%
L47	30%	90%	100%	90%

Continua

Amostra	Continuação			
	<i>CCNA2</i>	<i>TOP2A</i>	<i>NFkB1</i>	<i>CHEK1</i>
L48	40%	NA	80%	60%
L54	80%	90%	30%	90%
L55	10%	NA	90%	80%
L57	70%	80%	40%	90%
L61	90%	90%	40%	80%
L65	NA	40%	40%	90%
L66	80%	70%	30%	90%
L67	50%	NA	50%	70%
L70	10%	30%	5%	10%
L71	80%	90%	30%	80%
L72	5%	NA	90%	30%
L73	50%	90%	50%	30%
L74	5%	NA	50%	60%
L76	80%	90%	NA	90%

CCNA2: Ciclina A 2

CHEK1: Quinase de checagem de ponto 1

NFkB1: Fator nuclear kappa B1

TOP2A: DNA topoisomerase 2α

NA: Não avaliável – referente a amostras exíguas, fragmentos não representativos de neoplasia, tumor com extensas áreas de necrose ou presença de controle interno negativo

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADVANI RH, FANALE MA, FORERO-TORRES A, ROSENBLATT JD, FRANKLIN AR, KENNEDY DA, HAN TH, SIEVERSD EL, BARTLETT NL. A phase I weekly dosing study of brentuximab vedotin in patients with relapsed/refractory CD30-positive hematologic malignancies. *Clin Cancer Res.* 2012; 18(1): 248-55.

ADVANI R, HORWITZ S, ZELENETZ A, HORNING SJ. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: treatment experience with cyclosporine. *Leuk Lymphoma.* 2007; 48(3): 521-5.

AGUIAR-BUJANDA D. Complete response of relapsed angioimmunoblastic T-cell lymphoma following therapy with bevacizumab. *Ann Oncol.* 2008; 19(2): 396-7.

ALIZADEH A, ELSER M, DAVIS RE, MA C, SABET H, TRAN T, POWELL JI, YANG L, MARTI GE, MOORE DT, HUDSON JR, CHAN WC, GREINER T, WEISENBURGER D, ARMITAGE JO, LOSSOS I, LEVY R, BOTSTEIN D, BROWN PO, STAUDT RW. The lymphochip: a specialized cDNA microarray for the genomic-scale analysis of gene expression in normal and malignant lymphocytes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1999; 64: 71-8.

ANAGNOSTOPOULOS I, HUMMEL M, FINN T, TIEMANN M, DIMMIER C, KORBUHN P, DALLENBACH F, NIEDOBITEK G, GATTER K, PARWARESCH MR, STEIN H. Heterogenous Epstein-Barr virus infection patterns in peripheral T-cell lymphoma of angioimmunoblastic lymphadenopathy type. *Blood.* 1992; 80(7): 1804-12.

ARMITAGE JO. Staging non-Hodgkin lymphoma. *CA Cancer J Clin.* 2005; 55(6): 368-76.

ARMITAGE JO. The aggressive peripheral T-cell lymphomas: 2012 Update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol.* 2012; 87: 512-19.

ASANO N, SUZUKI R, KAGAMI Y, ISHIDA F, KITAMURA K, FUKUTANI H, MORISHIMA Y, TAKEUCHI K, NAKAMURA S. Clinicopathologic and prognostic significance of cytotoxic molecule expression in nodal peripheral T-cell lymphoma unspecified. *Am J Surg Pathol.* 2005; 29(10): 1284-93.

ASCANI S, ZINZANI PL, GHERLINZONE F, SABATTINI E, BRISKOMATIS A, DE VIVO A, PICIOLLI M, FRATERNALI ORCIONE G, PIERI F, GOLDONI A, PICCALUGA PP, ZALLOCO D, BURNELLI R, LEONCINE L, FALINI B, TURA S, PILERI SA. Peripheral T-cell lymphomas: clinic-pathologic study of 168 cases diagnosed according to the R.E.A.L. classification. *Ann Oncol.* 1997; 8(6): 583-92.

ATTYGALLE A, AL-JEHAHI R, DISS TC, MUNSON P, LIU H, DU MQ, ISAACSON PG, DOGAN A. Neoplastic T cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma express CD10. *Blood*. 2002; 99(2): 627-33.

ATTYGALLE AD, KYRIAKOU C, DUPUIS J, GROGG KL, DISS TC, WOTHERSPOON AC, CHUANG SS, CABEÇADAS J, ISAACSON PG, DU MQ, GAULARD P, DOGAN A. Histologic evolution of angioimmunoblastic T-cell lymphoma in consecutive biopsies: clinical correlation and insights into natural history and disease progression. *Am J Surg Pathol*. 2007; 31(7): 1077-88.

BAI RY, OUYANG T, MIETHING C, MORRIS SW, PESCHEL C, DUYSER J. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase associated with anaplastic large-cell lymphoma activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic signaling pathway. *Blood*. 2000; 96(13): 4319-27.

BALLESTER B, RAMUZ O, GISSELBRECHT C, DOUCET G, LOÏ L, LORIOD B, BERTUCCI F, BOUABDALLAH R, DEVILARD E, CARBUCCIA N, MOZZICONACCI MJ, BIMBAUM D, BROUSSET P, BERGER F, SALLES G, BRIÈRE J, HOULGATTE R, GAULLARD P, XERRI L. Gene expression profiling identifies molecular subgroups among nodal peripheral T-cell lymphomas. *Oncogene*. 2006; 25(10): 1560-70.

BASEGGIO L, BERGER F, MOREL D, DELFAU-LARUE MH, GOEDERT G, SALLES G, MAGAUD JP, FELMAN P. Identification of circulating CD10 positive T cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Leukemia*. 2006; 20: 296-303.

BAUR AS, SHAW P, BURRI N, DELACRÉTAZ F, BOSMAN FT, CHAUBERT P. Frequent methylation silencing of p15(INK4b) (MTS2) and p16(INK4a) (MST1) in B-cell and T-cell lymphomas. *Blood*. 1999; 94(5): 1773-81.

BAYLE C, CHARPENTIER A, DUCHAYNE E, MANEL AM, PAGES MP, ROBERT A, LAMANT L, DASTUGUE N, BERTRAND Y, DIJOURD F, EMILE JF, MACHOVER D, BRUGIÈRES L, DELSOL G. Leukaemic presentation of small cell variant anaplastic large cell lymphoma: report of four cases. *Br J Haematol*. 1999; 104(4): 680-8.

BENHARROCH D, MEGUERIAN-BEDOYAN Z, LAMANT L, AMIN C, BRUGIÈRES L, TERRIER-LACOMBE MJ, HARALAMBIEVA E, PULFORD K, PILERI S, MORRIS SW, MASON DY, DELSOI G. ALK-positive lymphoma: a single disease with a broad spectrum of morphology. *Blood*. 1998; 91(6): 2076-84.

BIRD A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002; 16(1): 6-21.

BLYSTAD AK, ENBLAD G, KVALOY S, BERGLUND A, DELABIE J, HOLTE H, CARLSON K, KVALHEIM G, BENGTSSON M, HAGBERG H. High-dose therapy with autologous stem cell transplantation in patients with peripheral T-cell lymphoma. *Bone Marrow Transplant*. 2001; 27(7): 711-6.

BOI M, ZUCCA E, INGHIRAMI G, BERTONI F. Advances in understanding the pathogenesis of systemic anaplastic large cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2015; 168(6): 771-83.

BRADLEY SL, DINES DE, BANKS PM, HILL RW. The lung in immunoblastic T-cell lymphadenopathy. *Chest*. 1981; 80: 312-18.

BROUSSET P, ROCHAIX P, CHITTAL S, RUBLE H, ROBERT A, DELSOL G. High incidence of Epstein-Barr virus detection in Hodgkin's disease and absence of detection in anaplastic large cell lymphoma in children. *Histopathology*. 1993; 23(2): 189-91.

CARBONE PP, KAPLAN HS, MUSHOFF K, SMITHERS DW, TUBIANA M. Report of comitee on Hodgkin's disease staging classification. *Cancer Res*. 1971; 31(11): 1860-1.

CHANG ST, LU CL, CHUANG SS. CD52 expression in non-mycotic T- and NK/T-cell lymphomas. *Leuk Lymphoma*. 2007; 48(1): 117-21.

CHESON BD, FISHER RI, BARRINGTON SF, CAVALLI F, SCHWARTZ LH, ZUCCA E, LISTER TA. Recommendations for initial evaluation, staging and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol*. 2014; 32(27): 3059-68.

CHEUNG MM, CHAN JK, LAU WH, NGAN RK, FOO WW. Early stage nasal NK/T-cell lymphoma: clinical outcomes, prognostic factors, and the effect of treatment modality. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002; 54(1): 182-90.

CHO YU, CHI HS, PARK CJ, JANG S, SEO EJ, HUH J. Distinct features of angioimmunoblastic T-cell lymphoma with bone marrow involvement. *Am J Clin Pathol*. 2009; 131: 640-6.

COLUCCIA AM, PEREGO S, CLERIS L, GUNBY RH, PASSONI L, MARCHESI E, FORMELLI F, GAMBACORTI-PASSERINI C. Bcl-XL down regulation suppresses the tumorigenic potential of NPM/ALK in vitro and in vivo. *Blood*. 2004; 103(7): 2787-94.

CORRADINI P, TARELLA C, ZALLIO F, DODERO A, ZANNI M, VALAGUSSA P, GIANNI AM, RAMBALDI A, BARBUI T, CORTELLAZZO S. Long-term follow-up of patients with peripheral T-cell lymphoma treated up-front with high-dose chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation. *Leukemia*. 2006; 20(9): 1533-8.

COSTELLO R, SANCHEZ C, LE TREUT T, RIHET P, IMBÈRT J, SÉBAHOUN G. Peripheral T-cell lymphoma gene expression profiling and potential therapeutic exploitations. *Br J Haematol*. 2010; 150(1): 21-7.

CUADROS M, DAVE SS, JAFFE ES, HONRADO E, MILNE R, ALVES J, RODRIGUEZ J, ZAJAC M, BENITEZ J, STAUDT LM, MARTINEZ-DELGADO B. Identification of a proliferative signature related to survival in nodal peripheral T-cell lymphomas. *J Clin Oncol*. 2007; 25(22): 3321-9.

D' AMORE F, RELANDER T, LAURITZEN GF, JANTUNEN E, HAGBERG H, ANDERSON H, HOLTE H, ÖSTERBORG A, MERUP M, BROWN P, KUITTINEN O, ERLANSON M, OSTENSTAD B, FARGELI UM, GADEBERG OV, SUNDSTRÖM C, DELABIE J, RALFKIAER E, VORNANEN M, TOLDBOD HE. Up-front autologous stem cell transplantation in peripheral T-cell lymphoma: NGL-T-01. *J Clin Oncol*. 2012; 30(25): 3093-9.

DANG NH, HAGEMEISTER FB, PRO B, MC LAUGHLIN P, ROMAGUERA JE, JONES D, SAMUELS B, SAMANIEGO F, YOUNES A, WANG M, GOY A, RODRÍGUEZ MA, WALKER PL, ARREDONDO Y, TONG AT, FAYADA L. Phase II study of denileukin diftitox for relapsed/refractory non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2004; 22(20): 4095-102.

DEARDEN CE, JOHNSON R, PETTENGELL R, DEVEREUX S, CWYNARSKI K, WHITTAKER S, MC MILLIAN A. Guidelines for the management of mature T-cell and NK-cell neoplasms (excluding cutaneous T-cell lymphoma). *Br J Haematol*. 2011; 153: 451-85.

DE LEVAL L, BISIG B, THIELEN C, BONIVER J, GAULARD P. Molecular classification of T-cell lymphomas. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2009; 72(2): 125-42.

DE LEVAL L, GAULARD P. Pathobiology and molecular profiling of peripheral T-cell lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008: 272-9.

DE LEVAL L, GISSELBRECHT C, GAULARD P. Advances in the understanding and management of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2010; 148(5): 673-89.

DE LEVAL L, RICKMAN DS, THIELEN C, REYNIES AD, HUANG YL, DELSOL G, LAMANT L, LEROY K, BRIÈRE J, MOLINA T, BERGER F, GISSELBRECHT C, XERRI L, GAULARD P. The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood*. 2007; 109(11): 4952-63.

DE LEVAL L, SAVILO E, LONGTINE J, FERRY JA, HARRIS NL. Peripheral T-cell lymphoma with follicular involvement and a CD4+/bcl-6+ phenotype. *Am J Surg Pathol*. 2001; 25(3): 395-400.

DEMCHENKO YN, KUEHL WM. A critical role of NFkB pathway in multiple myeloma. *Oncotarget*. 2010; 1(1): 59-68.

DHEDIN N, GIRAUDIER S, GAULARD P, ESPEROU H, IFRAH N, MICHALLET M, MILPIED N, RIO B, CAHN JY, MOLINA L, LAPORTE JL, GUILHOT F, KUENTZ M. Allogeneic bone marrow transplantation in aggressive non-Hodgkin's lymphoma (excluding Burkitt and lymphoblastic lymphoma): a series of 73 patients from the SGFM database. Société Française de Greffe de Moelle. *Br J Haematol*. 1999; 107(1): 154-61.

DOGAN A, ATTYGALLE AD, KYIRIAKOU C. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2003; 121(5): 681-91.

DOGAN A, FELDMAN A. T- and NK-cell lymphoma update. *Diag Histopatol*. 2009; 16(2): 99-110.

DOGAN A, NGU LS, NG SH, CERVI PL. Pathology and clinical features of angioimmunoblastic T-cell lymphoma after successful treatment with thalidomide. *Leukemia*. 2005; 19(5): 873-5.

DORFMAN DM, BROWN JA, SHAHSAFAEL A, FREEMAN GJ. Programmed death-1 (PD-1) is a marker of germinal center-associated T cells and angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2006; 30(7): 802-10.

DREXLER HG. Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukemia-lymphoma cells. *Leukemia*. 1998; 12(6): 845-59.

DUECK G, CHUA N, PRASAD A, FINCH D, STEWART D, WHITE D, VAN DER JAQT R, JOHNSTON J, BELCH A, REIMAN T. Interim report of a phase II clinical trial of lenalidomide for T-cell non-Hodgkin lymphoma. *Cancer*. 2010; 116(9): 4541-8.

DUNLEAVY K, WILSON WH, JAFFE ES. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: pathobiological insights and clinical implications. *Curr Opin Hematol*. 2007; 14(4): 348-53.

DUPUIS J, BOYE K, MARTIN N, COPIE-BERGMAN C, PLONQUET A, FABIANI B, BAGLIN AC, HAIOUN C, DELFAU-LARUE MH, GAULARD P. Expression of CXCL13 by neoplastic cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL): a new diagnostic marker providing evidence that AITL derives from follicular T-helper cells. *Am J Surg Pathol*. 2006; 30(4): 490-4.

ELSTROM R, GUAN L, BAKER G, NAKHODA K, VERGILIO JA, ZHUANG H, PITSILOS S, BAGG A, DOWNS L, MEHROTRA A, KIM S, ALAVI A, SCHUSTER SJ. Utility of FDG-PET scanning in lymphoma by WHO classification. *Blood*. 2003; 101(10): 3875-6.

ENBLAD G, HAGBERG H, ERLANSON M, LUNDIN J, MACDONALD AP, REPP R, SCHETELING J, SEIPELT G, OSTERNBORG A. A pilot study of alemtuzumab (antiCD52 monoclonal antibody) therapy for patients with relapsed or chemotherapy refractory peripheral T-cell lymphoma. *Blood*. 2004; 103(8): 2920-4.

EVENS AM, GARTENHAUS RB. Treatment of T-cell non Hodgkin's lymphomas. *Curr Treat Options Oncol*. 2004; 5(4): 289-303.

FALINI B. Anaplastic large cell lymphoma: pathological, molecular and clinical features. *Br J Haematol*. 2001; 114(4): 741-60.

FALINI B, BIGERNA B, FIZZOTTI M, PULFORD K, PILERI SA, DELSOL G, CARBONE A, PAULLI M, MAGRINI U, MENESTRINA F, GIARDINI R, PILOTTI S, MEZZELANI A, UGOLINI B, BILLI M, PUCCIARINI A, PACINI R, PELICCI PG, FLENGHI L. ALK expression defines a distinct group of T/null lymphomas ("ALK lymphomas") with a wide morphological spectrum. *Am J Pathol*. 1998; 153(3): 875-6.

FALINI B, PILERI S, ZINZANI PL, CARBONE A, ZAGONEI V, WOLF-PEETERS C, VERHOEF G, MENESTRINA F, TODESCHINI G, PAULLI M, LAZZARINO M, GIARDINI R, AIELLO A, FOSS HD, ARAUJO I, FIZZOTTI M, PELICCI PG, FIENGHI L, MARTELLI MF, SANTUCCI A. ALK-positive lymphoma: clinic-pathological findings and outcome. *Blood*. 1999; 93(8): 2697-706.

FEINMAN R, SIEGEL DS, BERENSON J. Regulation of NFkB in multiple myeloma: therapeutic implications. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2004; 2(3): 162-6.

FELDMAN AL, DOGAN A. Diagnostic uses of PAX5 immunohistochemistry. *Adv Anat Pathol*. 2007; 14(5): 323-34.

FELLER A, GRIESSER H, SCHILLING C, WACKER H, DALLENBACH F, BARTELS H, KUSE R, MAK T, LENNERT K. Clonal gene rearrangement patterns correlate with immunophenotype and clinical parameters in patients with angioimmunoblastic lymphadenopathy. *Am J Pathol*. 1988; 133: 549-56.

FERRERI AJ, GOVI S, PILERI SA, SAVAGE KJ. Anaplastic large cell lymphoma ALK positive. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012; 83(2): 293-302.

FEYLER S, PRINCE HM, PEARCE R, TOLWSON K, NIVISON-SMITH I, SCHEY S, GIBSON J, PATTON N, BRADSTOCK K, MARKS DI, COOK G. The role of high-dose therapy and stem cell rescue in the management of T-cell malignant lymphomas: a BSBMT and ABMTRR study. *Bone Marrow Transplant*. 2007; 40(5): 443-50.

FISHER RI, GAYNOR ER, DAHLBERG S, OKEN MM, GROGAN TM, MIZE EM, GLICK JH, COLTMAN CA, MILLER TP. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphomas. *N Engl J Med*. 1993; 328(14): 1002-6.

FORNARI A, PIVA R, CHIARLE R, NOVERO D, INGHIRAMI G. Anaplastic large cell lymphoma: one or more entities among T-cell lymphoma?. *Hematol Oncol*. 2009; 27(4): 161-70.

FOSS FM. Treatment strategies for peripheral T-cell lymphomas. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2013; 26(1): 43-56.

FOSS HD, ANAGNOSTOPOULOS I, ARAUJO I, ASSAF C, DEMEL G, KUMMER JA, HUMMEL M, STEIN H. Anaplastic large cell lymphomas of T-cell and null-cell phenotype express cytotoxic molecules. *Blood*. 1996; 73(3): 145-7.

FRIZZERA G, MORAN EM, RAPPAPORT H. Angio-immunoblastic lymphadenopathy with dysproteinemia. *Lancet*. 1974; 1(7866): 1070-3.

GALLAMINI A, STELITANO C, CALVI R, BELLEI M, MATTEI D, VITOLO U, MORABITO F, MARTELLI M, BRUSAMOLINO E, IANNITO E, ZAJA F, CORTELAZZO S, RIGACCI L, DEVIZZI L, TODESCHINI G, SANTINI G, BRUGIATELLI M, FEDERICO M. Peripheral T-cell lymphoma unspecified (PTCL-U): a new prognostic model from a retrospective multicentric clinical study. *Blood*. 2004; 103(7): 2474-9.

GAMBACORTI-PASSERINI C, MESSA C, POGLIANI EM. Crizotinib in anaplastic-large cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2011; 364(8): 775-6.

GARCÍA MJ, MARTINEZ-DELGADO B, CEBRIAN A, MARTÍNEZ A, BENÍTEZ J, RIVAS C. Different incidence and pattern of p15INK4b and p16INK4a promoter region hypermethylation in Hodgkin's and CD30-positive non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol.* 2002; 161(3): 1007-13.

GASCOYNE RD, AOUN P, WU D, CHHANABHAI M, SKINNIDER BF, GREINER TC, MORRIS SW, CONNORS JM, VOSE JM, VISWANATHA DS, COLDMAN A, WEISENBURGER DD. Prognostic significance of anaplastic lymphoma kinase (ALK) protein expression in adults with anaplastic large cell lymphoma. *Blood.* 1999; 93(11): 3913-21.

GEISSINGER E, ODENWALD T, LEE SS, BONZHEIN I, ROTH S, REIMER P, WILHELM M, MÜLLER-HEMERLINK HK, RUDIGER T. Nodal peripheral T-cell lymphomas and, in particular, their lymphoepithelioid (Lennert's) variant are often derived from CD8(+) cytotoxic T-cells. *Virchows Arch.* 2004; 445(4): 334-43.

GERLANDO Q, BARBERA V, AMMATUNA E, FRANCO V, FLORENA AM, MARIANI G. Successful treatment of angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteinemia-type T-cell lymphoma by combined methotrexate and prednisolone. *Haemathologica.* 2000; 85(8): 880-1.

GISSELBRECHT C, GAULARD P, LEPAGE E, COIFFIER B, BRIÈRE J, HAIOUN C, CAZAIS-HATEM D, BOSLY A, XERRI L, TILLY H, BERGER F, BOUHABDALLAH R, DIEBOLD J. Prognostic significance of T-cell phenotype in aggressive non-Hodgkin's lymphoma Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adult (GELA). *Blood.* 1998; 92(1): 76-82.

GOUVEIA GR, SIQUEIRA SAC, CHAMONE DAF, PEREIRA J. Prevalence of non-Hodgkin lymphomas in São Paulo, Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2011; 33(4): 317.

GROGG KL, ATTYGALLE AD, MACON WR, REMSTEIN ED, KURTIN PJ, DOGAN A. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: a neoplasm of germinal center T-helper cells?. *Blood.* 2005; 106(4): 1501-2.

GROGG KL, ATTYGALLE AD, MACON WR, REMSTEIN ED, KURTIN PJ, DOGAN A. Expression of CXCL-13, a chemokine highly upregulated in germinal center T-helper cells, distinguishes angioimmunoblastic T-cell lymphoma from peripheral T-cell lymphoma, unspecified. *Mod Pathol.* 2006; 19(8): 1101-7.

GUTIÉRREZ-GARCÍA G, GARCÍA-HERRERA A, CARDESA T, MARTÍNEZ A, VILLAMOR N, GHITTA G, MARTÍNEZ-TRILLOS A, COLOMO L, SETOAIN X,

RODRÍGUEZ S, GINÉ E, CAMPO E, LÓPEZ-GUILLERMO A. Comparison of four prognostic scores in peripheral T-cell lymphoma. *Ann Oncol*. 2011; 22(2): 397-404.

HAMIDOU MA, EL KOURI D, AUDRAIN M, GROLLEAU JY. Systemic antineutrophil cytoplasmic antibody vasculitis associated with lymphoid neoplasia. *Ann Rheum Dis*. 2001; 60(3): 293-5.

HARRIS NL, JAFFE ES, STEIN H, BANKS PM, CHAN JK, CLEARY ML, DELSOI G, WOLF-PEETERS C, FALINI B, GATTER KC. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994; 84:1361-92.

HAST R, JACOBSSON B, PETRUSCO A, HJALMAR V. Successful treatment with fludarabine in two cases of angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteinemia. *Leuk Lymphoma*. 1999; 34(5-6): 597-601.

HERMAN JG, LATIF F, WENG Y, MERMAN MI, ZBAR B, LIU S, SAMID D, DUAN DS, GNARRA JR, LINEHAN WM. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Scie USA*. 1994; 91(21): 9700-4.

HOLLIDAY R. Epigenetic inheritance based on DNA methylation. *EXS*. 1993; 64: 452-68.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/vigilancia/>>. Acesso em: 12 abril. 2015.

ISHIDA T, IIDA S, AKATSUKA Y, ISHII T, MYAZAKI M, KOMATSU H, INAGAKI H, OKADA N, FUJITA T, SHITARA K, AKINAGA S, TAKAHASHI T, UTSUNOMYIA A, UEDA R. The CC chemokine receptor 4 as a novel specific molecular target for immunotherapy in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(22): 7529-39.

JAFFE ES, NICOLAE A, PITTALUGA S. Peripheral T-cell and NK-cell lymphomas in the WHO classification: pearls and pitfalls. *Mod Pathol*. 2013; Suppl 1: S71-87.

JAGASIA M, MORGAN D, GOODMAN S, HAMILTON K, KINNEY M, SHYR Y, STEIN R, ZIC J, GREER P. Histology impacts the outcome of peripheral T-cell lymphomas after high-dose chemotherapy and stem cell transplant. *Leuk Lymphoma*. 2004; 45(11): 2261-7.

JOLY B, FRENKEL V, GAULARD P, BELHADJ K, GNAOUI TE, DUPUIS J, DIVINE M, RAHMOUNI A, BERGMAN CC, DELFAU-LARUE MH, REYES F,

HAIOUN C. Rituximab in combination with CHOP regimen in angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL). Preliminary results in 9 patients treated in a single institution. 2005. *Blood ASH Annual Meeting Abstracts*; 106: abstract 2686.

JOLY B, PLONQUET A, GRARE M, DELFAU-LARUE M, DELARUE R, DELMER A, CASASNOVAS O, GISSELBRECHT C, GAULARD P, and HAIOUN C. Rituximab in combination with CHOP regimen in angioimmunoblastic T-cell lymphoma: Results of a phase II RAIL trial – A prospective study of Groupe d’Etude des Lymphomes de l’Adult (GELA). *J Clin Oncol*. 2010; 28: 15 s abstract 8049.

JONES PA. DNA METHYLATION ERRORS AND CANCER. *CANCER RES*. 1996; 56(11): 2463-7.

KANEKI T, KAWASHIMA A, AKAMATSU T, TANAKA N, KUBO K, KOIZUMI T, SEKIGUCHI M, HOSAKA N, HONDA T, KOIKE S, ADACHI W. Immunoblastic lymphadenopathy –like T-cell lymphoma complicated by multiple gastrointestinal involvement. *J Gastroenterol*. 1999; 34: 253-9.

KANEKO Y, MASEKI N, SAKURAI M, TAKAYAMA S, NANBA K, KIKICHI M, FRIZZERA G. Characteristic karyotypic pattern in T-cell lymphoproliferative disorders with reactive “angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteinemia-type” features. *Blood*. 1988; 72: 413-21.

KANG HY, HWANG JH, PARK YS, BANG SM, LEE JS, CHUNG JH, KIM H. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma mimicking Crohn’s disease. *Digest Dis Sciences*. 2007; 52: 2743-7.

KANSARA R, SAVAGE KJ. The problem with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone for the treatment of peripheral T-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2014; 55(4): 727-9.

KARUBE K, AOKI R, NOMURA Y, YAMAMOTO K, SHIMIZU K, YOSHIDA S, KOMATANI H, SUGITA Y, OHSIMA K. Usefulness of flow cytometry for differential diagnosis of precursor and peripheral T-cell and NK-cell lymphomas: analysis of 490 cases. *Pathol Int*. 2008; 58(2): 89-97.

KEWALRAMANI T, ZELENETZ AD, TERUYA-FELDSTEIN J, HAMLIN P, YAHALOM J, HORWITZ S, NIMER SD, MOSKOWITZ CH. Autologous transplantation for relapsed or primary refractory peripheral T-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2006; 134(2): 202-7.

KHONG PL, PANG CB, LIANG R, KWONG YL, AU WY. Fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography in mature T-cell and natural killer cell malignancies. *Ann Hematol*. 2008; 87(8): 613-21.

KRENACS L, SCHAERLI P, KIS G, BAGDI E. Phenotype of neoplastic cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma is consistent with activated follicular B helper T cells. *Blood*. 2006; 108(3): 1110-1.

KRENACS L, WELLMANN A, SORBARA L, HIMMELMANN AW, BAGDI E, JAFFE ES, RAFFELD M. Cytotoxic cell antigen expression in anaplastic large cell lymphoma of T- and null-cell type and Hodgkin's disease: evidence for distinct cellular origin. *Blood*. 1997; 89(3): 980-9.

KYRIAKOU C, CANALS C, GOLDSTONE A, CABALLERO D, METZNER B, KOBBE G, KOLB HJ, KIENAST J, REIMER P, FINKE J, OBERG G, HUNTER A, THEORIN N, SUREDA A, SCHMITZ N. High-dose therapy and autologous stem cell transplantation in angioimmunoblastic lymphoma: complete remission at transplantation is the major determinant of outcome-lymphoma working party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *J Clin Oncol*. 2008; 26(2): 218-24.

LACHENAL F, BERGER F, GHESQUIERES H, BIRON P, HOT A, CALLET-BAUCHU E, CHASSAGNE C, COIFFIER B, DURIE L, ROUSSET H, SALLES G. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: clinical and laboratory features at diagnosis in 77 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2007; 86: 282-92.

LAMANT L, DE REYNIÈS A, DUPLANTIER MM, RICKMAN DS, SABOURDY F, GIURIATO S, BRUGIÈRES L, GAULARD P, ESPINOS E, DELSOL G. Gene-expression profiling of systemic anaplastic large-cell lymphoma reveals differences based on ALK status and two distinct morphologic ALK+ subtypes. *Blood*. 2007; 109(5): 2156-64.

LAMANT L, MEGGETTO F, AL SAATI T, BRUGIÈRES L, DE PAILLERETS BB, DASTUGUE N, BERNHEIM A, RUBIE H, TERRIER-LACOMBE MJ, ROBERT A, RIGAI F, SCHLAIFER D, SHIUTA M, MORI S, DELSOL G. High incidence of the t(2;5) (p23;q35) translocation in anaplastic large cell lymphoma and its lack of detection in Hodgkin's disease. Comparison of cytogenetic analysis, reverse transcriptase-polymerase chain reaction and P80 immunostaining. *Blood*. 1996; 87(1): 284-91.

LEE PS, LIN CN, CHUANG SS. Immunophenotyping of angioimmunoblastic T-cell lymphomas by multiparameter flow cytometry. *Pathol Res Pract*. 2003; 199(8): 539-45.

LE GOUILL S, MILPIED N, BUZYIN A, DE LATOUR RP, VERNANT JP, MOHTY M, MOLES MP, BOUABDALLAH K, BULABOIS CE, DUPUIS J, RIO B, GRATECOS N, YAKOUB-AGA I, ATTAL M, TOURNILHAC O, DECAUDIN D, BOURHIS JH, BLAISE D, VOLTEAU C, MICHALLET M. Graft-versus-lymphoma

effect for aggressive T-cell lymphomas in adults: a study by Société Française de Greffe de Moëlle et de Therapie Cellulaire. *J Clin Oncol*. 2008; 26(14): 2264-71.

LENNERT K. Nature, prognosis and nomenclature of angioimmunoblastic lymphadenopathy (lymphogranulomatosis X or T-zone lymphoma). *Dtsch Med Wochenschr*. 1979; 104(35): 1246-7.

LEPRETE S, BUCHONNET G, STAMATOULLAS A, LENAIN P, DUVAL C, D'ANJOU J, CALLAT MP, TILLY H, BASTARD C. Chromosome abnormalities in peripheral T-cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2000; 117(1): 71-9.

LEVENTAKI V, DRAKOS E, MEDEIROS LJ, LIM MS, ELENITOBA-JOHNSON KS, CLARET FX, RASIDAKIS GZ. NPM-ALK oncogenic kinase promotes cell-cycle progression through activation of JNK/cJun signaling in anaplastic large cell lymphoma. *Blood*. 2007; 110(5): 1621-30.

LISTER TA, CROWTHER D, SUTCLIFFE SB, GLATSTEIN E, CANELLOS GP, YOUNG RC, ROSENBERG SA, COLTMAN CA, TUBIANA M. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol*. 1989; 7(11): 1630-6.

LI YX, YAO B, JIN J, WANG WH, LIU YP, SONG YW, WANG SL, LIU XF, ZHOU LQ, HE XH, LU N, YU ZH. Radiotherapy as primary treatment for stage IE and IIE nasal natural killer/T-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006; 24(1): 181-9.

LÓPEZ-GUILLERMO A, CID J, SALAR A, LÓPEZ A, MONTALBÁN C, CASTRILLO JM, GONZÁLEZ M, RIBERA JM, BRUNET S, GARCÍA-CONDE J, FERNÁNDEZ DE SEVILLA A, BOSCH F, MONTSERRAT E. PERIPHERAL T-CELL LYMPHOMAS: initial features, natural history, and prognostic factors in a series of 174 patients diagnosed according to the R.E. A. L. classification. *Ann Oncol*. 1998; 9(8): 849-55.

LUKES RJ, TINDLE BH. Immunoblastic lymphadenopathy: a hyperimmune entity resembling Hodgkin's disease. *N Engl J Med*. 1975; 292(1): 1-8.

MARTEL P, LAROCHE L, COURVILLE P, LARROCHE C, WECHSLER J, LENORMAND B, DELFAU MH, BODEMER C, BAGOT M, JOLY P. Cutaneous involvement in patients with angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteinemia: a clinical, immunohistological, and molecular analysis. *Arch Dermatol*. 2000; 136: 881-6.

MARTINEZ-DELGADO B, CUADROS M, HONRADO E, RUIZ DE LA PARTE A, RONCADOR G, ALVES J, CASTRILLO JM, RIVAS C, BENÍTEZ J. Differential

expression of NF-kappa B pathway genes among peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia*. 2005; 19(12): 2254-63.

MARTINEZ-DELGADO B, MELENDÉZ B, CUADROS M, ALVAREZ J, CASTRILLO JM, RUIZ DE LA PARTE A, MOLLEJO M, BELLAS C, DIAZ R, LOMBARDÍA L, AL-SHAROUHR F, DOMÍNGUEZ O, CASCON A, ROBLEDO M, RIVAS C, BENITEZ J. Expression profiling of T-cell lymphomas differentiates peripheral and lymphoblastic lymphoma and defines survival related genes. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(15): 4971-82.

MELNYK A, RODRIGUEZ A, PUGH WC, CABANILLAS F. Evaluation of Revised European-American classification confirms the clinical relevance of immunophenotype in 560 cases of aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997; 89(12): 4514-20.

MERCADAL S, BRIONES J, XICOY B, PEDRO C, ESCODA L, ESTANY C, CAMÓS M, COLOMO L, ESPINOSA I, MARTÍNEZ S, RIBERA JM, MARTINO R, GUTIÉRREZ-GARCÍA G, MONTSERRAT E, LÓPEZ-GUILLERMO A. Intensive chemotherapy (high dose CHOP/ESHAP regimen) followed by autologous stem-cell transplantation in previously untreated patients with peripheral T-cell lymphoma. *Ann Oncol*. 2008; 19(5): 958-63.

MERCHANT SH, AMIN MB, VISWANATHA DS. Morphologic and immunophenotypic analysis of angioimmunoblastic T-cell lymphoma: Emphasis on phenotypic aberrancies for early diagnosis. *Am J Clin Pathol*. 2006; 126(1): 29-38.

MIYAZAKI K, YAMAGUCHI M, IMAI H, KOBAYASHI T, TAMURU S, NISHI K, YUDA M, SHIKU H, KATAYAMA N. Gene expression profiling of peripheral T-cell lymphoma including gammadelta T-cell lymphoma. *Blood*. 2009; 113(5): 1071-4.

MOMPARLER RL, BOVENZI V. DNA methylation and cancer. 2000; 183(2): 145-54.

MOSKOWITZ AJ, LUNNING MA, HORWITZ SM. How I treat the peripheral T-cell lymphomas. *Blood*. 2014; 123: 2636-44.

MORRIS SW, KIRSTEIN MN, VALENTINE MB, DITTMER K, SHAPIRO DN, LOOK AT, SALTMAN DL. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. 1995; 267(5196): 316-7.

MOUNIER N, GISSELBRECHT C, BRÈRE J, HAIOUN C, FEUGIER P, OFFNER F, RECHER C, STAMATOULLAS A, MORSCHAUER F, MACRO M, THIEBLEMONT C, SONET A, FABIANI B, REYES F. All aggressive lymphoma subtypes do not share similar outcome after front-line autotransplantation: a matched

control analysis by Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Ann Oncol*. 2004; 15(12): 1790-7.

MOURAD N, MOUNIER N, BRIÈRE J, RAFFOUX E, DELMER A, FELLER A, MEIJER CS, EMILE JF, BOUABDALLAH R, BOSLY A, DIEBOLD J, HAIOUN C, COIFFIER B, GISSELBRECHT C, GAULARD P. Clinical, biologic, and pathologic features in 157 patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma treated within the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'adult (GELA) trials. *Blood*. 2008; 111(9): 4463-70.

NAKAMURA M, SUGITA K, INUKAI T, GOI K, MIYAMOTON, KAGAMI K, OKAZAKI-KOYAMA T, MORI T, SAITO M, NAKAZAWA S. Abnormalities of the p16INK4a gene in childhood B-precursor acute lymphoblastic leucemia without nonrandom translocations: analysis of seven matched pairs of primary leucemia and corresponding cell line. *Leukemia*. 2001; 15(7): 1136-9.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Disponível em: <<http://seer.cancer.gov/data/>>. Acesso em: 12 abril. 2015.

NELSON M, HORSMAN DE, WEISENBURGER DD, GAYSCONE RD, DAVE BJ, LOBERIZA FR, LUDKOVSKI O, SAVAGE KJ, ARMITAGE JO, SANGER WG. Cytogenetic abnormalities and clinical correlations in peripheral T-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2008; 141(4): 461-9.

O'CONNOR OA, PRO B, PINTER-BROWN L, BARTLETT N, POPPLEWELL L, COIFFIER B, LECHOWICZ MJ, SAVAGE KJ, SHUSTOV AR, GISSELBRECHT C, JACOBSEN E, ZINZANI PL, FURMAN R, GOY A, HAIOUN C, CRUMP M, ZAIN JM, HSI E, BOYD A, HORWITZ S. Pralatrexate in patients with relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma: results from the pivotal PROPEL study. *J Clin Oncol*. 2011; 29(9): 1182-9.

O'LEARY HM, SAVAGE KJ. The spectrum of peripheral T-cell lymphomas. *Curr Opin Hematol*. 2009b; 16(4): 292-8.

O'LEARY HM, SAVAGE KJ. Update on the World Health Organization classification of peripheral T-cell lymphomas. *Curr Hematol Malig Rep*. 2009a; 4(4): 227-35.

OTSUKI T, CLARK HM, WELLMANN A, JAFFE ES, RAFFELD M. Involvement of CDKN2 (p16INK4a/MST1) and p15INK4b/MST2 in human leukemias and lymphomas. *Cancer Res*. 1995; 55(7): 1436-40.

OTTERSON GA, KHLEIF SN, CHEN W, COXON AB, KAYE FJ. CDKN2 gene silencing in lung cancer by DNA hypermethylation and kinetics of p16INK4 protein induction by 5-aza 2' deoxycytidine. *Oncogene*. 1995; 11(6): 1211-6.

PATSOURIS E, NOËL H, LENNERT K. Angioimmunoblastic lymphadenopathy-type of T-cell lymphoma with a high content of epithelioid cells. Histopathology and comparison with lymphoepithelioid cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 1989; 13(4): 262-75.

PAUTIER P, DEVIDAS A, DELMER A, DOMBRET H, SUTTON I, ZINI JM, NEDELEC G, MOLINA T, MAROLLEAU JP, BRICE P. Angioimmunoblastic-like T-cell non Hodgkin's lymphoma: outcome after chemotherapy in 33 patients and review of the literature. *Leuk Lymphoma*. 1999; 32: 545-52.

PELLATT J, SWEETNHAM J, PIKERING RM, BROWN L, WILKINS B. A single-center study of treatment outcome and survival in 120 patients with peripheral T-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Hematol*. 2002; 81(5): 267-72.

PETRICH AM, HELENOWSKI IB, BRYAN LG, ROZELI SA, GALAMAGA R, NABHAN C. Factors predicting survival in peripheral T-cell lymphoma in the USA: a population based analysis of 8802 patients in the modern era. *Br J Haematol*. 2014; 168(5): 708-18.

PICCALUGA PP, AGOSTINELLI C, CALIFANO A, CARBONE A, FANTONI L, FERRARI S, GAZZOLA A, GIOGHINI A, RIGHI S, ROSSI M, TAGLIAFICO E, ZINZANI PL, ZUPO S, BACCARANI M, PILERI SA. Gene expression analysis of angioimmunoblastic lymphoma indicates derivation from T follicular helper cells and vascular endothelial growth factor deregulation. *Cancer Res*. 2007a; 67(22): 10703-10.

PICCALUGA PP, AGOSTINELLI C, CALIFANO A, ROSSI M, BASSO K, ZUPO S, WENT P, KLEIN U, ZINZANI PL, BACCARANI M, DALLA FAVERA R, PILERI AS. Gene expression analysis of peripheral T-cell lymphoma, unspecified reveals distinct profiles and new potential therapeutic targets. *J Clin Invest*. 2007b; 117(3): 823-34.

PICCALUGA PP, FULIGNI F, DE LEO A, BERTUZZI C, ROSSI M, BACCI F, SABATINNI E, AGOSTINELLI C, GAZZOLA A, LAGINESTRA MA, MANNU C, SAPIENZA MR, HARTMANN S, HANSMANN ML, PIVA R, IQBAI J, CHAN JC, WEISENBURGER D, VOSE JM, BELLEI M, FEDERICO M, INGHIRAMI G, ZINZANI PL, PILERI SA. Molecular profiling improves classification and prognostication of nodal peripheral T-cell lymphomas: results of a phase III diagnostic accuracy study. *J Clin Oncol*. 2013; 31(24): 3019-25.

PIETERS R, MARTENS J, DEQUEKER J. Rheumatoid arthritis associated with bronchiolitis obliterans and immunoblastic sarcoma. *Clin Rheumatol*. 1982; 1(1): 35-40.

PIVA R, AGNELLI R, PELLEGRINO E, TODOERTI K, GROSSO V, TAMAGNO I, FORNARI A, MARTINOGLIO B, MEDICO E, ZAMO A, FACHETTI F, PONZONI M, GEISSINGER E, ROSENWALD A, MÜLLER-HERMELINK HK, WOLFF-PETERS C, PICCALUGA PP, PILERI S, NERI A, INGHIRAMI G. Gene expression profiling uncovers molecular classifiers for the recognition of anaplastic large-cell lymphoma within peripheral T-cell neoplasms. *J Clin Oncol*. 2010; 28(9): 1583-90.

PIVA R, PELLEGRINO E, MATTIOLLI M, AGNELLI L, LOMBARDI L, BOCCALATTE F, COSTA G, RUGGERI BA, CHENG M, CHIARLI R, PALESTRO G, NERI A, INGHIRAMI G. Functional validation of the anaplastic lymphoma kinase signature identifies CEBPB and BCL2A1 as critical target genes. *J Clin Invest*. 2006; 116(12): 3171-82.

RASSIDAKIS GZ, THOMALES A, ATWELL C, FORD R, JONES D, CLARET FX, MEDEIROS LJ. JunB expression is a common feature of CD30+ lymphomas and lymphomatoid papulosis. *Mod Pathol*. 2005; 18(10): 1365-70.

REE HJ, KADIN ME, KIKUCHI M, KO YH, GO JH, SUZUMIYA J, KIM DS. Angioimmunoblastic lymphoma (AIDL-type T-cell lymphoma) with hyperplastic germinal centers. *Am J Surg Pathol*. 1998; 22(6): 643-55.

REE HJ, KADIN ME, KIKUCHI M, KO YH, GO JH, SUZUMIYA J. Bcl-6 expression in reactive follicular hyperplasia, follicular lymphoma and angioimmunoblastic T-cell lymphoma with hyperplastic germinal centers heterogeneity of intrafollicular T-cells and their altered distribution in the pathogenesis of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Hum Pathol*. 1999; 30(4): 403-11.

REIMER P, RÜDIGER T, GEISSINGER E, WEISSINGER S, NERL C, SCHMITZ N, ENGERT A, EINSELE H, MÜLLER-HEMMERLINK HK, WILHEIM M. Autologous stem-cell transplantation as first-line therapy in peripheral T-cell lymphomas: results of a prospective multicenter study. *J Clin Oncol*. 2009; 27(1): 106-13.

REISER M, JOSTING A, SOLTANI M, STAIB P, SALZBERGER B, DIEHL V, ENGERT A. T-cell non-Hodgkin's lymphomas in adults: clinical/pathological characteristics, response to treatment and prognostic factors. *Leuk Lymphoma*. 2002; 43(4): 805-11.

RIBGY S, HUANG Y, STREUBEL B, CHOTT A, DU MQ, TURNER SD, BACON CM. The lymphoma-associated fusion tyrosine kinase ITK-SYK requires pleckstrin

homology domain-mediated membrane localization for activation and cellular transformation. *J Biol Chem*. 2009; 284(39): 26871-81.

RIVZI MA, EVENS AM, TALLMAN MS, NELSON BP, ROSEN ST. T-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006; 107(4): 1255-64.

RODRÍGUEZ J, CONDE E, GUTIÉRREZ A, ARRANZ R, LEÍN A, MARÍN J, BENDANDI M, ALBO C, CABALLERO MD. Frontline autologous stem cell transplantation in high-risk peripheral T-cell lymphoma: a prospective study from the Gel-Tamo study Group. *Eur J Haematol*. 2007; 79(1): 32-8.

RODRÍGUEZ-JUSTO M, ATTYGALLE AD, MUNSON P, RONCADOR G, MARAFIOTI T, PIRIS MA. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma with hyperplastic germinal centers: a neoplasia with origin in the outer zone of the germinal center? Clinicopathological and immunohistochemical study of 10 cases with follicular T-cell markers. *Mod Pathol*. 2009; 22(6): 753-61.

ROHATINER A, D'AMORE F, COIFFIER B, CROWTHER D, GOSPODAROWICZ M, ISAACSON P, LISTER TA, NORTON A, SALEM P, SHIPP M. Report on a workshop convened to discuss the pathological and staging classifications of gastrointestinal tract lymphomas. *Ann Oncol*. 1994; 5(5): 397-400.

RONCADOR G, GARCÍA VERDES-MONTENEGRO JF, TEDOLDI S, PATERSON JC, KLAPPER W, BALLABIO E, MAESTRE L, PILERI S, HANSMANN ML, PIRIS MA, MASON DY, MARAFIOTI T. Expression of two markers of germinal center T cells (SAP and PD-1) in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Haematologica*. 2007; 92(8): 1059-66.

RUAN J, LEONARD JP. Targeting angiogenesis: a novel, rational therapeutic approach for non-Hodgkin lymphomas. *Leuk Lymphoma*. 2009; 50(5): 679-81.

RÜDIGER T, GEISSINGER E, MÜLLER-HERMELINK HK. "Normal counterparts" of nodal peripheral T-cell lymphomas. *Hematol Oncol*. 2006; 24(4): 175-80.

RÜDIGER T, ICHINOHASAMA R, OTT MM, MÜLLER-DEUBERT S, MIURA I, OTT G, MÜLLER-HERMELINK HK. Peripheral T-cell lymphoma with distinct perifollicular growth pattern: a distinct subtype of T-cell lymphoma?. *Am J Surg Pathol*. 2000; 24(1): 117-22.

RÜDIGER T, WEISENBURGER DD, ANDERSON JR, ARMITAGE JO, DIEBOLD J, MACLENNAN KA, NATHWANI BN, ULLRICH F, MÜLLER-HERMELINK HK. Peripheral T-cell lymphoma (excluding anaplastic large cell lymphoma): results

from the Non-Hodgkin Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol.* 2002; 13(1): 140-9.

SAVAGE KJ. Prognosis and primary therapy in peripheral T-cell lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2008; 1: 280-8.

SALAVERRIA I, BÈA S, LOPEZ-GUILLERMO A, LESPINET V, PINYOL M, BURKHARDT B, LAMANT L, ZETTI A, HORSMAN D, GAYSCONE R, OTT G, SIEBERT R, DELSOL G, CAMPO E. Genomic profiling reveals different genetic aberrations in systemic ALK-positive and ALK-negative anaplastic large cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2008; 140(5): 516-26.

SALLAH S, WAN JY, NGUYEN NP. Treatment of refractory T-cell malignancies using gemcitabine. *Br J Haematol.* 2001; 113(1): 185-7.

SALLAH S, WEHBIE R, LEPERA P, SALLAH W, BOBZIEN W. The role of 2-chlorodeoxyadenosine in the treatment of patients with refractory angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteinemia. *Br J Haematol.* 1999; 104(1): 163-5.

SAVAGE KJ, CHHANABHAI M, GAYSCONE RD, CONNORS JM. Characterization of peripheral T-cell lymphoma in a single North American institution by WHO classification. *Ann Oncol.* 2004; 15(10): 1467-75.

SAVAGE KJ. Peripheral T-cell lymphomas. *Blood Rev.* 2007; 21(4): 201-16.

SCHETELIG J, FETSCHER S, REICHLER A, BERDEL WE, BEGUIN Y, BRUNET S, CABALLERO D, MAJOLINO I, HAGBERG H, JOHNSEN HE, KIMBY E, MONTSERRAT E, STEWART D, COPPLESTONE A, RÖSLER W, PAVEL J, KINGREEN D, SIEGERT W. Long-term disease-free survival in patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma after high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. *Haematologica.* 2003; 88(11): 1272-8.

SCHMITZ N, TRÜMPER L, ZIEPART M, NICKELSEN M, HO AD, METZNER B, PETER N, LOEFFLER M, ROSENWALD A, PFREUNDSCHUH M. Treatment and prognosis of mature T-cell and NK-cell lymphoma: an analysis of patients with T-cell lymphoma treated in studies of German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group. *Blood.* 2010; 116(18): 3418-25.

SIEGERT W, AGTHE A, GRIESSER H, SCHWERDTFEGER R, BRITTINGER G, ENGELHARD M, KUSE R, TEIEMANN M, LENNERT K, HUH D. Treatment of angioimmunoblastic lymphadenopathy (AIDL)-type T-cell lymphoma using prednisone with or without the COPBLAM/IMVP-16 regimen. A multicenter study. Kiel Lymphoma Study Group. *Ann Intern Med.* 1992; 117(5): 364-70.

SIMON A, PEOCH M, CASASSUS P, DECONINCK E, COLOMBAT P, DESABLENS B, TOURNILHAC O, EGHBALI H, FOUSSARD C, JAUBERT J, VILQUE JP, ROSSI JF, LUCAS V, DELWAIL V, THYSS A, MALOISEL F, MILPIED N, LE GOUILL S, LAMY T, GRESSIN R. Upfront VIP-reinforced ABVD (VIP-rABVD) is not superior to CHOP/21 in newly diagnosed peripheral T-cell lymphoma. Results of randomized phase III trial GOELAMS-LTP95. *Br J Haematol*. 2010; 141(2): 159-66.

SHIMOYAMA M, MINATO K. Clinical, cytological and immunological analysis of T-cell type lymphoid malignancies: a classification of T-cell type lymphoid malignancy (author's transl). *Rinsho Ketsueki*. 1979; 20(9): 1056-69.

SHIPP MA. Prognostic factors in aggressive non Hodgkin lymphoma : who has "high risk" disease?. *Blood*. 1994; 83(5): 1165-73.

SIBON D, FOURNIER M, BRIÈRE J, LAMANT L, HAIOUN C, COIFFIER B, BOLOGNA S, MOREL P, GABARRE J, HERMINE O, SONET A, GISSELBRECHT C, DELSOL G, GAULLARD P, TILLY H. Long-term outcome of adults with systemic anaplastic large-cell lymphoma treated within the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adult trials. *J Clin Oncol*. 2012; 30(32): 3939-46.

SKARBNIK AP, BURKI M, PRO B. Peripheral T-cell lymphomas: a review of current approaches and hopes for the future. *Front Oncol*. 2013; 3 (138): 1-9.

SLUPIANEK A, SKORSKI T. NPM/ALK downregulates p27kip1 in a PI-3K-dependent manner. *Exp Hematol*. 2004; 32(12): 1265-71.

SMITH SD, BOLWELL BJ, RYBICKI LA, BROWN S, DEAN R, KALAYCIO M, SOBECKS R, ANDRESEN S, HSI ED, POHLMAN B, SWEETEHAM JW. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in peripheral T-cell lymphoma using a uniform high dose regimen. *Bone Marrow Transplant*. 2007; 40(3): 239-43.

SCHLEGELBERGER B, ZWINGERS T, HOHENADEI K, HENNE-BRUNS D, SCHMITZ N, HAFERLACH T, TIRIER C, BARTELS H, SONNEN R, KUSE R. Significance of cytogenetic findings for the clinical outcome in patients with T-cell lymphoma of angioimmunoblastic lymphadenopathy type. *J Cl Oncol*. 1996; 14(2): 593-9.

SONG KW, MOLLEE P, KEATING A, CRUMP M. Autologous stem cell transplant for relapsed and refractory peripheral T-cell lymphoma: variable outcome according to pathological subtype. *Br J Haematol*. 2003; 20(6): 978-85.

SONNEN R, SCHMIDT WP, MÜLLER-HEMERLINK HK, SCHMITZ N. The International Prognostic Index determines the outcome of patients with nodal mature T-cell lymphomas. *Br J Haematol*. 2005; 129(3): 366-72.

STACCHINI A, DEMURTAS A, ALIBERTI S, FRANCA DI CELLE P, GODIO L, PALESTRO G, NOVERO D. The usefulness of flow cytometric CD10 detection in the differential diagnosis of peripheral T-cell lymphomas. *Am J Clin Pathol*. 2007; 128(5): 854-64.

STEIN H, FOSS HD, DÜRKOP H, MARAFIOTI T, DELSOL G, PULFORD K, PILERI S, FALINI B. CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic and clinical features. *Blood*. 2000; 96(12): 3681-95.

STEIN RS, GREER JP, FLEXNER JM, HAINSWORTH JD, COLLINS RD, MACON WR, COUSAR JB. Large-cell lymphomas: clinical and prognostic features. *J Clin Oncol*. 1990; 8(8): 1370-9.

STREUBEL B, VINATZER U, WILLHEIM M, RADERER M, CHOTT A. Novel t(5;9) (q33;q22) fuses ITK to SYK in unspecified peripheral T-cell lymphoma. *Leukemia*. 2006; 20(2): 313-8.

SUGAYA M, NAKAMURA K, ASAHINA A, TAMAKI K. Leukocytoclastic vasculitis with IgA deposits in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *J Dermatol*. 2001; 28(1): 32-7.

SUZUKY R, KAGAMI Y, TAKEUCHI K, KAMI M, OKAMOTO M, ISHINOHASAMA R, MORI N, KOJIMA M, YOSHINO T, YAMABE H, SHIOTA M, MORI S, OGURA M, HAMAJIMA M, SETO M, SUCHI T, MORISHIMA M, NAKAMURA S. Prognostic significance of CD56 expression for ALK-positive and ALK-negative anaplastic large-cell lymphoma of T/null cell phenotype. *Blood*. 2000; 96(9): 2993-3000.

SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, JAFFE ES, PILERI SA, STEIN H, THIELE J, VARDIMAN JW. WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press: Lyon. 2008.

TABERNERO J. The role of VEGF and EGFR inhibition: implications for combining anti-VEGF and anti EGFR agents. *Mol Cancer Res*. 2007; 5(3): 203-20.

TANG T, TAY K, QUEK R, TAO M, TAN SY, TAN L, LIM ST. Peripheral T-cell lymphoma: review and updates of current management strategies. *Adv Hematol*. 2010; 62(40): 370-8.

TEN BERGE RL, DE BRUIN PC, OUDEJANS JJ, OSSENKIPPELE GJ, VAN DER VALK P, MEIJER CG. ALK-negative anaplastic large cell lymphoma demonstrates similar poor prognosis to peripheral T-cell lymphoma unspecified. *Histopathology*. 2003; 43(5): 462-9.

TEN BERGE RL, OUDEJANS JJ, OSSENKOPPELE GJ, PULFORD K, WILLEMZE R, FALINI B, CHOTT A, MEIJER CJ. ALK expression in extranodal anaplastic large cell lymphoma favors systemic disease with (primary) nodal involvement and a good prognosis and occurs before dissemination. *J Clin Pathol*. 2000; 53(6): 445-50.

THOMPSON MA, STUMPH J, HENRICKSON SE, ROSENWALD A, WANG Q, OLSON S, BRANDT SJ, ROBERTS J, ZHANG X, SHYR Y, KINNEY MC. Differential gene expression in anaplastic lymphoma kinase-positive and anaplastic lymphoma kinase-negative anaplastic large cell lymphomas. *Hum Pathol*. 2005; 36(5): 494-504.

THORNS C, BASTIAN B, PINKEL D, ROYDASGUPTA R, FRIDLYAND J, MERZ H, KROKOWSKI M, BERND HW, FELLER AC. Chromosomal aberrations in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma unspecified: a matrix based CGH approach. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007; 46(1): 37-44.

TILLY H, LEPAGE E, COIFFIER B, BLANC M, HERBRECHT R, BOSLY A, ATTAL M, FILLET G, GUETTIER C, MOLINA TJ, GISSELBRECHT C, REYES F. Intensive conventional chemotherapy (ACVBP regimen) compared with standard CHOP for poor-prognosis aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2003; 102(13): 4284-9.

TOBINAI K, MINATO K, OHTSU T, MUKAI K, KAGAMI Y, MIWA M, WATANABE S, SHIMOYAMA M. Clinicopathologic, immunophenotypic, and immunogenotypic analysis of immunoblastic lymphadenopathy-like T-cell lymphoma. *Blood*. 1988; 72(3): 1000-6.

TONE LG, LEMOS JA, DEFAVERY R, SCRIDEI CA. Analysis of p16 gene mutations and deletions in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Sao Paulo Med J*. 2003; 121(2): 58-62.

TROXELL ML, SCHWARTZ EJ, VAN DE RIJN M, ROSS DT, WARNKE RA, HIGGINS JP, NATKUNAN Y. Follicular dendritic cell immunohistochemical markers in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2005; 13(4): 297-303.

TSATALAS C, MARGARITIS D, KALOUTSI V, MARTINIS G, KOTSIANIDIS I, BOUKIRAS G. Successful treatment of angioimmunoblastic lymphadenopathy with

dysproteinemia-type T-cell lymphoma with fludarabine. *Acta Haematol.* 2001; 105(2): 106-8.

TSUKAMOTO N, KOJIMA M, HASEGAWA M, ORIUCHI N, MATSUMISHA T, YOKOHAMA A, SAITOH T, HANDA H, ENDO K, MURAMAKI H. The usefulness of (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography ((18)F-FDG-PET) and a comparison of (18)F-FDG-pet with (67) gallium scintigraphy in the evaluation of lymphoma: relation with histologic subtypes based on World Health Organization classification. *Cancer.* 2007; 110(3): 652-9.

TZOCHATZIS E, VASSILOPOULOS D, DEUTSCH M, FILIOTOU A, TASIDOU A, ARCHIMANDRITIS AJ. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma-associated arthritis: case report and literature review. *J Clin Rheumatol.* 2005; 11(6): 326-8.

VASSALO J, LAMANT L, BRUGIÈRES L, GAILLARD F, CAMPO E, BROUSSET P, DELSOL G. ALK-positive anaplastic large cell lymphoma mimicking nodular sclerosis Hodgkin's lymphoma: report of 10 cases. *Am J Surg Pathol.* 2006; 30(2): 223-9.

VOENA C, CONTE C, AMBROGIO C, BOERI ERBA E, BOCCALATTE F, MOHAMMED S, JENSEN ON, PALESTRO G, INGHIRAMI G, CHIARLE R. The tyrosine phosphatase Shp2 interacts with NPM-ALK and regulates anaplastic lymphoma cell growth and migration. *Cancer Res.* 2007; 67(9): 4278-86.

VOSE J, ARMITAGE J, WEISENBURGER D. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes. *J Clin Oncol.* 2008; 26(25): 4124-30.

VOSE JM. Peripheral T-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2008; 22(5): 997-1005.

WARNKE RA, JONES D, HSI ED. Morphologic and immunophenotypic variants of nodal T-cell lymphomas and T-cell lymphoma mimics. *Am J Clin Pathol.* 2007; 127(4): 511-27.

WATANABE T, KINOSHITA T, ITOH K, YOSHIMURA K, OGURA M, KAGAMI Y, YAMAGUCHI M, KUROSAWA M, TSUKASAKI K, KASAI M, TOBINAI K, KABA H, MUKAI K, NAKAMURA S, OHSHIMA K, HOTTA T, SHIMOYAMA M. Pretreatment total serum protein is a significant prognostic factor for the outcome of patients with peripheral T/ natural killer-cell lymphomas. *Leuk Lymphoma.* 2010; 51(5): 813-21.

WEISS LM, STRICKLER JG, DORFMAN RF, HORNING SJ, WARNKLE RA, SKLAR J. Clonal T-cell populations in angioimmunoblastic lymphadenopathy and angioimmunoblastic lymphadenopathy-like lymphoma. *Am J Pathol.* 1986; 122(3): 392-7.

WENT P, AGOSTINELLI C, GALLAMINI A, PICCALUGA PP, ASCANI S, SABATINNI E, BACCI F, FALINI B, MOTTA T, PAULLI M, ARTUSI T, PICCIOLI M, ZINZANI PL, PILERI SA. Marker expression in peripheral T-cell lymphoma: a proposed clinical-pathologic prognostic score. *J Clin Oncol.* 2006; 24(16): 2472-9.

WILCOX RA, SUN DX, NOVAK A, DOGAN A, ANSELL SM, FELDMAN AL. Inhibition of Syk protein tyrosine kinase induces apoptosis and blocks proliferation in T-cell non-Hodgkin's lymphoma cell lines. *Leukemia.* 2010; 24(1): 229-32.

WILLEMZE R, JAFFE ES, BURG G, CERRONI L, BERTI E, SWERDLOW SH, RALFKIAER E, CHIMENTI S, DIAZ-PEREZ JL, DUNCAN LM, GRANGE F, HARRIS NL, KEMPFT W, KERL H, KURRER M, KNOBLER R, PIMPINELLI N, SANDER C, SANTUCCI M, STERRY W, VERMEER MH, WESCHLER J, WHITTAKER S, MEIJER CJ. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphoma. *J Clin Oncol.* 2005; 105(10): 3768-85.

WILLENBROCK K, BRÄUNINGER A, HANSMANN ML. Frequent occurrence of B-cell lymphomas in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and proliferation of Epstein-Barr virus-infected cells in early cases. *Br J Haematol.* 2007; 138(6): 733-9.

WILLENBROCK K, RENNÉ C, GAULARD P, HANSMANN ML. In angioimmunoblastic T-cell lymphoma, neoplastic T cells may be a minor cell population. A molecular single cell and immunohistochemical study. *Virchows Arch.* 2005; 446(1): 15-20.

WILLENBROCK K, ROERS A, SEIDL C, WACKER HH, KÜPPERS R, HANSMANN ML. Analysis of T-cell subpopulation in T-cell non Hodgkin's lymphoma of angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteinemia type by single target gene amplification of T-cell receptor-beta gene rearrangements. *Am J Pathol.* 2001; 158(5): 1851-7.

XAVIER FD, LEVY D, PEREIRA J. Time-to-treatment of diffuse large B-cell lymphoma in São Paulo. *Clinics.* 2013; 69(5): 367-71.

XERRI L, CHETAILE B, SERRIARI N, ATTIAS C, GUILLAUME Y, ARNOULET C, OLIVE D. Programmed death-1 is a marker of angioimmunoblastic T-cell lymphoma and B-cell small lymphocytic lymphoma/ chronic lymphocytic leukemia. *Hum Pathol.* 2008; 39(7): 1050-8.

YOU JY, CHI KH, YANG MH, CHEN CC, HO CH, CHAU WK, HSU HC, GAU JP, TZENG CH, LIU JH, CHEN PM, CHIOU TJ. Radiation therapy versus chemotherapy as initial treatment for localized nasal natural killer(NK)/T-cell lymphoma: a single institute survey in Taiwan. *Ann Oncol*. 2004; 15(4): 618-25.

YUAN CM, VERGILIO JA, ZHAO XF, SMITH TK, HARRIS NL, BAGG A. CD10 and BCL6 expression in the diagnosis of angioimmunoblastic T-cell lymphoma: utility of detection CD10+ T cells by flow cytometry. *Hum Pathol*. 2005; 36(7): 784-91.

ZAMO A, CHIARLE R, PIVA R, HOWES J, FAN Y, CHILOSI M, LEVY DE, INGHIRAMI G. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death. *Oncogene*. 2002; 21(7): 1038-47.

ZAMKOFF KW, MATULIS MD, MEHTA AC, BEATY MW, HUTCHINSON RE, GENTILE TC. High-dose therapy and autologous stem cell transplant does not result in long-term disease free survival in patients with recurrent chemotherapy-sensitive ALK-negative anaplastic large-cell lymphoma. *Bone Marrow Transplant*. 2004; 33(6): 635-8.

ZHAO WL, MOURAH S, MOUNIER N, LEOEUF C, DANESHPOUY ME, LEGRÈS L, MEIGNIN V, OKSENHENDLER E, MAIGNIN CL, CALVO F, BRIÈRE J, GISSELBRECHT C, JANIN A. Vascular endothelial growth factor-A is expressed both on lymphoma cells and endothelial cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and related to lymphoma progression. *Lab Invest*. 2004; 84(11): 1512-9.

ZETTI A, RÜDIGER T, KONRAD MA, CHOTT A, SIMONITSCH-KLUPP I, SONNEN R, MÜLLER-HERMERLINK HK, OTT G. Genomic profiling of peripheral T-cell lymphoma unspecified, and anaplastic large T-cell lymphoma delineates novel recurrent chromosomal alterations. *Am J Pathol*. 2004; 164: 1837-48.

ZETTL A, LEE SS, RÜDIGER T, STAROSTIK P, MARINO M, KIRCHNER T, OTT M, MÜLLER-HERMERLINK HK, OTT G. Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorders in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma unspecified. *Am J Clin Pathol*. 2002; 117(3): 368-79.

ZHAO WL, LIU YY, PLASSA F, JIN XL, WANG L, JANIN A, SHEN ZX. Analysis of overexpression of vascular endothelial growth factor in patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhin*. 2007; 28(10): 664-6.

ZINZANI PL, STEFONI V, TANI M, FANTI S, MUSUCARA G, CASTELLUCCI P, MARCHI P, FINA M, AMBROSINE V, PELLEGRINI C, ALINARI L, DERENZINI E, MONTINI G, BROCCOLI A, BACCI F, PILERI S, BACCARANI M. Role of

[18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography scan in the follow up of lymphoma. *J Clin Oncol*. 2009; 27(11): 1781-7.

ZINZANI PL, PILERI S, BENDANDI M, BUZZI M, SABATTINI E, ASCANI S, GHERLINZONE F, MAGAGNOLI M, ALBERTINI P, TURA S. Clinical implications of serum levels of soluble CD30 in 70 adult anaplastic large-cell lymphoma patients. *J Clin Oncol*. 1998; 16(4): 1532-7.