**Diego Gomes Candido Reis**

# Análise do perfil de expressão dos genes MYC, BCL2, LMO2, MGMT, POU2F1, PDCD1 e BCL6 e suas respectivas proteínas em linfoma primário de sistema nervoso central

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

Programa de Ciências Médicas
Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia
Orientadora: Profª. Drª Juliana Pereira

**São Paulo**
**2019**

Diego Gomes Candido Reis

# Análise do perfil de expressão dos genes MYC, BCL2, LMO2, MGMT, POU2F1, PDCD1 e BCL6 e suas respectivas proteínas em linfoma primário de sistema nervoso central

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

Programa de Ciências Médicas
Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia
Orientadora: Profª. Drª Juliana Pereira

São Paulo
2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Reis, Diego Gomes Candido
Análise do perfil de expressão dos genes MYC, BCL2, LMO2, MGMT, OCT1, PD1 e BCL6 e suas respectivas proteínas em linfoma primário de sistema nervoso central / Diego Gomes Candido Reis. -- São Paulo, 2019.
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.

Descritores: 1.Linfoma não Hodgkin 2.Neoplasias encefálicas 3.Expressão gênica 4.Biomarcadores 5.Estudos retrospectivos 6.Estudos de coortes 7.Imuno-histoquímica 8.Análise de sobrevida

USP/FM/DBD-113/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## DEDICATÓRIA

Aos amores (vividos, passados, presentes e futuros)

Aos meus pacientes,

Às amizades,

Aos meus avós,

Aos meus pais, Sérgio Eduardo e Maura Gomes, pelo árduo trabalho de educar, ensinar, amar e compreender aquilo que fui, sou e serei.

A Sander Palte, *liefde van mijn leven*.

## AGRADECIMENTOS

Sou imensamente grato por ter tido a professora Juliana Pereira como minha orientadora! O conhecimento que eu adquiri com ela vai muito além desta tese: seu profissionalismo, competência, ética, leveza e confiança foram fundamentais para conduzirmos este projeto em harmonia, de forma agradável e com grande troca de conhecimento. Uma pessoa forte, determinada e extremamente construtiva, ciente de sua função social como professora, educadora, médica e cidadã!

Nosso país, nossas universidades precisam de jovens cientistas críticos, contestadores e motivados! Dentre tantos que conheci, a Dra Débora Levy se destaca de maneira excepcional, tornando-se um exemplo para mim, reafirmando a importância de um trabalho em equipe, alinhado e íntegro. Sorte imensa tê-la tido como coorientadora, e sorte maior ainda tê-la agora como amiga!

Dr Hebert Culler foi fundamental neste projeto. Sua precisão em técnicas moleculares, seu olhar crítico e sua perspectiva do projeto muito me ajudaram. Muito obrigado, Hebert!

Graças ao LIM-31 (Laboratório de Genética e Hematologia Molecular), coordenado pelo Prof. Sérgio Bydlowski, este projeto pôde ser concluído. Ele não apenas me proporcionou as condições técnicas para realizarmos a pesquisa, mas também me motivou pelas conversas com os colegas, pela visão da importância da universidade e suas pesquisas em prol da ciência, da busca de respostas.

Se eu já amava hematologia, oncologia e pesquisa translacional, hoje posso afirmar minha paixão pela patologia, adquirida pelo contato com a Profa Maria Cláudia Zerbini. Um dos maiores exemplos de dedicação à vida acadêmica que eu já conheci, de uma gentileza ímpar e uma educação ímpar. Seus olhos, através das análises histopatológicas, iluminaram em muito este projeto. O meu “muitíssimo obrigado”!

Um projeto de doutorado é um pouco como uma orquestra: tantos instrumentos utilizados, tanto material humano, cada qual no seu tempo, porem num ritmo comum. A Universidade de São Paulo foi minha orquestra neste período, e serviços como o Departamento de Anatomia Patologica, Laboratório de Imunohistoquímica (Ângela Batista Gomes dos Santos), Blocário do HC-FMUSP, ICESP, CAPPesq, Arquivo Médico, Departamento de Hematologia, entre tantos outros, muito me ajudaram. Mais ainda: me fizeram perceber a grandeza da instituição, o compromisso de cada serviço, departamento, recursos humanos na pesquisa, na extensão acadêmica! Ter estudado aqui foi um privilégio!

Aos meus colegas da Hematologia e ao corpo de enfermagem que, de alguma forma, contribuíram com esse projeto e cuidaram dos pacientes que estudamos. Lendo os prontuários, os relatórios, tive a certeza da qualidade do atendimento que estes pacientes receberam dos profissionais de saúde, o que apenas aumentou minha admiração.

Aos pacientes e seus familiares, sem os quais essa pesquisa não seria possível. Vocês são nossa principal motivação para qualquer pesquisa médica, para os plantões extenuantes, ambulatórios lotados e todas dificuldades que encontramos nas nossas profissões.

É preciso agradecer aos meus colegas da UFRJ, da UFPR, da UNIFESP, do INCa, e de tantos outros centros acadêmicos pelos quais passei. Ambientes repletos de mentes brilhantes, que são contagiantes. Levo todos no coração e no cérebro!

Aos colegas que conheci na Bayer- em especial à Dra Paula Tanaka, uma amiga vibrante, enérgica, focada. Além disto tudo, ela me apresentou a Dra Juliana Pereira onde a história começou... Espero tê-la honrado pela confiança em mim depositada!

Tantas pessoas, lugares, professores, escolas, músicas, livros passaram em minha vida para que eu chegasse até aqui, me ajudando a tornar aquilo que sou. De tudo fica um pouco- como diria o poeta Carlos Drummond... E, a este pouco (que é o meu tudo), eu finalizo meu agradecimento, o meu muito obrigado. De toda minh´alma!

“Amar o perdido,
deixa confundido
este coração

Nada pode o olvido
contra o sentido
apelo do Não

As coisas tangíveis
tornam-se insensíveis
à palma da mão

Mas as coisas findas,
muito mais que lindas,
estas sim ficarão”

**Carlos Drummond de Andrade**

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

**SUMÁRIO**

**LISTA DE SÍMBOLOS**

**LISTA DE SIGLAS**

**LISTA DE FIGURAS**

**LISTA DE GRÁFICOS**

**LISTA DE QUADROS**

**LISTA DE TABELAS**

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**1 INTRODUÇÃO ..... 1**

**2 REVISÃO DE LITERATURA ..... 5**
**2.1 Epidemiologia ..... 5**
**2.2 Diagnóstico ..... 6**
*2.2.1 Biópsia/Líquor ..... 6*
*2.2.2 Imagem ..... 8*
**2.3 Prognóstico ..... 11**
*2.3.1 Fatores clínicos de prognóstico ..... 11*
*2.3.2 Fatores histopatológicos de prognóstico ..... 13*
**2.4 Tratamento ..... 16**
*2.4.1 Radioterapia ..... 17*
*2.4.2 Monoterapia ou Poliquimioterapia baseado em MTX ..... 18*
*2.4.3 Imunoterapia e Imunoquimioterapia com Rituximabe ..... 19*
*2.4.4 Quimioterapia intraventricular ..... 20*
*2.4.5 Terapia de manutenção com agente quimioterápico ..... 21*
*2.4.6 Transplante de Medula Óssea Autólogo (ASCT) ..... 21*
*2.4.7 Tratamento de resgate ..... 22*
*2.4.8 Estudos de Pesquisa Clínica Fase 1/2 em pacientes com LPSNC recidivadas ..... 22*
**2.5 Fisiopatologia molecular do LPSNC ..... 27**
*2.5.1 Genes selecionados para o estudo ..... 30*
**2.6 Justificativa ..... 37**

**3 OBJETIVOS ..... 39**
**3.1 Objetivo primário ..... 39**
**3.2 Objetivos secundários ..... 39**

**4 CASUÍSTICAS E METODOS ..... 40**
**4.1 Pacientes selecionados ..... 41**
*4.1.1 Critérios de inclusão ..... 41*
*4.1.2 Critérios de exclusão ..... 42*
**4.2 Diagnóstico anatomopatológico ..... 43**
**4.3 Estadiamento ..... 44**

**4.4 Tratamento** ..... **44**
**4.5 Avaliação de resposta** ..... **45**
**4.6 Seguimento dos pacientes** ..... **45**
**4.7 Reações de IHQ** ..... **46**
*4.7.1 Obtenção das amostras* ..... *46*
*4.7.2 Técnica da reação de IHQ* ..... *47*
**4.8 Método molecular** ..... **49**
*4.8.1 Obtenção das amostras* ..... *49*
*4.8.2 Extração de RNA de amostras fixadas em formol e incluídas em parafina* ..... *49*
*4.8.3 Preparação do cDNA* ..... *50*
*4.8.4 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real* ..... *51*
*4.8.5 Eficiência gênica avaliada* ..... *52*
**4.9 Análise estatística** ..... **52**

**5 RESULTADOS** ..... **56**
**5.1 Casuística** ..... **56**
**5.2 Características clínico-laboratoriais ao diagnóstico** ..... **57**
**5.3 Tratamentos oncológicos e resposta clínica** ..... **59**
*5.3.1 Primeira Linha de Tratamento Oncológico com Intuito Curativo* ..... *61*
*5.3.2 Segunda Linha de Tratamento Oncológico com Intuito Curativo* ..... *62*
**5.4 Expressão Proteica** ..... **63**
**5.5 Expressão Gênica** ..... **65**
**5.6 Construção de Curvas de ROC *(receiver operator characteristic curve*, em inglês)** ..... **67**
*5.6.1 Curvas de ROC para expressão proteica* ..... *67*
*5.6.2 Curvas de ROC para expressão gênica normatizada* ..... *68*
**5.7 Curvas de Sobrevida** ..... **69**
*5.7.1 Sobrevida Global* ..... *69*
*5.7.2 Sobrevida Livre de Doença (1ª linha de tratamento)* ..... *71*
*5.7.3 Sobrevida Livre de Progressão (1ª linha de tratamento)* ..... *72*
**5.8 Fatores de Prognóstico para SG, SG 2 anos, SLD e SLP** ..... **73**
*5.8.1 Análise Univariada para SG e SG em 24 meses* ..... *73*
*5.8.2 Análise Univariada para SLD* ..... *76*
*5.8.3 Análise Univariada para SLP* ..... *77*
*5.8.4 Testes de Log-Rank: gráficos por variáveis analisadas* ..... *79*
**5.9 Fatores de Prognóstico para Mortalidade até a data de censura e Mortalidade em 2 anos após o diagnóstico** ..... **86**
*5.9.1 Análise Univariada* ..... *86*
**5.10 Fatores de Prognóstico para Risco de Recaída e Refratariedade na primeira linha de tratamento** ..... **88**
*5.10.1 Análise Univariada* ..... *88*
**5.11 Correlação entre expressão gênica e expressão proteica** ..... **90**

**6 DISCUSSÃO** ..... **92**

**7 CONCLUSÕES** ..... **105**

**8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS ..... 106**

**9 ANEXOS ..... 107**
**ANEXO A -** Características clínico-laboratoriais por paciente ..... **108**
**ANEXO B -** Informações sobre a primeira linha de tratamento oncológico ..... **114**
**ANEXO C -** Valores da expressão normatizada dos genes MYC, BCL2, POU2F1, MGMT, LMO2 e PDCD1 por paciente ..... **115**
**ANEXO D -** Comparação entre amostra total e a subamostra..... **117**
**ANEXO E -** Curvas de ROC para expressão da proteína MYC ..... **123**
**ANEXO F -** Curva de ROC para expressão da proteína BCL2 ..... **127**
**ANEXO G -** Curva de ROC para expressão da proteína LMO2..... **131**
**ANEXO H -** Curvas de ROC para a expressão normatizada do gene MYC ..... **132**
**ANEXO I -** Curvas de ROC para a expressão normatizada do gene MGMT ..... **134**
**ANEXO J -** Curvas de ROC para a expressão normatizada do gene PDCD1 ..... **136**
**ANEXO K -** Curvas de ROC para a expressão normatizada do gene BCL2 ..... **137**
**ANEXO L -** Curvas de ROC para a expressão normatizada do gene LMO2..... **140**
**ANEXO M -** Curvas de ROC para a expressão normatizada do gene POU2F1 ..... **142**
**ANEXO N -** Curvas de ROC para a expressão normatizada do gene BCL6 ..... **144**
**ANEXO O -** Construção das curvas de SG, SLP e SLD (método de Kaplan-Meier)..... **146**
**ANEXO P -** Expressão dos genes de interesse em relação à sua respectiva expressão proteica..... **147**

**10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 149**

**LISTA DE SÍMBOLOS**

αβ .....Alfa/beta
γδ .....Gama/delta
cm .....Centímetro
dL .....Decilitro
g .....Grama
ºC .....Graus Celsius
xg .....Gravidade
Gy.....Gray
K.....Kappa
λ .....Lambda
L .....Litro
≥ .....Maior ou igual a
> .....Maior que
+/- .....Mais ou menos
+ .....Mais ou positivo
≤ .....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
™.....*Trademark* ou marca registrada
log .....Unidade de escala logarítmica
U.....Unidades
x .....Vezes

## LISTA DE SIGLAS

| SIGLA | ABREVIACAO |
|---|---|
| 1ºq | Primeiro quartil |
| 3ºq | Terceiro quartil |
| A20 | *Tumor Necrosis Factor, Alpha-Induced Protein 3 (em inglês)* |
| ABC | *Activated B-Cell Like (em inglês)* |
| Ac | Anticorpos |
| AKT | Proteína Quinase B |
| ALK | Quinase do Linfoma Anaplásico |
| ARP | *Actin-related protein (em inglês)* |
| ASCT | Transplate Autólogo de Células Tronco |
| AUC | Área sob a Curva |
| BCAP | *B cell adaptor for PI3k (em inglês)* |
| BCL6 – | *B-cell CLL/Lymphoma 6 (em inglês)* |
| BCL2 | *B-cell Lymphoma 2 (em inglês)* |
| BCNU | Carmustina |
| BCR | Receptor de Células B |
| BHE | Barreira Hematoencefálica |
| BIM | *BCL-2 interacting mediator of cell death (em inglês)* |
| BTK | *Bruton's Tyrosine Kinase (em inglês)* |
| CAAE | Certificado de Apresentação para Apreciação Ética |
| CAPPesq | Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa |
| CAR-T | *Chimeric Artificial T-cell Receptor (em inglês)* |
| CARD11 | *Caspase Recruitment Domain Family Member 11 (em inglês)* |
| CD | *Cluster of differentiation (em inglês)* |
| CD10 | *Common acute lymphocytic leukemia agent (em inglês)* |
| CD20 | Antígeno de Linfócito B CD20 |
| CDC2 ou CDK1 | Quinase dependente de ciclina 1 |
| cDNA | Ácido desoxirribonucleico complementar |
| CG | Centro germinativo |
| CN | *Calcineurin (em inglês)* |
| CNS | *Central Nervous System (em inglês)* |
| COO | Célula de Origem |
| Ct | *Cycle threshold* ou ciclo limiar |

| | |
|---|---|
| CXCL13 | *B lymphocyte chemoattractant (em inglês)* |
| DAG | diacilglicerol |
| D11 | Décimo Primeiro Dia |
| D7 | Sétimo Dia |
| DE | Doença Estável |
| Del | Deleção |
| *DFS* | *Disease-free survival (em inglês)* |
| DHL | Desidrogenase Lática |
| dNTP | Desoxirribonucleotídeos Fosfatados |
| Dp | Desvio Padrão |
| EBV | *Epstein Barr Virus* (em inglês) |
| ECOG | *Eastern Cooperative Oncology Group (status performance) (em inglês)* |
| EV | Via Endovenosa |
| FDG | Fluorodeoxiglicose |
| FFPE | Fixado em Formalina e Incluído em Parafina |
| FLAIR | *Fluid Attenuated Inversion Recovery (em inglês)* |
| G | Gravidade |
| GADPH | *Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (em inglês)* |
| GCB | célula de origem centro germinativo |
| | Receptor 2 do fator de Crescimento Derivado de Proteínas |
| GSK | *Glycogen synthase kinase (em inglês)* |
| GUSB | Glucoronidase Beta |
| Gy | Gray |
| H&E | Hematoxilina & Eosina |
| HC-FMUSP | Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo |
| HD | Alta dose |
| HD-MTX | Metotrexate em Altas Doses |
| HGAL | *Germinal Center Specific Gene (em inglês)* |
| HIC | Hipertensão Intracraniana |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Adquirida Humana |
| HR | *Hazard Ratio (em inglês)* |
| IC | Intervalo de Confiança |
| ICESP | Instituto do Câncer do Estado de São Paulo |
| Ig | Imunoglobulina |
| IgG4 | Imunoglobulina G |
| IGH | Cadeia Pesada da Imunoglobulina |
| IHQ | Imuno-histoquímica |
| IKB | *Inhibitor of kB (em inglês)* |

| | |
|---|---|
| IKK | *Inhibitor of NF-kB kinase (em inglês)* |
| IL | Interleucina |
| IPI | Índice Prognóstico Internacional |
| IP3 | Inositol trifosfato |
| IP3R | Receptor de IP3 |
| IRAK | Receptor Associado à Kinase IL1 |
| ITAM | Imunorreceptor do Motivo Ativador Baseado em Tirosina |
| IV | Intraventricular |
| JAK/STAT | *Tirosina Kinase Janu/signal Transducer and Activator of Transcription (em inglês)* |
| Ki67 | Proteína Ki67 |
| KPS | *Karnofsky Performance Status (em inglês)* |
| LCR | Líquor Cefalorraquidiano |
| LDGCB | Linfoma Difuso de Grandes Células B |
| LF | Linfoma Folicular |
| LIM | Laboratório de Investigação Médica |
| LLA | Leucemia Linfocítica Aguda |
| LMO2 | LIM Domínio Único 2 |
| LNH | Linfoma não Hodgkin |
| LPSNC | Linfoma Primário de Sistema Nervoso Central |
| MALT1 | *Mucosa-associated lymphoid tissue (em inglês)* |
| Max | Máximo |
| MBVP | Methotrexate, VP16, BCNU, Prednisone |
| MEK1/2 | Proteína Quinase Ativada por Mitogeno/Quinase Reguladora do Sinal Extracelular |
| MGMT | *O-6-methilguanine-DNA-methyltransferase (em inglês)* |
| Min | Mínimo |
| miR | microRNA |
| MRI | *Magnetic Resonance Imaging (em inglês)* |
| mTOR | *Mammalian Target of Rapamycin (em inglês)* |
| MTX | Metotrexate |
| MUM1 | *Multiple Myeloma oncogene 1 /* Oncogene Mieloma Múltiplo 1*(em inglês)* |
| MYC | Fator de Transcrição bHNH |
| MYD88 | *Myeloid Differentiation Primary Response 88 (em inglês)* |
| N | Número |
| NA | Não Avaliável |
| NCG | Não Centro Germinativo |
| NFkB | Fator Nuclear kappa B |
| NK | *Natural Killer (em inglês)* |
| NPD | Ausência de Progressão de Doença documentada |

| | |
|---|---|
| núm | Número |
| POU2F1 | *POU Class 2 Homeobox 1 (em inglês)* |
| OMS | OMS – Organização Mundial de Saúde |
| OR | *Odd Ratio (em inglês)* |
| OS | *Overall survival (em inglês)* |
| p21 | *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1 (em inglês)* |
| p53 | Proteína tumoral p53 |
| Pac | Paciente |
| PCR | Reação em Cadeia de Polimerase |
| PD | Progressão de Doença |
| PDK1 | *3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1* |
| PD-L1 | *Programmed Cell Death Ligand 1 (em inglês)* |
| PD-L2 | *Programmed Cell Death Ligand 2 (em inglês)* |
| PDCD1 | *Programmed Cell Death 1 (em inglês)* |
| PEG | Perfil de Expressão Gênica |
| PET | Tomografia por Emissão de Pósitrons |
| PET-TC | Tomografia Computadorizada com Emissão de Pósitrons |
| PFS | *Progression-free survival (em inglês)* |
| pH | Potencial de Ânion Hidrogênio |
| PI3k | *Phosphatidylionusitol-4,5-Biphosphate 3-Kinase (em inglês)* |
| PIC | Pressão Intracranina |
| PIM | Proto-Oncogene Serina/Treonina Proteína Kinase |
| PKC | Proteína Kinase C |
| POZ | *Poxvirus and Zinc Finger Domain (em inglês)* |
| PRDM1 | *PR Domain-Containing Protein 11 (em inglês)* |
| PS | *Performance Status (em inglês)* |
| PTPRK | *Receptor-type Tyrosine-Protein Phosphatase kappa (em inglês)* |
| R/R | Recaída/Refratário |
| RASGRP3 | *RAS guanyl-relaseing protein 3 (em inglês)* |
| RC | Resposta Completa ou Remissão Completa |
| RGS | *Regulator of G-Protein Signaling (em inglês)* |
| RT | Radioterapia |
| RG | Resposta Global |
| RL | Regressão Logística |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| RNA | Ácido Ribonucleico |
| ROC | Característica de Operação do Receptor |
| RP | Resposta Parcial |
| RPLPO | *Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0 (em inglês)* |

| | |
|---|---|
| RT-qPCR | Reação em Cadeia da Polimerase da Transcrição Reversa em Tempo Real quantitativo |
| RV- | Razão de verossimilhança negativa |
| RV+ | Razão de verossimilhança positiva |
| SD | Doença Estável |
| SG | Sobrevida Global |
| SLD | Sobrevida Livre de Doença |
| SLP | Sobrevida Livre de Progressão |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| STAT3 | Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3 |
| SYK | *Spleen tyrosine kinase (em inglês)* |
| TC | Tomografia Computadorizada |
| TEDDi-R | Temozolamida, Etoposídeo, Doxorubicina Lipossomal, Dexametasona, Ibrutinibe, Rituximabe |
| ThBuCTX | Thiotepa, Busulfan, e Ciclofosfamida -3 and -2 |
| TIL | *Tumour Infiltrating Lymphocyte (em inglês)* |
| TMO | Transplante de Medula Óssea |
| TNF | Fator de Necrose Tumoral |
| TR | Taxa de Resposta |
| TTO1 | Primeira Linha de Tratamento |
| TTO2 | Segunda Linha de Tratamento |
| VO | Via Oral |
| WBRT | Radioterapia de Todo o Crânio |
| XBP1 | *X-box binding protein 1( em inglês)* |
| $^{18}$F-FDG | $^{18}$F-fluorodeoxyglucose |

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1 -** Tipo de Célula de Origem conforme Critérios de Hans para IHQ. ..... 14
**Figura 2 -** Sinalização celular via BTK ..... 24
**Figura 3 -** Via do NFkB- ..... 28
**Figura 4 -** Fluxograma da exclusão ..... 56
**Figura 5 -** Número de linhas de tratamento oncológico ..... 60

## LISTA DE GRÁFICO

**Gráfico 1 -** Taxas de Resposta à Primeira Linha de Tratamento Oncológico ..... 62
**Gráfico 2 -** Curva de Sobrevida Global nos pacientes com LPSNC..... 70
**Gráfico 3 -** Curva de Sobrevida livre de doença nos pacientes com LPSNC ..... 71
**Gráfico 4 -** Curva de Sobrevida livre de progressão nos pacientes com LPSNC ..... 72
**Gráfico 5 -** Teste de Log-rank – Variável: Idade (> 60 anos vs ≤ 60 anos) ..... 79
**Gráfico 6 -** Teste de Log-rank – Variável: IPI modificado (2+3+4+5 vs 0+1) ..... 80
**Gráfico 7 -** Teste de Log-rank – Variável: Performance Status (3+4 vs 0+1+2) ..... 81
**Gráfico 8 -** Teste de Log-rank – Variável: Radioterapia (Não realizada vs Realizada) ..... 82
**Gráfico 9 -** Teste de Log-rank – Variável: Anti-BCL2 (51-100% vs 0-50%)..... 83
**Gráfico 10 -** Teste de Log-rank – Variável: anti-LMO2 (0-25% vs ≥26%)..... 83
**Gráfico 11 -** Teste de Log-rank – Variável: Gene *MYC* (≥0,201041 vs <0,201041) ..... 84
**Gráfico 12 -** Teste de Log-rank – Variável: Gene *LMO2* (<0,689232 vs ≥0,689232) ..... 85
**Gráfico 13 -** Teste de Log-rank – Variável: Gene *MGMT* (≥0,335666 vs <0,335666) ..... 85

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1 -** Avaliação de resposta clínica ..... 10
**Quadro 2 -** Estudos de fase 1 e fase 2 em andamento ..... 26
**Quadro 3 -** Padronização dos marcadores de IHQ utilizados ..... 48
**Quadro 4 -** Definições das Curvas de Sobrevida, Refratariedade e Recidiva ..... 54

## LISTA DE TABELAS


**Tabela 1 -** Sensibilidade e especificidade de biomarcadores CXCl13 e IL-10 (LCR) e aplicação diagnóstica de LPSNC ..... 8

**Tabela 2 -** Sobrevida Global (SG 2 anos) de acordo com o escore de prognóstico IPI modificado para LPSNC ..... 12

**Tabela 3 -** Orçamento detalhado..... 40

**Tabela 4 -** Eficiências gênicas avaliadas..... 52

**Tabela 5 -** Classificação Subjetiva por Kappa..... 55

**Tabela 6 -** Tempos de seguimento..... 57

**Tabela 7 -** Características clínico-laboratoriais dos pacientes selecionados ..... 58

**Tabela 8 -** Taxas de resposta global, parcial, completa e refratariedade à primeira linha de tratamento oncológico ..... 61

**Tabela 9 -** Taxas de resposta global, parcial, completa e refratariedade à segunda linha de tratamento oncológico..... 62

**Tabela 10 -** Descrição das revisões das reações de imuno-histoquímica disponíveis ..... 63

**Tabela 11 -** Resultados das reações de imuno-histoquímica das proteínas de interesse..... 64

**Tabela 12 -** Amplificação normatizada dos genes de interesse ..... 65

**Tabela 13 -** Revisão bibliográfica dos pontos de corte da reação de imuno-histoquímica das proteínas de interesse e pontos de corte selecionados neste estudo..... 68

**Tabela 14 -** Pontos de corte da expressão normatizada dos genes de interesse..... 69

**Tabela 15 -** Análise univariada de Cox para SG ..... 74

**Tabela 16 -** Análise univariada de Cox para SG em 2 anos..... 75

**Tabela 17 -** Análise univariada de Cox para SLD..... 76

**Tabela 18 -** Análise univariada de Cox para SLP..... 78

**Tabela 19 -** Análise univariada para Mortalidade Global e Mortalidade em 2 Anos ..... 87

**Tabela 20 -** Análise univariada para Refratariedade e Recaída..... 89

**Tabela 21 -** Correlação entre IHQ proteína MYC e expressão gênica *MYC* ..... 90

**Tabela 22 -** Correlação entre IHQ proteína BCL2 e expressão gênica *BCL2* ..... 91

**Tabela 23 -** Correlação entre IHQ proteína LMO2 e expressão gênica *LMO2* ..... 91

# RESUMO

Reis DGC. *Análise do perfil da expressão dos genes MYC, BCL2, LMO2, MGMT, POU2F1, PDCD1 e BCL6 e suas respectivas proteínas em linfoma primário de sistema nervoso central* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

**Introdução:** Linfoma primário de sistema nervoso central (LPSNC) é um linfoma não-Hodgkin (LNH) extranodal com origem no SNC e a ele restrito, incidência de 0,7/100.000 pessoas-ano e mediana de idade de 65 anos. Apresenta comportamento biológico agressivo, alta morbimortalidade, sobrevida global em 5 anos de 30% e pior prognóstico em relação ao linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) sistêmico. O tratamento consiste em quimioterapia de indução com altas doses de metotrexate, seguido de consolidação, porém com alta taxa de recorrência (50%) e refratariedade (30%). Estudos genéticos têm permitido melhor compreensão de sua patogênese, como a hiperativação da via do NFkB e da via da sinalização do BCR; o papel do microambiente tumoral, entre outros. Estudos preliminares com LPSNC e LDGCB indicam valor prognóstico favorável da hiperexpressão dos genes BCL6 e LMO2 e desfavoráveis nos casos de suprarregulação dos genes *BCL2, MYC, MGMT, POU2F1* e *PDCD1*. **Objetivo:** Avaliar o impacto da expressão dos genes *MYC, BCL2, LMO2, MGMT, POU2F1, PDCD1* e *BCL6* e suas respectivas proteínas em pacientes com LPSNC e suas correlações com os desfechos clínicos de sobrevida global (SG) e sobrevida livre de progressão (SLP). **Métodos:** Estudo de coorte retrospectiva, unicêntrico, não intervencionista. Pacientes imunocompetentes com LPSNC histopatologia LDGCB CD20+ foram incluídos, dados clínicos coletados e material histopatológico obtido. A expressão gênica foi analisada por RT-qPCR de amostras fixadas e emblocadas em parafina; seus valores foram normatizados pelo controle endógeno *GUSB* e transformados em variáveis categóricas para posterior correlação com variáveis clínicas e de desfecho. Devido ao pequeno tamanho amostral, apenas análises univariadas foram realizadas. Análise da expressão proteica dos genes selecionados também foi realizada. **Resultados:** Trinta e cinco pacientes foram incluídos; a expressão gênica foi avaliável em 21 pacientes (60%). A mediana de tempo de seguimento foi de 41 meses. As medianas de SG, SLD e SLP foram de 42,6 meses, 59,2 meses e 41 meses, respectivamente. Mediana de expressão dos genes *MYC, BCL2, LMO2, MGMT, POU2F1, PDCD1* e *BCL6* foram respectivamente 0,201; 0,564; 1,636; 0,000; 1,448; 0,000 e 2,716. Idade >60 anos, índice prognóstico International (IPI) modificado ≥2, performance status (PS) ≥3, expressão de *MYC* ≥0,201041, anti-BCL2 ≥51%, ausência de tratamento radioterápico, refratariedade ao tratamento e progressão de doença (PD) após a primeira linha de tratamento foram associados à pior SG (p ≤0,1). Idade >60 anos, IPI modificado ≥2, PS ≥3 e ausência de tratamento radioterápico estiveram associados à pior SLD (p ≤0,1). Idade >60 anos, IPI modificado ≥2, P.S. ≥3, ausência de tratamento com radioterapia, expressão de *MYC* ≥0,201041, anti-

BCL2 ≥51%, expressão gênica de *LMO2* <0,689232, expressão gênica de *MGMT* ≥0,335666, refratariedade à primeira linha de tratamento e PD após a primeira linha de tratamento estiveram associados à pior SLP (p ≤0,1). Expressão gênica de *MYC* ≥0,201041, expressão gênica de *PDCD1* ≥2,00938 estiveram associados a maior risco de recaída após a primeira linha de tratamento (p ≤0,1). Houve correlação moderada entre a expressão gênica do *MYC* (<0,201041 x ≥0,201041) e sua respectiva proteína (≤50% x ≥51%), (Kappa=0,596 e valor p=0,022) e entre a expressão gênica do *BCL2* (<0,3516 x ≥0,3516) e sua respectiva proteína (≤50% x ≥51%), (Kappa=0,426 e valor p=0,042). **Conclusão:** Em análise univariada, expressão de *MYC* ≥0,201041, anti-BCL2 ≥51%, expressão gênica de *LMO2* <0,689232, expressão gênica de *MGMT* ≥0,335666 e expressão gênica de *PDCD1* ≥2,00938 estiveram associados a prognósticos desfavoráveis.

**Descritores:** Linfoma não Hodgkin; Neoplasias Encefálicas; Expressão Gênica; Biomarcadores; Estudos Retrospectivos; Estudos de Coortes; Imuno-Histoquímica; Análise de Sobrevida.

**ABSTRACT**

Reis DGC. *Gene expression and protein profiles of MYC, BCL2, LMO2, MGMT, POU2F1, PDCD1, BCL6 in primary central nervous system lymphoma* [tese]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

**Introduction:** Primary central nervous system lymphoma (PCNSL) is a rare extranodal NHL restricted to the CNS, with annual incidence of 0.7 per 100,000 people and mean age at diagnosis of 65 years old. It has an aggressive biological behavior, with poor prognosis (overall survival at 5 years of 30%). Treatment consists of induction immunochemotherapy with high-dose methotrexate followed by consolidation regimen, with a high rate of relapsed and refractory disease (50% and 30%, respectively). Tumorigenesis has been associated with hyperactivation of NFkB pathway and BCR downstream pathway; tumoral microenvironment, among others. Recent studies suggest that hyperexpression of the genes *BCL6* and *LMO2* may be associated with better prognosis and hyperexpression of the genes *BCL2, MYC, MGMT, POU2F1* and *PDCD1* may be associated with worse prognosis in patients with PCNSL. **Objective:** To measure the normalized gene expression of *MYC, BCL2, LMO2, MGMT, POU2F1, PDCD1* and *BCL6* and its respective proteins in patients with PCNSL and its correlation with clinical outcomes of overall survival (OS) and progression-free survival (PFS). **Methods:** Retrospective cohort study. Immunocompetent patients from a Brazilian single center with PCNSL and confirmed histopathology DLBCL CD20+ were included, their clinical data and archival histopathological material were retrieved. Gene expression (RT-qPCR) was performed and its values were normalized to internal control gene *GUSB*, then categorized and correlated with clinical outcomes. Only univariate analysis was performed due to small sample size. **Results:** Thirty-five patients were included, gene expression was evaluable in 21 patients (60%). Median duration of follow-up was 41 months. Median OS, DFS, PFS were, respectively, 42.6 months, 59.2 months and 41 months. Median expression of genes *MYC, BCL2, LMO2, MGMT, POU2F1, PDCD1* and *BCL6* were, respectively, 0.201; 0.564; 1.636; 0.000; 1.448; 0.000 and 2.716. Age at diagnosis >60 years, modified international prognosis index (IPI) ≥2, *performance status* (PS) ≥3, *MYC* expression ≥0,201041, anti-BCL2 ≥51%, absence of radiotherapical treatment, refractoriness to treatment and disease progression after 1st line of treatment were associated with worse OS (p ≤0,1). Age at diagnosis >60 years, modified IPI ≥2, PS ≥3 and absence of radiotherapical treatment were associated with worse DFS (p ≤0,1). Age >60 years, modified IPI ≥2, P.S. ≥3, absence of radiotherapical treatment, *MYC* gene expression ≥0,201041, anti-BCL2 ≥51%, *LMO2* gene expression <0,689232, *MGMT* gene expression ≥0,335666, refractoriness to treatment and progressive disease were associated with a worse PFS (p ≤0,1). *MYC* gene expression ≥0,201041, *PDCD1* gene expression ≥2,00938 were associated with risk of disease relapse (p ≤0,1). A moderate correlation was found between *MYC* gene expression (<0,201041 x ≥0,201041) and its protein (≤50% x ≥51%), (Kappa=0,596, p=0,022); and also

between *BCL2* gene expression (<0,3516 x ≥0,3516) and its protein (≤50% x ≥51%), (Kappa=0,426, p=0,042). **Conclusion:** In a univariate analysis, *MYC* gene expression ≥0,201041, anti-BCL2 ≥51%, *LMO2* gene expression <0,689232*, MGMT* gene expression ≥0,335666 and *PDCD1* gene expression ≥2,00938 were prognostic markers associated with unfavorable clinical outcomes.

**Descriptors:** Lymphoma, Non-Hodgkin; Brain Neoplasms; Gene Expression; Biomarkers; Retrospective Studies; Cohort Studies; Immunohistochemistry; Survival Analysis.

# 1 INTRODUÇÃO

Os Linfomas não-Hodgkin (LNH) compreendem um grupo heterogêneo de neoplasias de origem linfoide cuja etiologia é multifatorial [1]. Correspondem a 4,3% de todos os cânceres nos EUA, com aumento de incidência entre 1975 e 2015 (de 12 para 19,91/100.000 pessoas/ano) e Sobrevida Global (SG) estimada em 5 anos de 74,1% [2,3]. Os LNH podem ser de origem linfoide B, T e *natural killer* (NK) [4-6]. Para o Brasil, estimam-se 5.370 casos novos de LNH em homens e 4.810 em mulheres para cada ano do biênio 2018-2019, com risco estimado de óbito de 2,8 a cada 100 mil habitantes [7].

Linfoma não-Hodgkin difuso de grandes células B (LDGCB) sistêmico é o subtipo de LNH mais frequente, o qual representa 40% de todos os LNH de origem linfoide B e apresenta comportamento clínico agressivo bem como incidência de mais de 25.000 casos/ano nos EUA. É uma doença heterogênea dos pontos de vista genético, morfológico e imunofenotípico. Pode ser classificado de acordo com a célula de origem e as características moleculares determinadas por técnicas de Perfil de Expressão Gênica (PEG) em Células B do Centro Germinativo (GCB) ou células B ativadas (ABC). Esta classificação reflete o estágio de desenvolvimento da Célula B originalmente comprometida[8,9]. A célula de origem também pode ser classificada de acordo com suas características de expressão proteica por IHQ em GCB ou de não-GCB, em concordância com o GEP em 86% [10]. Pacientes com LDGCB GCB e ABC apresentam prognósticos distintos, com SG em 5 anos de 76% e 34% respectivamente. No entanto, 50% dos pacientes não conseguem atingir remissão duradoura [9,11-14].

Linfoma primário de SNC é um LNH extranodal com origem no SNC e restrito a este órgão. O subtipo LDGCB é o mais frequente, entre 75% a 90% dos casos [5,15]. Outros subtipos incluem o linfoma de célula T, linfoma de Burkitt, linfoma linfoplasmocítico e linfoma da zona marginal. Neste texto, ao descrevermos LPSNC, consideraremos apenas os linfomas de histopatologia LDGCB CD20+ de indivíduos imunocompetentes. Trata-se de doença rara,

agressiva e de mau prognóstico [16]. Diferente do LDGCB sistêmico, o LPSNC tem origem em uma célula B em fase terminal de diferenciação, com características de ambas GCB e pós-CG [6].

LPSNC corresponde a 2% dos tumores primários do SNC, com mediana de idade de 65 anos ao diagnóstico. Anatomicamente se encontra limitado ao encéfalo, olhos, medula espinhal e leptomeninges. Possui comportamento biológico mais agressivo e menor SG quando comparado ao LDGCB sistêmico[17]. Sua incidência é de 0,7 caso por 100.000 pessoas/ano nos EUA [18], porém nas últimas décadas tem aumentado a uma taxa de 1,6% ao ano [19].

Tratamento com intuito curativo ou paliativo é indicado de acordo com as condições clínicas do paciente. Podem ser usados agentes isolados ou combinados, associados ou não à radioterapia, assim como radioterapia isolada e transplante de células tronco hematopoiéticas autólogo (ASCT). Devido à alta morbidade e pouco benefício clínico, procedimentos cirúrgicos estão limitados à biópsia diagnóstica, geralmente estereotáxica. O tratamento com quimioterapia é dificultado pela presença da barreira hematoencefálica, o que limita a penetração dos fármacos. O fato de a maioria dos pacientes ser idosa, com maior prevalência de comorbidades, reduz a tolerância ao tratamento.

Tratamento de indução seguido de consolidação apresenta melhores taxas de resposta global (TRG). A maior parte dos esquemas terapêuticos para o LPSNC tem como base altas doses de metotrexato (HD-MTX), variando de 1g/m2 a 8 g/$m^2$ . O MTX pode ser associado ou não a outros fármacos, como agentes alquilantes ou à radioterapia de crânio total. A resposta global (RG) ao tratamento inicial é usualmente alta, porém as taxas de recidiva após 2 anos são muito altas. Cerca de 15% das recidivas ocorrem no mesmo local anatômico da lesão inicial primária e 85% ocorrem distantes do sítio primário, mas dentro do SNC [20-22].

Com melhores técnicas diagnósticas e novas opções terapêuticas, houve aumento da SG em 5 anos de 19,1% (1992-1994) para 30,1% (2004-2006) nas últimas décadas [19]. Entretanto, as taxas de recidiva precoce ainda são elevadas (20% a 30%) [23].

Estudos genéticos têm evidenciado o papel da hiperativação da via do

NFkB na tumorigênese em decorrência de mutações de genes da via de sinalização do receptor de células B (BCR). O microambiente por ação imunossupressora local pode interferir na progressão e no crescimento tumoral[24].

Há carência de dados clínicos e moleculares na literatura médica referente a esta doença devido à sua raridade e à dificuldade de obtenção de material representativo. Estudos genéticos e moleculares podem auxiliar no entendimento da tumorigênese, por meio da identificação de fatores de prognóstico, preditores de resposta, além de novos alvos terapêuticos.

Estudos preliminares com LPSNC e LDGCB descreveram prognóstico favorável da hiperexpressão dos genes *BCL6* e *LMO2*, e desfavoráveis relacionados à suprarregulação dos genes *BCL2, MYC, MGMT, POU2F1* e *PDCD1*.

O gene *BCL2* é um proto-oncogene com papel na regulação da apoptose, e sua hiperexpressão está associada à tumorigênese de linfomas[25,26].

O gene *MYC* é um proto-oncogene associado à expressão de vários outros genes envolvidos no controle do crescimento e da proliferação celular. Está associado à tumorigênese de certos tumores, incluindo o LDGCB. Sua assinatura genética está associada a genes envolvidos no metabolismo e resistência aos agentes antifolatos, incluindo o metotrexate [27].

O gene *LMO2* atua na regulação de expressão de outros genes, pode estar hiperregulado em LNH derivados do Centro Germinativo e é considerado um indicador prognóstico favorável de LDGCB [28].

O gene *MGMT* codifica uma enzima reparadora de DNA silenciada por meio da metilação da sua região promotora. Sua hiperexpressão de MGMT parece estar associada a um pior prognóstico, e a metilação de sua região promotora é um biomarcador de bom prognóstico em pacientes portadores de glioma tratados com agentes alquilantes e um fator preditor de resposta ao tratamento com temozolamida, a qual vem sendo estudada como opção terapêutica no LPSNC [29].

O gene POU2F1 (OCT1) pode estar hiperexpresso em linfoma. Sua presença aumenta a suscetibilidade tumoral a irinotecano, paclitaxel, assim

como o transporte intracelular de antraciclícos. Desta forma, sugere-se que alterações de *POU2F1* possam causar resistência das células tumorais aos quimioterápicos [30,31]. No entanto, a hipexpressão de POU2F1 está elevada em carcinomas epiteliais de estômago, cólon, pulmão, mas, nestes caso, está associado a um pior prognóstico [32].

O gene *PDCD1 (PD1)* pode estar hiperexpresso em 65% dos LPSNC, juntamente com o *PD-L1* e *PD-L2* e possui papel na evasão imune tumoral. Estudos recentes têm demonstrado atividade do bloqueio de PD-1 com nivolumbe em pacientes com LPSNC refratário ou com recaída [33,34].

O gene *BCL6* é considerado um gene supressor tumoral, que atua como um repressor e um modulador transcricional. Quando hipermutado, translocado e, consequentemente, inativado, pode associar-se à tumorigênese, inclusive no LDGCB [35].

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

LPSNC é um subtipo de LNH extranodal que acomete o encéfalo, leptomeninge, olho ou medula espinhal sem evidência de envolvimento sistêmico. Ao contrário do LDGCB sistêmico, o LPSNC se desenvolve em órgão desprovido de tecido linfoide [14]. Pela classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) [6,36], critérios de exclusão para definição de LPSNC incluem envolvimento de dura-máter, linfoma intravascular de grandes células B e linfoma secundário [13,37]. Podem-se apresentar como lesão intracraniana solitária ou múltipla, periventricular e leptomeníngea difusa, de medula ou neurolinfomatose [6,38,39]. Os sítios primários mais acometidos são o cérebro (79,5%), medula espinhal (6,7%), meninges e nervos cranianos (2%) e outros (11,8%) [15]. No linfoma primário ocular, os achados mais frequentes incluem infiltração vítrea e sub-retinianas, sendo o diagnóstico estabelecido por vitrectomia ou biópsia coriorretiniana [40].

Os principais fatores de risco para desenvolvimento de LPSNC incluem imunodeficiência primária ou adquirida, sendo esta iatrogênica ou pela infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) [39,41]. Os sintomas incluem déficit neurológico focal (70%), alterações neuropsiquiátricas (43%) e aumento de pressão intracraniana (PIC) (33%). Sintomas B são raros, e pacientes com acometimento ocular podem apresentar dor ocular, visão turva e escotomas visuais. Acometimento secundário do líquido cefalorraquidiano (LCR) e ocular ocorrem em 15-20% e 5-20% dos pacientes, respectivamente [38,39].

### 2.1 Epidemiologia

LPSNC tem incidência entre 0,47 a 0,7 caso por 100.000 pessoas/ano, corresponde a 2,2% de todos os tumores do SNC, 1% dos LNH, e a maioria dos casos (90%) apresenta histopatologia LDGCB [16,17,42-45]. No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer disponibiliza incidência de LNH e neoplasias primárias de SNC (5,2/100.000 pessoas/ano e 5,6/100.000 pessoas/ano,

respectivamente), porém não há dados sobre incidência anual de LPSNC [7].

A maioria dos casos é esporádica, e sua incidência aumenta com a idade, com mediana de idade ao diagnóstico de 65 anos e razão homem/mulher de 1,2/1 a 1,7/1 [15]. A incidência anual em população entre 30-69 anos e >70 anos é de 0,08/100.000 e 4,32/100.000, respectivamente [46]. Usualmente, os pacientes apresentam índice de comorbidade de Charlson-Deyo de 0 (65,9%) e ausência de sintomas B (79,6%) [17,22,47].

Apesar da baixa incidência de LPSNC em pacientes imunocompetentes, dados do SEER demonstram aumento de sua incidência (1,6% ao ano) em população > 65 anos entre 1992 e 2011 [19]. A realização mais frequente de exames imagenológicos de SNC e o aumento de uso de medicamentos imunossupressores em população idosa poderiam justificar o aumento da incidência observado nas últimas décadas [48,49].

## 2.2 Diagnóstico

### 2.2.1 Biópsia/Líquor

O diagnóstico geralmente é estabelecido por análise histopatológica e IHQ de biópsia estereotáxica. Biópsia esterotáxica permite diagnóstico histopatológico entre 80% e 99% dos pacientes, porém a quantidade de material obtido, de três a dez fragmentos medindo entre 5 e 10 mm de comprimento por 1 mm de espessura, muitas vezes é insuficiente para realizar todos os procedimentos anátomo-patológicos e moleculares [50].

O diagnóstico também pode ser realizado por análise de LCR ou aspirado vítreo em pacientes com acometimento ocular quando há restrição de acesso ao tumor [22]. A análise liquórica deve ser preferencialmente realizada por citometria de fluxo e citologia oncótica. A presença de acometimento extraneural exclui o diagnóstico de LPSNC, sendo recomendada investigação ativa por meio de exames de imagem por tomografia com emissão de pósitron com 18-fluorodeoxiglicose (18-FDG-PETC/CT) de corpo inteiro ou tomografia computadorizada (TC) de pescoço, tórax, abdômen e pélvis. A biópsia de medula óssea unilateral é recomendada para os casos que não são estadiados

com 18-FDG-PETC/CT. Para o estadiamento, recomendam-se também hemograma completo, perfil metabólico, dosagem de DHL e sorologia para HIV[51].

À histologia, o LPSNC é caracterizado por agrupamentos de centroblastos ou imunoblastos no espaço perivascular, com linfócitos reacionais, macrófagos e células microgliais entre as células tumorais [5,6,52]. Na maioria dos casos, as células malignas expressam antígenos de células B, como CD79b, CD19, CD20 e CD22. A ausência de imunoexpressão para CD138 corrobora os achados morfológicos centroblásticos sem características plasmocíticas [53].

Há dois padrões de disseminação tumoral: o primeiro corresponde ao padrão de crescimento angiotrópico, com células neoplásicas que aparentemente migram pelo espaço perivascular ou espaço de Virchow-Robin. Nestes casos, interfere na barreira hematoencefálica e eventualmente permite a captação de contraste na RNM. O segundo padrão é o de invasão ao longo das raízes nervosas através da substância branca do corpo caloso ou do espaço meníngeo. O crescimento e a proliferação tumoral em direção ao espaço subependimal podem levar à invasão do espaço periventricular e à disseminação pelo SNC. [5,54]. Geralmente observa-se padrão de atividade proliferativa, com expressão de BCL6 em 60-80%, MUM1+ em 90% e CD10 em 10% dos casos [42]. Resposta inflamatória secundária pode estar presente no LPSNC, com macrófagos ativados e células T reativas, o que pode estar associado a melhor prognóstico [55].

O antígeno quimiotáxico para linfócitos B CXCL13 está associado ao tropismo das células neoplásicas para SNC, incluindo neoplasias linfoides. Os biomarcadores CXCL13 e IL-10 podem estar elevados no LCR de pacientes com LPSNC. CXCL13 (AUC 0,841) tem sensibilidade e especificidade para diagnóstico de LPSNC de 71% e 95%, e IL-10 (AUC 0,851) tem sensibilidade e especificidade de 64% e 93,4%, respectivamente. Tal sensibilidade é duas vezes maior do que citologia de LCR ou de citometria de fluxo para diagnóstico de LPSNC (Tabela 1). Altas concentrações de CXCL13 no LCR estão associadas a pior prognóstico [55].

**Tabela 1 -** Sensibilidade e especificidade de biomarcadores CXCl13 e IL-10 (LCR) e aplicação diagnóstica de LPSNC [55]

| Biomarcador | Sensibilidade | Especifidade | AUC | IC95% |
|---|---|---|---|---|
| CXCL13 | 71% | 95% | 0,841 | 0,779-0,892 |
| IL-10 | 64% | 94,10% | 0,851 | 0,789-0,901 |
| CXCL13 ou IL-10 | 84,20% | 90,50% | 0,974 | 0,815-0,919 |
| CXCL13 e IL-10 | 50% | 99,30% | 0,746 | 0,675-0,809 |
| Citologia | 14% | - | - | - |
| Citometria de fluxo | 20% | - | - | - |

Com relação ao microambiente tumoral, pode se observar resposta inflamatória local com infiltrado de macrófagos e células T reativas. Infiltração de células T perivasculares podem estar associadas a melhor prognóstico, além de ser um alvo para terapias que potencializam resposta imune mediada por células T [56].

### 2.2.2 Imagem

No Serviço de Neurocirurgia, comumente os pacientes eram submetidos à RNM com injeção de contraste gadolíneo por ser o método radiológico mais sensível para diagnóstico de tumores em SNC, assim como de avaliação de resposta clínica [57,58]. A maioria dos pacientes apresenta massa cerebral isolada, isointensa ou hiperintensa em T1-*weighted* (RMN) com hipercaptação homogênea nas sequências pós-contraste, pouco edema e sem necrose. Na maioria dos casos, há lesão única (70%), sendo o hemisfério cerebral (66%), gânglio basal (27%) e o corpo caloso (24%) os sítios anatômicos mais acometidos [59]. A TC com contraste apresenta achados equivalentes, porém nenhum método de imagem é patognomônico do LPSNC. O principais diagnósticos diferenciais incluem glioblastoma multiforme, metástases cerebrais entre outras [60].

Aproximadamente 25% dos tumores têm outras lesões multicêntricas, não captantes de contraste, hiperintensas em T2-FLAIR (*fluid attenuated inversion recovery*), sendo estes achados consistentes com a disseminação

linfomatosa no cérebro que pode ocorrer na ausência de captação de contraste na RNM. T2-FLAIR tem maior sensibilidade para diagnóstico de lesões subclínicas, porém com menor especificidade. Alterações em T2-FLAIR podem ser secundárias à quimioterapia, à radioterapia de crânio total ou ao envelhecimento. Numa série analisada, porém, foi demonstrado que 88% das lesões em T2-FLAIR em LPSNC foram resolvidas após tratamento com HD-MTX, o que sugere tratar-se de lesões neoplásicas [61].

A *Diffusion-weighted imaging* analisa o coeficiente de difusão aparente de água em tumores hipercelulares como o LPSNC, com maior diferenciação entre tumores hipercelulares que se apresentam hiperintensos (LPSNC ou doença residual) e lesões com menor celularidade (gliomas malignos), o que aumenta a especificidade do método. Coeficientes de difusão muito baixos estão associados ao LPSNC [62,63].

O *International PCNSL Collaborative Group* (IPCG) desenvolveu um sistema para avaliar a extensão da doença e a resposta clínica ao tratamento oncológico a fim de se obter uma padronização [51], conforme demonstrado no Quadro 1.

O exame de $^{18}$F-FDG PET apresenta maior sensibilidade e especidade na detecção de acometimento nodal e extranodal de linfomas de alto grau, incluindo o LPSNC, além de avaliação de massas residuais no reestadiamento[58,64,65]. O LPSNC apresenta celularidade densa com alto metabolismo e consumo de glicose. No achado do PET, encontra-se alta concentração do FDG, o que pode auxiliar no diagnóstico diferencial entre LPSNC e outros tumores. Numa meta-análise incluindo 129 pacientes imunocompetentes com LPSNC, tal exame teve sensibilidade de 0,88 (IC95% 0,8- 0,94), especificidade de 0,86 (IC95% 0,73- 0,94), quando comparados à RNM e à biópsia estereotáxica (IC95% 0,04- 0,32) [60]. Num estudo retrospectivo com 34 pacientes, a mediana de SUV (*standardized uptake value*) máxima foi de 22,17 (±5,03), geralmente com valores superiores aos encontrados no glioblastoma multiforme [66].

| Resposta | Imagem encefálica | Dose corticoide | Avaliação oftalmológica | Citologia LCR |
|---|---|---|---|---|
| Resposta completa | Sem lesão com captação de contraste | Nenhuma | Normal | Negativo |
| Resposta Completa Não Confirmada | Sem lesão com captação de contraste | Qualquer | Normal | Negativo |
| | Lesão com pequena captação de contraste | | Pequena alteração no epitélio retiniano pigmentar | Negativo |
| Resposta Parcial | Diminuição de 50% na captação de contraste | Não disponível | Normal ou pequena alteração no epitélio retiniano pigmentar | Negativo |
| | Lesão sem captação de contraste | | Diminuição de células vítreas ou infiltrado retiniano | Persistente ou Suspeito |
| PD | Aumento em 25% da captação de contraste | Não disponível | Recorrente ou novo acometimento | Recorrente ou positivo |
| | Surgimento de qualquer outra lesão | | | |
| Doença Estável | Qualquer outra situação não descrita acima | | | |

**Quadro 1 -** Avaliação de resposta clínica [51]

## 2.3 Prognóstico

LPSNC tem pior prognóstico em relação ao LDGCB sistêmico [14,39]. A SG mediana é inferior a 12 meses em pacientes tratados apenas com WBRT e de 30 a 40 meses em pacientes tratados com quimioterapia à base de HD-MTX[12,41].

Em dados do *National Cancer Data Base,* 9.165 casos de LPSNC tratados entre 2004 e 2013 demonstraram SG em 3 anos de 37,7% (IC95% 36,6-38,8) para todos os pacientes; 51,8% para aqueles tratados com poliquimioterapia; 37,7% com monoquimioterapia e 14,1% para os casos tratados somente com radioterapia. Após análise dos fatores confundidores, tratamento com monoterapia e radioterapia isolada estiveram associados à pior SG em relação à poliquimioterapia, com HR de 1,32 (IC95% 1,22- 1,44) e HR= 2,32 (IC 2,07- 2,59), respectivamente [67]. Em análise do banco de dados do *SEER* (*Surveillance, Epidemiology, and End Results*), 4.142 casos com LPSNC evidenciaram SG em 1 ano de 47,8% (IC 46,2- 49,3) e SG em 3 anos de 38,2% (IC 37,8-38,6) [17]. Estudo CALGB 50202 demonstrou SG mediana de 4 anos, porém novas linhas terapêuticas foram necessárias para 50% dos pacientes devido à alta taxa de recaída [23].

### 2.3.1 Fatores clínicos de prognóstico

O Índice Prognóstico Internacional (IPI) é utilizado em outros tipos de linfoma por avaliação de SG e com algumas modificações para LPSNC. Em análise retrospectiva de 378 pacientes, foram identificados cinco fatores associados a pior prognóstico [68,69] (IPI modificado), conforme demonstrado a seguir:

- Idade > 60 anos;
- DHL elevada;
- Alta concentração de proteína no LCR (acima do limite da normalidade);
- Acometimento de regiões profundas do cérebro (periventriculares, gânglio basal, tronco cerebral e cerebelo) e

- Performance Status 2, 3 ou 4 *

  (* PS 0= paciente ativo, sem restrições; PS 1 = paciente com restrição a atividades físicas extenuantes, porém paciente ambulatorial capaz de realizar atividades físicas leves/moderadas e autocuidado); PS 2= paciente sintomático, acamado <50% do dia, auto-cuidados preservados; PS 3= paciente sintomático, restrito ao leito >50% do dia, carente de cuidados mais intensivos; PS 4= paciente completamente dependente e restrito ao leito[70])

Considerando 1 ponto para cada um dos fatores descritos acima, a SG em 2 anos pode ser estimada conforme demonstrado na Tabela 2.

**Tabela 2 -** Sobrevida Global (SG 2 anos) de acordo com o escore de prognóstico IPI modificado para LPSNC [68]

| Pontos | SG (±SD) |
|---|---|
| 0 ou 1 | 80% (±8%) |
| 2 ou 3 | 48% (±7%) |
| 4 ou 5 | 15% (±7%) |

Uma meta-análise com 783 pacientes avaliou o prognóstico e os efeitos do tratamento em primeira linha em pacientes com LPSNC maiores que 60 anos. Nesta população, KPS≥70% foi fator prognóstico para mortalidade (HR=0,5; IC95% 0,41-0,62) [71]. A maioria dos pacientes com LPSNC foram idosos e, consequentemente, com maior risco de neurotoxicidade à WBRT e com maior morbimortalidade. Por este motivo, muitas vezes é utilizada apenas quimioterapia isolada nesta população [72]. O estudo prospectivo MATRix com 227 pacientes demonstrou SLP e SG inferiores em pacientes acima de 65 anos em comparação aos indivíduos com idade inferior a 65 anos tratados com metotrexato, citarabina, tiotepa e rituximab [73]. Tais dados são endossados por uma análise retrospectiva de dados do SEER com 5138 pacientes entre 1973 e 2014, cuja análise multivariada para SG demonstrou que idade >60 anos (HR= 1,834; IC95% 1,692- 2,004; p<0,001) foi associada à pior sobrevida. Tratamento com quimioterapia (HR=0,442; IC95% 0,407-0,480; p<0,001) foi associado à maior sobrevida [15].

Início de tratamento precoce também tem impacto no prognóstico. Num

estudo de fase 2 com 44 pacientes com LPSNC virgens de tratamento submetidos à imunoquimioterapia, indivíduos com início de tratamento acima de um mês do diagnóstico tiveram pior SLP em relação aos que iniciaram tratamento mais precoce (SLP 3 anos 20% x 59%, p=0,05) [23].

### 2.3.2 Fatores histopatológicos de prognóstico

No LDGCB sistêmico, biomarcadores para recaída incluem *double hit* MYC+BCL2+. Duplo expressor (DE) MYC+BCL2+ e célula de origem ABC parecem também estar correlacionados com prognóstico. Com o critério de positividade a IHQ para MYC+ ≥ 40% / BCL2+ ≥50%, é possível identificar o subtipo DE em 30% dos LDGCB, dos quais > 50% são do subtipo ABC. Estes pacientes apresentam SLP 5 anos de 44% e SG 5 anos de 39%. No entanto, dados no LPSNC ainda são inconclusivos [74]. No LDGCB sistêmico, imunoexpressão de BCL2, MYC, LMO2 e p53 são considerados de valor prognóstico [75].

O tipo de célula de origem pelos critérios de Hans é estudado como fator de prognóstico, porém com resultados inconclusivos. A presença CD10+ e/ou BCL6+ e a negatividade para MUM1 por IHQ caracterizam o subtipo GCB e o oposto o subtipo não-GCB [10], conforme Figura 1. O ponto de corte para as reações de IHQ é de ≥ 30%. Teste de expressão genética de 20 genes foi validado para identificar COO em amostras parafinadas de LDGCB, facilitando sua caracterização [76]. Num estudo com 77 pacientes com LPSNC, foi observado concordância entre os critérios de Hans e LST *assay* de 83% [77].

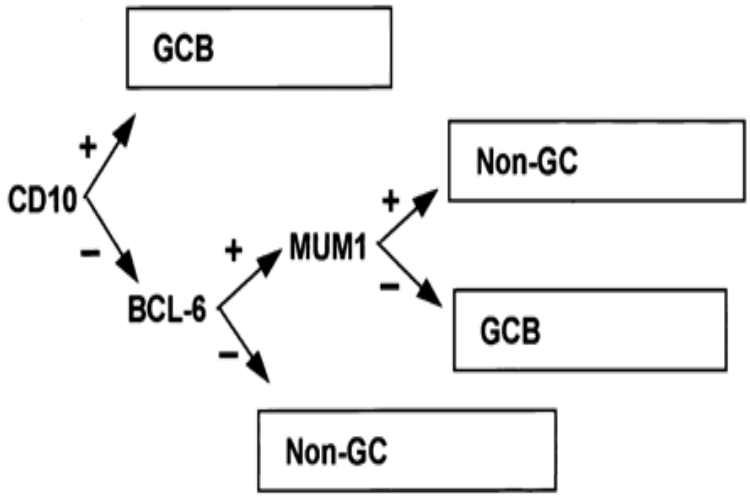



**Figura 1 -** Tipo de Célula de Origem conforme Critérios de Hans[10] para IHQ (2004). BCL6 e CD10 são marcadores de Centro Germinativo de Células B. MUM1 é expresso em plasmócitos e no desenvolvimento tardio de Células B e está associado a subgrupo ABC em estudos de perfil de expressão genética. Se CD10 ou ambos CD10 e BCL6 forem positivos, a COO é do subgrupo GCB. Se ambos BCL6 e CD10 são negativos, a COO é do subgrupo Não-GCB. Se BCL6 for positivo e CD10 for negativo, a expressão de MUM define o subgrupo da COO: se MUM1 é negativo, a COO é subgrupo GCB; se MUM1 é positivo, a COO é subgrupo Não-GCB

No LPSNC, a imunoexpressão de MUM1 e BCL6 é de 95% e 60%, respectivamente, e a maioria dos casos apresenta COO não-GCB [41,53,78]. Num estudo com 82 pacientes com LPSNC, 79 (96,3%) foram classificados como não-GCB, 42 (51,2%) expressavam BCL6$^+$ e MUM1$^+$ sugerindo “não-GCB”. Trinta e três (40,2%) expressavam exclusivamente MUM1, o que sugere sobreposição entre *late GC* e *early post-GC*, justificando o fenótipo não-GCB e o pior prognóstico [53]. Contudo, a classificação da COO pelos critérios de Hans não teve valor prognóstico numa coorte retrospectiva de 115 pacientes com LPSNC [79].

Num estudo retrospectivo com 31 casos de LPSNC tratados com HD-MTX, 26 (84%) pacientes foram caracterizados como não-GCB, a sobrevida mediana foi de 2,5 meses (0-6,6 meses) e 7,4 meses (4,4-10 meses) para os grupos GCB e não-GCB, porém não significante estatisticamente [12]. É importante ressaltar que o perfil transcricional das células neoplásicas do LPSNC é distinto do LDGCB sistêmico, mesmo quando a COO (GCB x ABC) é

a mesma, o que pode justificar o pior prognóstico e o comportamento mais agressivo do LPSNC. Pacientes com LPSNC ABC apresentam hiperexpressão e ativação da via do *Fibroblast Growth Factor*, associado à sobrevida e proliferação celulares, diferentemente do LDGCB sistêmico ABC [80].

Alguns estudos evidenciaram que a expressão de BCL6 (IHQ) foi associada a melhor prognóstico [13]. A análise imuno-histoquímica dos pacientes do CALGB50202 demonstrou que a hiperexpressão de BCL6 estava associada à menor SG [23]. Este resultado foi ratificado por um estudo prospectivo [81], porém outros evidenciaram o contrário: que a hiperexpressão de BCL6 estaria associada a melhor prognóstico [41]. Uma das possibilidades para esta discrepância poderia ser que o significado prognóstico do BCL6 seja dependente da coexpressão do MYC ou BCL2 ou devido ao tipo de tratamento que os pacientes receberam nestes estudos.

A expressão de CD3 é um marcador de células T e não é frequente em linfomas de célula B, porém pode estar presente em LNHDBC EBV+, possivelmente devido à inativação do PAX5 que atua na diferenciação da célula B, o que permite a expressão do CD3 [82-84]. É uma proteína com domínio extracelular, transmembrana e intracelular. A IHQ apresenta-se na membrana e citoplasma principalmente de células T normais e neoplásicas [85,86].

*Tumour Infiltrating Lymphocyte (TIL)* é caracterizado pela presença de pelo menos um vaso de pequeno a médio calibre circundado por pelo menos duas camadas de células T à IHQ pela positividade de CD3 (linfócito T), FOX-P3 (linfóciyo T regulador) e TIA-1 (células citotóxicas). É um fator de prognóstico positivo para sobrevida global, resposta tumoral ao tratamento em vários tipos de câncer (carcinoma ductal de mama, câncer de ovário e câncer de endométrio, entre outros), tanto como variável categórica (presença ou ausência) como variável qualitativa numérica (contagem de TIL) [87-89]. Num estudo retrospectivo com 62 pacientes com LPSNC, TIL esteve presente em 32% dos casos e foi associado à melhor resposta e sobrevida global [90].

Num estudo retrospectivo, multicêntrico, com 100 LPSNC, necrose tumoral foi observada em 24% e TIL em 36%. O padrão de necrose tumoral observado foi do tipo coagulativo, caracterizado por coleções de células neoplásicas fantasmas que ocupam espaço na biópsia, além da presença de

células apoptóticas. TIL foi analisado em campo de pequeno a médio aumento, analisando os vasos ao redor do tumor ou das células tumorais, com fenótipo de células T presente e acumuladas em múltiplas camadas próximas à parede vascular ou entre a parede vascular e as células tumorais. Presença de TIL foi associada à melhor SG na análise multivariada quando comparada à ausência de TIL (SG: 59% ± 14% vs. 42% ± 9%, P= 0.02, respectivamente). No entanto, a presença de necrose tumoral não foi considerada fator prognóstico em pacientes com LPSNC [56]. Num estudo com 30 pacientes do *International Extranodal Lymphoma Study Group,* um colar de CD3 perivascular reativo foi observado em 23% dos pacientes, todos com IPI modificado de risco baixo a intermediário [91].

## 2.4 Tratamento

O tratamento é composto de uma fase de indução seguida pela consolidação [92]. A escolha do tratamento na fase de indução depende de características clínicas, tais como idade, *performance status* (PS), comorbidade e IPI.

A indução pode ser realizada com HD-MTX, imunoquimioterapia associada a HD-MTX, WBRT, entre outras. Não se recomenda tratamento isolado com corticosteroides devido à alta taxa de recidiva e à interferência no diagnóstico histopatológico se administrado antes da realização da biópsia. A escolha do tratamento de consolidação depende da resposta clínica obtida na fase da indução, da tolerabilidade do paciente e da toxicidade. Opções da fase da consolidação incluem observação, citarabina em altas doses, RT, ASCT, entre outras. Os agentes quimioterápicos precisam ter boa penetração pela BHE. Agentes alquilantes e esteroides têm boa penetração em doses convencionais; MTX e araC têm baixa penetração, porém em doses altas conseguem atravessar a BHE. Agentes antracíclicos, alcalóides da vinca têm baixa penetração e baixa disponibilidade no SNC, os quais necessitam de doses tóxicas para serem efetivas em tumores no SNC [92].

Apesar de avanços no tratamento do LPSNC, a taxa de recorrência em 2 anos é de 50% e um terço dos pacientes são refratários ao tratamento

inicial[21,93].

Devido ao risco de neurotoxicidade induzido pelo tratamento, recomenda-se realização de testes neuropsicológicos para as funções de execução, atenção, memória e velocidade psicomotora antes, durante e após o tratamento [21,94].

### 2.4.1 Radioterapia

WBRT como terapia isolada era o tratamento de escolha no passado. Doses entre 36 a 45Gy apresentavam RC de 60% a 90%, porém com recidiva precoce e SG mediana 12-18 meses e alta morbi-mortalidade, incluindo neurotoxicidade precoce e tardia [95]. A neurotoxicidade é ainda mais prevalente quando associada à quimioterapia. Por estes motivos, além de o LPSNC ser uma doença multifocal e infiltrativa, radioterapia focal ou radiocirurgia não são recomendadas atualmente como primeira escolha terapêutica, porém pacientes que não respondem à quimioterapia podem se beneficiar desta terapia como resgate [16,94,95].

O benefício da WBRT como consolidação também é questionado. Um estudo multicêntrico, randomizado, fase 3, com 581 pacientes, comparou quimioterapia baseada em HD-MTX com ou sem consolidação com RT, sem evidência de melhora na SG apesar do aumento da PFS no braço com RT [22].

Estudo prospectivo e observacional demonstrou que radiocirurgia com *gamma knife* associado à quimioterapia aumentou a SG de 27 meses para 48 meses em pacientes submetidos à radiocirurgia *versus* aqueles submetidos apenas à quimioterapia, com RC de todas as lesões e sem declínio neurológico. No entanto, trata-se de estudo não randomizado, e a análise dos dados encontra-se em andamento [96].

Doses menores de radioterapia foram associadas a menor risco de perda neurocognitiva. Num estudo de fase 2, pacientes em RC foram submetidos à consolidação com citarabina e WBRT em doses menores (23,4 Gy) após indução com HD-MTX, sem perda de função cognitiva [97]. Tais dados, no entanto, devem ser analisados com cautela, devido ao risco de neurotoxicidade tardia [98]. Radioterapia foi associada a maior risco de toxicidade

neurológica tardia (OR 5,23, IC95% 2,33-11,74) [71].

Sintomas tardios associados à neurotoxicidade por WBRT incluem déficit de atenção, alterações de memória e de marcha, ataxia, incontinência, entre outros. Achados radiográficos incluem alteração de substância branca, aumento ventricular e atrofia cortical. Achados anátomo-patológicos incluem demielinização, perda neuronal hipocampal e aterosclerose de grandes vasos[99]. Não há tratamento efetivo para estas complicações [100].

### 2.4.2 Monoterapia ou Poliquimioterapia baseado em MTX

MTX em altas doses é o agente antineoplásico mais usado na fase de indução, pois possui boa penetração na BHE e depuração plasmática trifásica. Esquemas habituais incluem infusão rápida em 3 horas em ciclos de 14 ou 21 dias na dosagem ≥3 g/m$^2$. Doses ≥ 1g/m$^2$ alcançam nível terapêutico no cérebro e doses ≥3g/m$^2$ atingem nível terapêutico no LCR [101]. Infusões contínuas em 24 horas não são mais eficientes; administração de mais de seis ciclos de HD-MTX está associada à maior taxa de RC [97,102]. Doses até 3,5g/m2 têm boa tolerabilidade, sendo as principais toxicidades: disfunção renal, mucosite, citopenias e raramente hepatite, esta ocorrendo principalmente em pacientes idosos [103].

Uma meta-análise com 783 pacientes avaliou prognóstico e efeitos do tratamento em primeira linha em pacientes com LPSNC maiores que 60 anos. Nesta população, o tratamento baseado em HD-MTX aumentou a sobrevida quando comparado a WBRT (HR 0,70, IC95% 0,53-0,93). Não houve diferença entre HD-MTX associado à quimioterapia oral e outras terapias agressivas baseadas em HD-MTX (HR 1,39, IC 95% 0,90-2,15).

Estudo de fase 2 randomizado com 79 pacientes comparou HD-MTX (3,5g/m$^2$, D1) associado à citarabina (2g/m$^2$) com HD-MTX isolado na dose de 3,5g/m$^2$ a cada 21 dias, seguido de RT de consolidação. HD-MTX associado à citarabina ofereceu maior taxa de RC (46% x 18%, p=0,06) e de RG (69% x 40%, p=0,009), porém com maior incidência de neutropenia (90% x 15%, p=0,00001), anemia (46% x 10%, p=0,00001), complicações infecciosas (23% x 3%, p=0,0002), trombocitopenia (92% x 8%, p=0,0001) e hepatoxicidade

(10% x 3%, p=0,05) [104].

### 2.4.3 Imunoterapia e Imunoquimioterapia com Rituximabe

Rituximabe é um anticorpo monoclonal contra o antígeno CD20 presente em linfócitos B. Tem penetração limitada em SNC atingindo nível em LCR de 0,1% a 4,4% em relação ao nível sérico, porém a monoterapia com rituximabe levou à resposta radiológica em pacientes com LPSNC recidivados [105]. A meta-análise para avaliar o benefício do uso de rituximabe evidenciou que esse anticorpo levou a ganho de SLP 5 anos, com OR (*odds ratio*) 2,54 (IC95% 1,64-3,93, p=0,0001), e ganho de SG com OR 2,87 (IC 95% 2,02-4,08, p= 0,00001) [106]. Desta forma, a adição de anti-CD20 tem sido recomendada como padrão no tratamento de LPSNC.

O benefício da adição de rituximabe a HD-MTX associado a um agente alquilante também foi avaliado em estudos clínicos. Num estudo de fase 2 com 52 pacientes expostos à indução com rituximabe, MTX, procarbazina e vincristina seguida de consolidação com WBRT em dose baixa, constatou-se a taxa de resposta de 79% e SLP 2 anos 57% [97]. Num estudo com 33 pacientes maiores de 65 anos submetidos à indução com rituximabe, MTX, procarbazina e vincristina seguida de consolidação com ASCT, obteve-se RG 94% e SLP 2 anos 79% [107]. Em outro estudo com 44 pacientes tratados com HD-MTX 8g/m$^2$ (D1), rituximabe 375mg/m$^2$ (D3) e temozolamida 150mg/m$^2$ (D7 a D11) seguida de consolidação com etoposídeo 5mg/kg em infusão contínua por 96 horas e citarabina a 2g/m$^2$ a cada 12 horas por 8 doses, obteve-se RG 77%, RC 68% e SLP 4 anos, semelhante aos resultados obtidos com esquemas que incluem WBRT [23]. Num estudo com 53 pacientes com população predominantemente idosa (62% acima de 60 anos), avaliou-se a terapia de indução com rituximabe, MTX e temozolamida seguida de consolidação com WBRT hiperfracionado e temozolamida de manutenção, obtendo-se RG 57% e SLP 64% [108].

Num estudo de fase 2 (IELSG32), 219 pacientes LPSNC virgens de tratamento foram randomizados (1:1:1) para terapia de indução em três braços: braço A (MTX 3,5g/m$^2$ d1, araC 2g/m$^2$ d2-3, a cada 3 semanas), braço B (rituximabe 375mg/m$^2$ d5, MTX 3,5g/m$^2$ d1, araC 2g/m$^2$ d2-3, a cada 3

semanas) e braço C (rituximabe 375mg/m$^2$ d5, MTX 3,5g/m$^2$ d1, araC 2g/m$^2$ d2-3, tiotepa 30mg/m$^2$ d4 a cada 3 semanas) seguido de consolidação de acordo com a resposta clínica com radioterapia 36 Gy mais *boost* (reforço) de 9Gy ou BCNU 400mg/m2 d1, tiotepa 5mg/kg d2-3 mais ASCT em caso de RC ou resposta parcial (RP) ou doença estável (DE); e em caso de PD, radioterapia com 40Gy mais *boost* (reforço) de 9Gy. A mediana de *follow-up* foi de 40 meses (24-76). Em termos de SLP, A x B (RC 0,68, IC95% 0,45-1,02, p=0,06), A x C (RC 0,66, IC95% 0,53-0,81, p=0,0001) e B x C (RC 0,63, IC95% 0,40-0,99, p=0,04). Em termos de SG, A x B (RC=0,73, IC95% 0,48-1,11, p=0,14), A x C (RC=0,65, IC95% 0,52-0,83, p=0,0004) e B x C (RC 0,57, IC95% 0,35-0,93, p=0,02). Tais dados sugerem o benefício da adição de rituximabe ao tratamento oncológico [73].

Estudo prospectivo randomizado comparou MTX e temozolamida (braço A) *versus* MTX, procarbazina, vincristina e citarabina (braço B) em pacientes maiores de 60 anos com LPSNC virgens de tratamento. Braço B *versus* Braço A teve SLP de 9,5 meses (IC95% 5,3-13,8) *versus* 6,1 meses (IC95% 3,8-11,9), SG de 31 meses (IC95% 12,2-35,8 meses) *versus* 14 meses (IC95% 8,1-28,4 meses) e RG de 82% *versus* 71% (p=0,023), respectivamente, o que favorece o segundo esquema [109].

O estudo Alliance/CALGB 50202 avaliou 44 pacientes expostos à quimioterapia não mieloablativa com MTX, rituximabe e temozolamida por 8 ciclos, seguida de consolidação com araC e infusão contínua de etoposídeo em 96 horas. Com mediana de seguimento de 4,9 anos, a SLP foi maior que 2 anos e a SG, superior a 5 anos, sem neurotoxicidade [23].

### 2.4.4 Quimioterapia intraventricular

Quimioterapia intratecal via reservatório de Ommaya aumenta a concentração com maior duração no LCR em relação à quimioterapia intravenosa, pois a barreira hematoencefálica não interferiria na penetração das macromoléculas no LCR. Quimioterapia intraventricular com rituximabe e MTX em LPSNC apresentou TR 75% [110], porém análises retrospectivas não demonstraram benefício da adição de quimioterapia intratecal à HD-MTX, além

de maior risco de infecção e meningite [111-113].

### 2.4.5 Terapia de manutenção com agente quimioterápico

Lenalidomida possui atividade em LPSNC tanto como agente único como combinado a outros quimioterápicos. Manutenção com lenalidomida aumentou a SLP, com perfil de toxicidade aceitável em pacientes com recaída de LPSNC [114]. Estudos de fase 2 demonstraram perfil de segurança e atividade da lenalidomida aceitável em LPSNC. Manutenção com lenalidomida na dose de 5mg a 10mg após terapia de resgate foi associada à resposta durável em 5 de 10 pacientes com LPSNC. Foram detectados níveis terapêuticos de lenalidomida no LCR por 2 a 15 horas após uma dose 20mg [115].

### 2.4.6 Transplante de Medula Óssea Autólogo (ASCT)

Consolidação com HD-ASCT após quimioterapia parece aumentar a SG e SLP [116] devido à penetração no SNC [116,117], porém outros estudos sugerem que regimes de consolidação com ASCT estão associados à piora da função cognitiva [92].

Num estudo de fase 2, uma população de 79 pacientes LPSNC virgens de tratamento foi submetida à indução com HD-MTX, citarabina, rituximabe e tiotepa, seguida de condicionamento pré-HD-ASCT com carmustina e tiotepa, obtendo TR 91%, SG 2 anos 87%. O tratamento foi considerado tolerável, pois, durante a fase de indução, 47% dos pacientes tiveram anemia grau 3, e 63%, trombocitopenia grau 4. Durante a fase de HD-ASCT, 50% apresentaram febre grau 3, e 93%, leucopenia grau 4, de acordo com o CTCAE v4.0 (*Common Terminology Criteria for Adverse Events*) [118].

O estudo randomizado PRECIS, em andamento, com 140 pacientes está comparando radioterapia (40Gy) ou ThBuCTX/ASCT como regime de consolidação após indução com R-MBVP-AraC. Dados preliminares demonstraram que ambas RT e ASCT foram associadas a SLP em 2 anos de 63% e 86%, SG 2 anos de 64% e 65% nas coortes da RT e HD-ASCT, respectivamente [115].

### 2.4.7 Tratamento de resgate

Apesar da alta taxa de resposta inicial, a maioria dos pacientes apresenta PD em algum momento após tratamento inicial baseado em HD-MTX. O emprego de HD-MTX após PD pode ser efetivo, principalmente em pacientes que tiveram resposta prévia a este agente. Num estudo retrospectivo com 22 pacientes com recaída retratados com HD-MTX, obteve-se RG de 91% na primeira recaída e de 100% na segunda recaída [119]. Num estudo de fase 2 com 27 pacientes avaliados, o tratamento em segunda linha com citarabina e etoposídeo seguido de ASCT com condicionamento baseado em tiotepa, busulfan e ciclofosfamida apresentou RC de 90%, com SLP 41,1 meses e SG 58,6 meses [120]. A WBRT pode ser utilizada como terapia de resgate, com RG de até 74% e SG 10,6 meses num estudo com 27 pacientes [121].

### 2.4.8 Estudos de Pesquisa Clínica Fase 1/2 em pacientes com LPSNC recidivadas

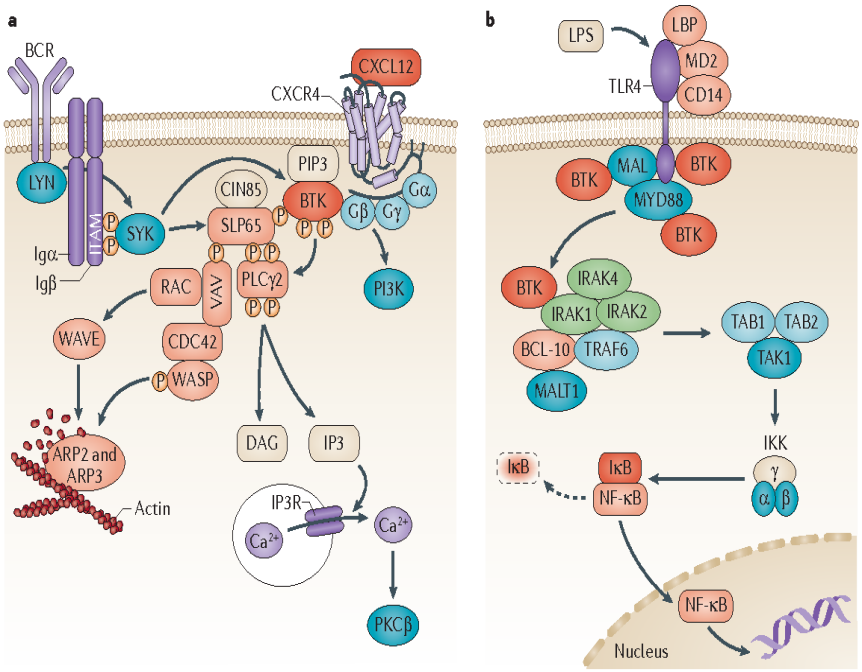
#### 2.4.8.1 *Ibrutinib*

Ibrutinib é um inibidor oral do *Bruton tirosina kinase* (BTK), o qual reduz a proliferação celular e induz apoptose. Além disso, potencializa a resposta da célula B via mecanismo independente da BTK [78,122]. Como pacientes com LPSNC podem ter alta taxa de mutação do receptor da célula B (BCR) e da via do MYD88, há plausibilidade biológica no uso de ibrutinibe em LPSNC. Estudo de fase 1 com 13 pacientes com LPSNC refratários demonstrou penetração suficiente do Ibrutinib em SNC, sendo bem tolerado em doses de 560mg e 840mg, com Resposta Global de 75% e SLP de 4,6 meses. Apenas um paciente teve aspergilose pulmonar e resistência ao ibrutinibe associada à mutação CARD11 (R179Q), CD79B e/ou A20 (TNFAIP3) [123,124].

Ibrutinib é um antagonista *in vitro* ao efeito dos agentes antifolatos em linhagem celular de LDGCB sistêmico ABC, por isso os estudos de fase 1/2 não associam ibrutinibe a metotrexato. Ele parece atuar como sensibilizador à quimioterapia e confere resposta superior à do HD-MTX. Estudo de fase 1 com

o esquema TEDDi-R (Temozolamida, Etoposídeo, Doxorubicina Lipossomal, Dexametasona, Ibrutinib, rituximabe incluindo ibrutinibe monoterapia durante 2 semanas) em pacientes virgens de tratamento e com recaída teve RG de 94% e RC 86%, porém com alta toxicidade: 94% de neutropenia grau 4 e 39% de aspergilose invasiva pulmonar ou cerebral, com mortalidade de 28%; bastante alta se comparada à taxa de mortalidade de 2-10% em pacientes tratados com quimioterapia baseada em HD-MTX [124,125].

Ratos *knocked-out* para BTK ($BTK^{-/-}$) inoculados com aspergilos apresentaram maior mortalidade quando comparados a ratos $BTK^{+/+}$. Isso demonstra o papel do BTK na imunidade a esta infecção [125]. A resposta das células mieloides aos esporos fúngicos depende de sinalização via BTK para induzir expressão de TNF-alfa e o recrutamento de neutrófilo [124]. A Figura 2 ilustra a sinalização celular via BTK.




FONTE: Hendriks *et al.*, 2014 [126]

**Figura 2 -** Sinalização celular via BTK [126]. A ativação do Receptor de Célula B (BCR) leva à sinalização intracelular e à formação de *micro-signalosome,* que é composto de VAK, PI3K, BTK, SLP65 e phsopholipase PLCy2. BTK é o principal responsável pela ativação de PLCy2, levando a influxo de Cálcio e ativação de receptores de fatores nucleares de transcripção de células T ativadas (NFAT) e NF-kB, além da ativação de ERF1 e ERF2. A ativação de BTK também leva à ativação da proteína da síndrome de Wiskott-Aldrich (AWASP), o que induz a mudança no citoesqueleto associada à ativação de BCR. AKT é ativado também pelo PI3K, que fosforila fatores de transcrição FOXO, inativando-os. AKT também bloqueia proteínas apoptóticas, como BH3, BAD, liberando o BCL-X L e estabilizando o MCL1

### 2.4.8.2 *Temsirolimus*

Temsirolimus é um inibidor do mTOR, importante na via do PI3-K/AKT/mTOR e em várias vias de sinalização *pro-survival*, pois regula a síntese proteica e o crescimento celular. Num estudos de fase 1/2 em pacientes com LPSNC recidivados, a monoterapia com temsirolimus obteve RG 54%, SLP 2,1 meses, porém com mortalidade de 13,5% (principalmente pneumonia) [127].

2.4.8.3 *Imunoterapia*

Imunoterapia pode ter um papel promissor no futuro do tratamento do LPSNC. Células T e macrófagos ativados levam à resposta inflamatória local e podem estar associados a melhor prognóstico. Isso sugere que a potencialização do sistema imune mediado por células T pode ser efetiva [55]. É frequente o ganho do número de cópias do 9p24,1/*PD-L1 e PD-L2* (*programmed death ligands* 1 e 2) e o aumento de expressão de proteínas PDCD1, PD-L1 e PD-L2 em LPSNC. Nivolumabe é um anticorpo humano IgG4 cujo alvo é a proteína PDCD1, o qual impede a ligação do PD-L1 presente no LPSNC com o PDCD1 do linfócito. Estudo de fase 1 (LPSNC refratários ou com recidiva) avaliou monoterapia com nivolumabe em quatro pacientes. Em seguimento de 13 meses, todos os pacientes obtiveram RC em 2 meses [33]. Estudo de fase 2 com Nivolumabe em LPSNC recidivados encontra-se em andamento.

2.4.8.4 *Lenalidomida*

Lenalidomida é um agente imunomodulador oral com efeito tumoral pleotrópico que inclui estimulação de célula T e expansão de células NK. Ele possui ação antagonista ao IRF4 e MYC, com efeito pró-sobrevivência [128,129]. Num estudo de fase 1, 14 pacientes com recaída foram expostos a lenalidomida EV e rituximabe endovenoso e intraventricular, com RG de 64% e SLP mediana 6 meses, sem mortalidade relacionada ao tratamento, sendo recomendada dose de 15mg/dia [130]. Num estudo retrospectivo com 8 pacientes com LPSNC R/R com última linha de resgate incluindo MTX, rituximabe, radioterapia ou ressecção subtotal, a manutenção com lenalidomida na dose de 5 a 10mg/d) evidenciou alta RG. Cinco pacientes obtiveram RC em até 2 anos após início de tratamento. Desta forma, sugeriu-se que a manutenção com lenalidomida poderia ser uma opção para terapia de resgate [130]. Estudo de fase 2 com lenalidomida e rituximabe em pacientes com recaída teve taxa de resposta de 63% e SLP 8,9 meses (ASH2016). O Quadro 2 demonstra alguns estudos de fase 1/2 em andamento.

| Molécula | Desenho | Taxa de resposta | SLP | Comentários |
|---|---|---|---|---|
| Ibrutinib | fase 1 MSKCC em recaída LPSNC | 75% | 4,6 meses | um caso de aspergilose pulmonar, resistência ao ibrutinib com mutação CARD11 |
| Ibrutinib | fase 2 em recaída LPSNC e linfoma intraocular | 56% | | um caso de aspergilose pulmonar, análise final pendente |
| DA-TEDDi-R com monoterapia com ibrutinibe | fase 1 em pacientes com recaída LPSNC | 94% ibrutinib, 84% RC com TEDDiR | | 39% taxa de aspergilose invasiva nos pulmões e cérebro, mortalidade relacionada ao tratamento em 28% |
| Temsirolimus | fase 1/2 em recaída LPSNC | 54% | 2,1 meses | mortalidade relacionada ao tratamento: 13,5% |
| Nivolumabe | fase 2 em recaída LPSNC, linfoma testicular | | | em andamento |
| Lenalidomida/ rituximab | fase 1 em recaída LPSNC | 64% | 6 meses | coorte retrospectiva: aumento em 12 vezes da duração de resposta com manutenção de lenalidomida |
| Lenalidomida/ rituximab | fase 2 em recaída LPSNC | 63% | 8,9 meses | análise final pendente |
| Pomalidomida/ dexametasona | fase 1 em recaída LPSNC ou recaída linfoma intraocular | | | em andamento |

**Quadro 2 -** Estudos de fase 1 e fase 2 em andamento

## 2.5 Fisiopatologia molecular do LPSNC

A fisiopatologia molecular do LPSNC ainda não se encontra completamente definida. Porém o avanço das técnicas de biologia molecular, em especial o sequenciamento de todo o exoma, a hibridização genômica comparativa e a análise de perfil de transcrição, do microambiente tumoral e de perfil de expressão gênica têm permitido a identificação de genes alvo envolvidos na sua patogênese [24,131,132].

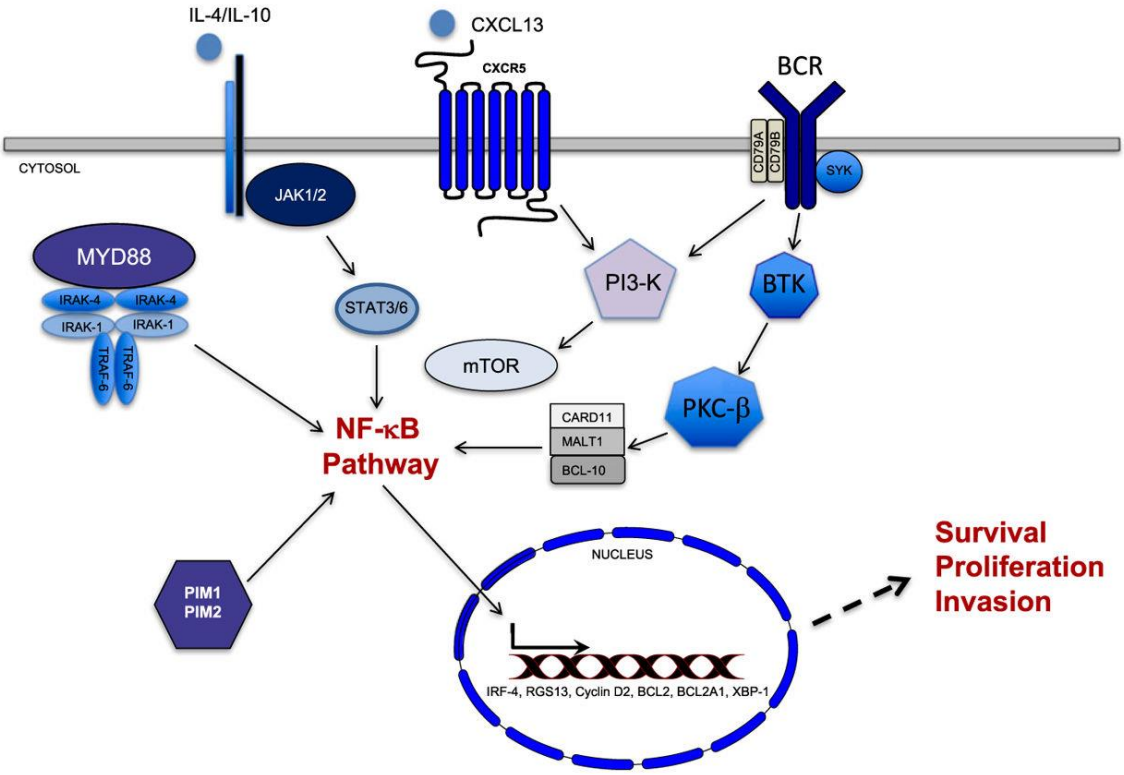
EBV não está associado à fisiopatologia do LPSNC em pacientes imunocompetentes. Num estudo com 70 pacientes imunocompetentes, a hibridização *in situ* para EBV foi negativa em todas as biópsias [53].

A ativação da via NFkB parece estar diretamente associada à patogênese do LPSNC. Esta via atua de modo a facilitar a transcrição de genes associados à sobrevida, proliferação e invasão celular, como *IRF-4, RSGS13, Ciclina D2, BCL2, BCL2A1* e *XBP-1* (Figura 3). A ativação crônica da via do BCR, principalmente decorrente de mutações do *MYD88/IRAK* e do *B-cell antigen receptor-associated protein cluster of differentiation* (CD79B), coopera para ativar a via NFkB [24,34]. Num estudo com 30 pacientes, mutações no CD79b foram associadas à melhor SLP em até 2 anos [133]. A Figura 3 - ilustra a via no NFkB.

MYD88 é uma proteína adaptadora usada pela maioria dos receptores do tipo Toll-like e do receptor da Interleucina-1 (IL1) para ativar a via NFkB por meio do receptor associado à kinase IL1 (IRAKs). Mutações no domínio citosólico do MYD88 por substituição de leucina por prolina na posição 265-L265P ocorrem em 55% dos pacientes com LPSNC [131]. Mutações do *MYD88* L265P promovem desenvolvimento de LDGCB em ratos [134]. Estas mutações também são frequentes no linfoma ocular [135]. Interessantemente, mutações no *MYD88* e *CD79B* são raras no LDGCB sistêmico com envolvimento de SNC, o que sugere patogênese molecular distinta entre as duas doenças [136]. Num estudo com 80 pacientes com LPSNC, mutações no *MYD88* foram associadas a melhor prognóstico [77]. No LDGCB sistêmico ABC, mutações do gene *MYD88* são menos frequentes, com ocorrência em 39% dos casos [131]., A mutação concomitante de *MYD88* L265P e *CD79B* ITAM foi encontrada em 37% do

LPSNC e em apenas 10% no LDGCB sistêmico do subtipo ABC [125].

Mutações no ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) associado ao BCR/CD79B ocorrem em 40% do LPSNC, e em 20% no LDGCB sistêmico do subtipo ABC [131]. Mutações no *CARD11* também podem ativar a via NFkB, sendo encontradas em 16% do LPSNC. Por outro lado, o TNFAIP3 (A20) é um regulador negativo do NFkB, e mutações somáticas neste linfoma estão presentes em 3% a 15% dos casos [137].




FONTE: Rubenstein, 2017 [24]

**Figura 3 -** Via do NFkB- A ativação transcripcional do NFkB é regulada por múltiplos sinais no LPSNC, incluindo o complexo MYD88/IRAK e o complexo BCR, constituído pelo CD79A e B. A ativação das kinases IRAK via mutação oncogênica do MYD88 e L265P ocorre em aproximadamente 555 do LPSNC. Ativação crônica da via de sinalização do BCR envolvendo o BTK interage com a via do MYD88/IRAK na ativação do NFkB. Sinalização via PIM kinases, PI3K/mTOR, JAK/STAT também estimula a sobrevida celular. Genes alvos do NFkB (incluindo *IRF-4, BCL2, ciclina D2, RGS-13, XPB-1*) também potencializam a sobrevida, a proliferação e a invasão.

Pesquisa do número de cópias de DNA por sequenciamento de todo o exoma evidenciou ativação da via do NFkB, com mutações genômicas

significativas no cromossomo 6q. Além disso, observou-se deleção do 6q21-23 em 40% a 60% dos LPSNC, associado a pior prognóstico. Prováveis genes envolvidos nesta deleção incluem o A20 (*TNFAIP3*), um regulador de diferenciação da célula B, *PRDM1* e uma tirosina fosfatase, *PTPRK* [131,138]. Sequenciamento de todo o genoma e estudos de hibridização demonstraram redução do número de cópias no 9p21.3 em até 80% dos casos. Esta anormalidade foi associada a alterações do regulador de ciclo celular CDKN2A [34]. Identificou-se também que maior número de cópias da protease inativadora de *TNFAIP3* e *MALT1* promove ativação da via do NFkB [138]

Estudos de PEG concluíram que o LPSNC é uma entidade heterogênea, com espectro de ABC associada à ativação da via NFkB e GCB. [41,53]. A expressão de BCL2 não relacionada à t(14;18)(q32;q21) é frequente [13,37]. Há evidência de hipermutação somática, rearranjos e mutações de genes de Ig e preservação de sitios *open reading frame* sugestivas de passagem pelo centro germinativo, assim como presença de morfologia do tipo centroblástica e ausência de correlação com EBV [14,37,39]. Assim como o LDGCB sistêmico, o LPSNC pode apresentar translocações envolvendo o gene *BCL6*, deleções 6q, hipermutação somática em proto-oncogenes, tais como *MYC* e *PAX5,* e inativação do *CDKN2A*. Porém, diferentemente do linfoma sistêmico, o PEG demonstrou que o LPSNC é caracterizado por expressão gênica de genes relacionados à adesão à matriz extracelular, como *MUM1, CXCL13* e *CHI3L1*. Hipermutação somática de segmentos do gene da cadeia pesada de Ig ($IgV_H$) sugere presença de proliferação celular dependente de antígeno. Consequentemente a patogênese tumoral depende da ativação de células B circulantes de maneira dependente de antígenos, as quais migram e colonizam o SNC devido à expressão de genes relacionados à adesão celular e à matriz extracelular. Contudo, os mecanismos responsáveis pelo tropismo pelo SNC ainda não são conhecidos [54,131,139].

Outros genes possivelmente associados à patogênese do LPSNC incluem *JAK-1* e kinase PIM [132]. PIM1 parece cooperar com MYC na linfomagênese, sendo frequentemente hipermutado no LPSNC [124]. A ativação do PIM kinases, das vias PI3K/mTOR e de JAK/STAT favorecem a sobrevida celular. Podem estar hiper-reguladas tanto em nível transcricional como

proteico no LPSNC [24,132].

### 2.5.1 Genes selecionados para o estudo

#### 2.5.1.1 *Gene MYC (Fator de Transcrição bHNH)*

O gene *MYC*, conhecido como Fator de Transcrição bHLH, está localizado no cromossomo 8q24,21. A proteína codificada por esse gene atua como proto-oncogene. Trata-se de uma fosfoproteína nuclear com função na proliferação celular, apoptose, crescimento celular, atividade da telomerase, metabolismo energético por meio da biogênese ribossomal e diferenciação celular, conhecido como padrão de assinatura do MYC [27,35,140,141]. A proteína MYC forma um heterodímero com o fator de transcrição MAX, o qual se liga a uma sequência *E box* de DNA, regulando a transcrição de vários genes. Sua hiperexpressão está associada a vários tipos tumorais. A t(8;14)(q24;q32) promove a fusão do gene *MYC* e a porção promotora do gene da IgVh está associada ao linfoma de Burkitt [140,142].

Rearranjos envolvendo o gene *MYC* ocorrem em 10%-15% dos LDGCB sistêmicos, estando associados a pior prognóstico independentemente do tipo do gene parceiro envolvido [143,144]. Rubenstein demostrou maior expressão mRNA MYC em LPSNC comparado com LNHDGCB sistêmico através de PEG e RT-PCR [145]. A ativação da via NFkB pode de forma alternativa desregular a expressão do *MYC* [146,147].

A expressão de *MYC* é desregulada em tumores por diversos mecanismos, como translocação cromossômica, mutações, reprogramação epigenética, aumento de estabilidade proteica e translação aumentada, entre outros [148-150]. Mutações hipersomáticas aberrantes do proto-oncogene *MYC* também têm sido observadas em estudos de expressão gênica com LPSNC[34,131]. PIM1, que interage com o MYC na linfomagênese, também é frequentemente identificado como um alvo de hipermutação somática aberrante no LPSNC, o que demonstra possível papel da ativação do MYC no LPSNC [138]. Hiperregulação de microRNAs (miRNAs) associados com a via do MYC também foi demonstrada em LPSNC [123].

No estudo CALCG 50202, evidenciou-se hiperexpressão de *MYC, PIM-1* e genes induzidos por IL-4, como *XBP1* em LPSNC [23]. Superregulação dos microRNAs miR-17-5-p, miR-20a, miR-9 que estão associados à hiperexpressão de *MYC* também foi encontrada no LPSNC [151].

Num estudo com 75 pacientes LPSNC HIV negativos, a prevalência de del(6)(q22) e de translocação dos genes *BCL6, IGH* e *MYC* foi de 45%, 17%, 13% e 3%, respectivamente. A presença de del(6)(q22) e/ou translocação de *BCL6* foi associada à pior SG (p=0,0097), independentemente de acometimento cerebral profundo ou uso de HD-MTX [69].

2.5.1.2 *Gene BCL2 (B-cell lymphoma 2)*

*BCL2* é um gene localizado no cromossoma 18q21,33 que codifica uma proteína antiapoptótica de mesmo nome. Encontra-se expresso na maioria dos tecidos, mas não no CG, onde sua transcrição é suprimida pelo gene *BCL6* [35]. A translocação de *BCL2* para o *lócus* da IgVh na t(14;18) produz ativação constitucional de *BCL2*, favorecendo a formação de clones de linfócitos de longa sobrevida suscetíveis a defeitos moleculares adicionais. Esta anormalidade favorece a tumorigênese no linfoma folicular principalmente quando associado à desregulação do *MYC* [35,148,152]. A t(14;18) está presente em 10% a 40% do LDGCB [153,154]. A hiperexpressão de *BCL2* está associada a maior número de cópias do 18q21,33 [34]. A proteína codificada usualmente está ausente ou expressa em baixos níveis no CG dos folículos secundários [9,155].

Em linfócitos B de murinos com mutação MYD88 L265P, observa-se ativação da via NFkB e hiperproliferação celular. Entretanto, a expressão de *BCL2* é necessária para sustentar a sinalização dependente do MYD88 L265P[156,157].

Na era pré-rituximabe, a hiperexpressão do gene *BCL2* foi associada a pior prognóstico no LDGCB sistêmico [154,158]. Na era pós-rituximabe, sua hiperexpressão deixou de ter impacto prognóstico na SG no LDGCB [159-161]. O rituximabe melhorou a SLP em pacientes BCL2-positivos (56% versus 25%, p=0,0001) e BCL2 negativos (59% versus 33%, p=0,02). Rituximabe também melhorou a SG nos pacientes BCL2 positivos (56% versus 42%, p=0,01) e

BCL2 negativos (58% versus 52%, p=06) [159]. Este imunoterápico induz apoptose por diversas vias de sinalização intracelular, incluindo a via do gene *BCL2* e do *B-cell lymphoma extra large* (BCL-xL). Também induz regulação reacional de IL-10 e fosforilação da via do transdutor de sinal de ativador de transcrição 3 (STAT3). Em outro estudo, a hiperexpressão de BCL2 não foi associada à pior SG, independente da célula de origem [160,162].

2.5.1.3 *Gene LMO2 (LIM domain only 2)*

O gene LIM domínio único 2, conhecido como Rombotina 2 ou *Transparent Testa Glabra* está localizado no cromossomo 11p13 [163]. Codifica uma proteína rica em cisteína altamente conservada, com dois domínios-LIM, e um domínio curto amino-terminal com atividade de transativação e de transcrição; com papel crucial na hematopoese, estando geralmente hiperconservado [148] [164]. Está expressa normalmente em células do centro germinativo, nas células precursoras hematopoiéticas e atuam no desenvolvimento do timo e na angiogênese [163,165,166]. Apresenta papel importante na leucemia linfoblástica T, sendo encontrada em tumores derivados de células do CG como LF, e LDGCB. Pode auxiliar na diferenciação entre LF e outros linfomas de células B pequenas [164] e de tumores sólidos, como câncer de próstata [167].

LMO2 regula a expressão gênica pela formação de complexos ligantes no DNA, como LDB1, E2A, HEB, Lyl1, ETO2, and SP1. Sua hiperexpressão em LDGCB sistêmico está associada ao maior número de centrômeros, podendo levar à separação cromossômica incorreta, contribuindo para a oncogênese. Além disso, pode interferir na expressão de transcriptoma composto de 311 genes de modo a contribuir para a hiperexpressão ou hipoexpressão de outros genes específicos [28]. Em LDGCB, a ausência de expressão do LMO2 está associada à presença de translocações do MYC [168].

O anticorpo anti-LMO2 foi validado para avaliar expressão do *LMO2* por IHQ. Num estudo, a expressão de LMO2 foi observada nos CG normais. No LDGCB se correlacionou com a expressão de marcadores de CG (BCL6 e CD10) e a ausência de expressão de marcadores não-CG (MUM1/IRF4 ou

BCL2) [169]. A LMO2 é uma proteína nuclear e seu ponto de corte de positividade à IHQ é de 30% [164]. Numa análise retrospectiva com 49 pacientes LPSNC, foi observada expressão proteica de LMO2, HGAL e BCL6 em 52%, 65% e 56% dos casos. A expressão de LMO2 foi associada à melhor SLP (25 x 8 meses, p=0,071) e SG (34 x 11 meses, p=0,027), e a expressão de *BCL6,* à maior SG (39 x 13 meses, p=0,055) e SLP (24 x 8 meses, p=0,006) [170].

2.5.1.4 *Gene MGMT (O-6-methilguanine-DNA-methyltransferase)*

O gene *MGMT,* localizado no cromossomo 10q26.3, codifica uma proteína reparadora de DNA envolvida na defesa celular contra mutagênese e toxicidade contra agentes alquilantes. A proteína catalisa a transferência de grupos metil da posição O-6-alquilguanina e outras metilações do DNA para sua própria molécula, reparando rupturas do DNA [171]. Em ratos *knocked-out* p53, não há transcrição desta proteína, o que sugere sua expressão dependente de p53 [172].

A proteína MGMT é uma enzima reparadora de DNA que protege a célula de agentes alquilantes ao remover grupos alkyl da posição $O^6$ da guanina [173]. Sua ausência à IHQ, utilizando ponto de corte de 5% a 15%, foi correlacionada com metilação da região promotora do gene *MGMT* [174,175]. Esta hipermetilação mostrou-se um biomarcador de bom prognóstico em LDGCB e glioblastoma multiforme e câncer de mama tratados com agentes alquilantes[29,176].

Num estudo com 24 pacientes com LPSNC, a metilação do *MGMT* e a ausência de expressão proteica estavam presentes em 54% dos casos, sendo que a metilação de *MGMT* tinha alta correlação com a perda de expressão proteica (ponto de corte da IHQ: 10%) possivelmente devido à maior homogeneidade celular do LPSNC (coeficiente de correlação= -0,49; Teste Exato de Fischer: p<0,01). Neste estudo, a hipermetilação da região promotora parece estar associada à maior taxa de SG e ocorre principalmente em pacientes maiores que 60 anos de idade [29].

2.5.1.5 *Gene POU2F1 (POU class 2 homeobox 1)*

O gene *POU2F1*, conhecido como OCT1 e localizado no cromossomo 1q24,2, codifica uma proteína com função de fator de transcrição da superfamília POU. Além de membro de proteínas transmembrana superfamília carreadora de solutos, é responsável pelo transporte e captação de nutrientes, metabólitos, drogas e toxinas. Os membros desta superfamília contêm uma região de 160 aminoácidos pela qual se ligam ao DNA em outra região específica com sequência de oito bases nitrogenadas ATGCAAAT [177,178]. Esse gene atua na diferenciação e proliferação das células B, e a hiperexpressão de OCT1 está associada à maior sobrevida celular em linfomas com t(14, 18) [176]. A expressão de *OCT1* está elevada em linhagem celular de linfoma e aumentou a suscetibilidade tumoral aos agentes quimioterápicos irinotecano e paclitaxel, possivelmente por facilitar o transporte dos antineoplásicos do meio extracelular para o meio intracelular [30]. Porém, estudos com tumores com linhagem epitelial demonstraram que a hiperexpressão de OCT1 se associou a pior prognóstico [179].

POU2F1 é necessário para transformação oncogênica e promoção de linfoma em modelos de ratos *knocked-out* para Tp53 [180]. A ablação de POU2F1 está associada com metabolismo oxidativo, elevação de expressão de ROS, aumento de sensibilidade a estresse oxidativo e genotóxico e diminuição de iniciação tumoral em modelos xenográficos [180].

2.5.1.6 *Gene PDCD1 (Programmed cell death-1)*

O gene *PDCD1*, conhecido como *PD1* e localizado no cromossomo 2q37.3, codifica uma proteína de superfície de membrana celular da superfamília das Ig [181]. Outros membros da família CD28 incluem o antígeno associado a linfócito citotóxico T (CTLA-4) e coestimulador induzível ICOS com papel na resposta celular imune. *PD1* é pouco expresso em células B [182,183]. Sua proteína geralmente é expressa em células do CG e atua como um ponto de checagem em linfócitos e na diferenciação celular. Hiperexpressão de PD1 foi considerada fator de prognóstico positivo em pacientes com LF [184]. O gene

é expresso em célula pró-B com papel na diferenciação celular, bem como em várias células imunes, como células T [75,148].

Foi identificado ganho do número de cópias do 9p24,1/*PD-L1/PD-L2* em pacientes com LPSNC, com concomitante hiperexpressão das proteinas PD-L1/PD-L2 [34]. Esta hiperexpressão funciona como mecanismo de escape das células neoplásicas do sistema imune, sendo um possível alvo terapêutico [34]. Num estudo com 24 pacientes, 13% (3/24) apresentaram translocação envolvendo o *PD-1* [34,185].

Alteração do número de cópias de *PD-L1* e *PD-L2* está associada a aumento de expressão de PD-L1 e PD-L2 no LPSNC. Estas proteínas interagem com o receptor PD1 presente nas células T, ativando a sinalização celular via PD1. Em consequência, há diminuição da ativação do receptor da célula T (TCR), proliferação e sobrevida de fatores de transcrição, o que causa redução da resposta imune antitumoral [34].

A presença de TIL com imunoexpressão de PDCD1 está diretamente relacionada à imunoexpressão de PDL1 na célula tumoral em vários tumores, inclusive LPSNC [75,186]. A hiperregulação de PDCD1 é consequência de exaustão imune e é um marcador de célula T disfuncional, o que facilita a tumorigênese [75]. A hipexpressão de PDL1 é considerada um marcador de alta resposta imune antitumoral, sendo consequência à infiltração tumoral de células T. [187]. O bloqueio da via mediada pelo PDCD1 leva à reversão do fenótipo da *exhausted T-cell* e à normalização da resposta antitumoral, sendo um racional para o tratamento com imunoterapia contra o câncer [188-190].

No LPSNC, o ganho do número de cópias do 9p24.1/*PDL1/PDL2* está associado ao aumento da expressão proteica do PDL1/PDL2, atuando como um mecanismo de escape imune. Isso sugere que drogas anti-PDCD1 poderiam ter um papel no tratamento [34]. A imunoexpressão de PDCD1 está associada à pior SG [75].

#### 2.5.1.7 *Gene BCL6 (B-cell lymphoma 6)*

O gene *BCL6,* localizado no cromossomo 3q27,3, codifica uma proteína fator transcrição *zinc finger* com um domínio N-terminal POZ. Esse gene atua

como um repressor de transcrição de sequência específica e modula a transcrição de células B IL4 dependente de STAT. O domínio POZ interage com outras proteínas, causando repressão tumoral. No LDGCB o gene BCL6 pode estar translocado e hipermutado o que favorece a tumorigênese [191]. Em 30 pacientes com LPSNC e grupo controle LDGCB sistêmico estudados, a expressão de BCL6 foi maior em indivíduos com LPSNC quando comparados com LDGCB sistêmico COO ABC (p=0,02). Isso sugere a importância do BCL6 no LPSNC [192].

O gene *BCL6* cofidica uma proteína repressora de transcrição de sequência específica, formando um complexo com diferentes corepressores e com histona. Assim, reprime-se a transcrição de diferentes genes alvos por meio de sua ligação direta com o DNA ou indiretamente com repressão de atividade transcricional [148 192].

Encontra-se usualmente expresso em centroblastos, na maioria dos centrócitos e em células T CD4+ do CG. Por outro lado, encontra-se inativado durante a diferenciação de centrócito para células B de memória ou plasmócitos [193,194].

O gene *BCL6* inibe o gene supressor do ciclo celular p21, inibidor da quinase dependente de ciclina, bem como o programa antiapoptótico ao suprimir a expressão de BCL2. Atua na resposta ao dano do DNA quando da regulação dos genes *p53, ATR* e *CHEK1* e impede a ativação prematura de centroblastos ao inibir os genes ativadores de linfócitos B *CD69, STAT1* (transdutor de sinal e ativador de transcrição 1) e *CD80* [35,194]. A desregulação de *BCL6* pode provocar o bloqueio da diferenciação de células pós-CG e determinar o acúmulo de células hipermutadas, o que facilita a tumorigênese[195].

A proteína repressora *transcripcional zinc-finger* é necessária para formação de CG. Sua correlação com prognóstico é contraditória em alguns estudos [41,170]. Sua hiperexpressão está associada à melhor SG em pacientes tratados com CHOP-símile [196].

Alterações cromossômicas envolvendo o gene *PRDM1* são relativamente comuns (23% a 37%), levando a bloqueio da diferenciação de células pós-CG e acúmulo de células hipermutadas, o que contribui para a

linfomagênese. A maioria das translocações envolvendo *BCL6* no LPSNC envolvem parceiros distintos do gene da Ig, ao contrário do observado no LDGCB sistêmico [69]. Segundo Winter *et al*. [197], pacientes sem expressão de BCL6 por IHQ beneficiam-se mais da adição de rituximabe à quimioterapia (SG 42% x 76%, CHOP x R-CHOP) do que pacientes BCL6 positivo (SG 73% x 74%, CHOP x R-CHOP), provavelmente devido à supressão da via NFkB pelo rituximabe [197]. O estudo CALGB 50202 também correlacionou hiperexpressão de BCL6 à IHQ com pior SG [23]. Estudos retrospectivos, porém, correlacionaram hiperexpressão BCL6 com melhor SG [41,198].

## 2.6 Justificativa

O aumento de incidência do LPSNC, associado à alta morbi-mortalidade, justifica a maior necessidade de pesquisas clínicas e moleculares, a fim de buscar melhores opções terapêuticas e de qualidade de vida.

Trata-se de um estudo de coorte retrospectiva unicêntrico. Seu desenho foi selecionado por tratar-se de uma doença rara, objetivando a maior obtenção possível de dados clínicos e material histopatológico confiáveis. Trata-se do maior estudo disponível, por meio do qual se descrevem as características clínico-epidemiológicas de LPSNC na população brasileira, e o único que avalia expressão gênica e correlação prognóstica.

É importante a realização de pesquisas genéticas em diferentes etnias e populações. A população brasileira é considerada um modelo para estudos genéticos e fenotípicos em mistura étnicorracial e pode apresentar características genotípicas distintas de populações não miscigenadas, bem como biomarcadores distintos [199]. Estudos evidenciam diferentes expressões gênicas entre diferentes populações com mesmo tipo tumoral. Num estudo retrospectivo em LPSNC, análise de genética de DNA e RNA através de *Next Generation Sequencing,* foi realizada em 18 pacientes hispânicos e 11 pacientes brancos. Nele, evidenciou-se que a população hispânica teria frequentemente mais de 3 mutações comparada à população branca (89% x 55%, p=0.03), porém sem correlação prognóstica, com SG 2 anos de 60% e 36%, respectivamente (p=0.23) [133]. Tais dados sugerem heterogeneidade nas

mutações encontradas no LPSNC, podendo ser relacionadas à etnicidade. Num estudo com o uso do banco de dados do SEER, foi evidenciada uma diferença de incidência entre as populações idosas negra e branca, sendo maior nesta última [48].

Estudos unicêntricos são valiosos por gerarem hipóteses que podem servir de base para estudos multicêntricos e com maior população. Eles têm como vantagens menor custo, maior facilidade na coleta de dados, uma população menos heterogênea com menos fatores confundidores. No entanto, a principal desvantagem é a limitação na validação dos dados em outras populações [200].

Estudos retrospectivos permitem analisar múltiplos desfechos por um longo período, com a identificação de fatores de risco e suas associações, sendo geralmente conduzidos em doenças raras. As principais desvantagens são a ausência de uniformidade de dados entre os indivíduos, a presença de fatores confundidores que levam à dificuldade na avaliação temporal entre os fatores analisados e o desfecho observado, além da causalidade entre eles [201].

# 3 OBJETIVOS

## 3.1 Objetivo primário

Avaliar o impacto da expressão dos genes *MYC, BCL2, LMO2, MGMT, POU2F1, PDCD1* e *BCL6* em pacientes com LPSNC e suas correlações com os desfechos de SLP e SG em pacientes tratados no Serviço de Hematologia do HC-FMUSP e Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), Brasil.

## 3.2 Objetivos secundários

a) Descrever as características clínicas epidemiológicas destes pacientes de um grande centro universitário brasileiro, informação atualmente indisponível na literatura médica nacional, com objetivo de melhorar o conhecimento e a caracterização destas neoplasias em população de área geográfica adstrita.
b) Avaliar o impacto prognóstico da expressão das proteínas MYC, BCL2, LMO2, MGMT, POU2F1 e PDCD1, mensuradas semiquantitativamente por técnica de IHQ, em portadores de LPSNC, para os desfechos de SG, SLP e SLD.
c) Avaliar a correlação da expressão molecular de RNA (RT-qPCR) e a expressão proteica por meio da reação de IHQ.

## 4 CASUÍSTICAS E METODOS

O projeto foi submetido ao CAPPesq por meio da Plataforma Brasil, CAAE 48989315.0.0000.0068; Número do Parecer: 1.266.854; aprovado em 07 de outubro de 2015 e anuência do ICESP sob Registro: NP597/2015. Somente após a aprovação, foi iniciado o projeto de pesquisa. Relatórios parciais sobre o andamento do projeto foram entregues semestralmente à CAPPesq por meio da Plataforma Brasil.

A Tabela 3 descreve os custos do projeto, referentes aos itens de consumo de material básico de imuno-histoquímica, PCR e kits necessários para a realização de ensaios propostos. O custo estimado foi de R$39.040,00. O projeto foi custeado pelo Serviço de Hematologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com verbas provenientes dos projetos de pesquisa clínica patrocinada do grupo de linfoma não-Hodgkin. Os ensaios clínicos foram realizados no Laboratório de Imunopatologia, atualmente vinculado ao LIM31.

**Tabela 3 -** Orçamento detalhado

| **Material** | **Valor Total** |
|---|---|
| Anticorpos para IHQ | R$16.500,00 |
| Serviços gerais de cortes e laboratório de IHQ e lâminas salinizadas | R$2.500,00 |
| Kit extração RecoverALL Total Nucleic Acid Isolation- Ambion | R$3.040,00 |
| Kit Rneasy FFPE- Qiagen | R$3.000,00 |
| Kit cDNA applied high capacity | R$3.500,00 |
| Sonda TaqMan (5 sequências) | R$5.000,00 |
| PCR MasterMix | R$2.500,00 |
| Placa | R$1.000,00 |
| Selante | R$2.000,00 |
| TOTAL | R$39.040,00 |

## 4.1 Pacientes selecionados

Devido à raridade do LPSNC, optou-se pela pesquisa de todos os pacientes cujos materiais anátomo-patológicos estivessem disponíveis nos arquivos do HC-FMUSP e no ICESP. Apenas biópsias realizadas a partir de 01/01/1995 encontravam-se disponíveis. Foi gerada uma primeira lista de pacientes cujos diagnósticos relatavam histopatologia “linfoma” e região anatômica “acometimento em sistema nervoso central”, diagnosticados entre 01/01/1995 e 31/12/2016, para posterior confirmação de diagnóstico de LPSNC e análise dos critérios de inclusão para este estudo. O ponto de corte de coleta de dados estabelecido foi 01/12/2017 para garantir um período de seguimento mínimo de aproximadamente 12 meses e objetivar análise de SG, com base em artigos que avaliavam mortalidade de 35% neste período [19].

Trata-se de um estudo de coorte unicêntrico retrospectivo. Estudos unicêntricos são valiosos por gerarem hipóteses que podem servir de base para estudos multicêntricos e com maior população. Eles têm como vantagens menor custo, maior facilidade na coleta de dados, uma população menos heterogênea com menos fatores confundidores. No entanto, a principal desvantagem é a limitação na validação dos dados em outras populações [200].

Estudos retrospectivos permitem analisar múltiplos desfechos por um longo período com a identificação de fatores de risco e suas associações, sendo geralmente conduzidos em doenças raras. As principais desvantagens são a ausência de uniformidade de dados entre os indivíduos, a presença de fatores confundidores – o que leva à dificuldade na avaliação temporal entre os fatores analisados e o desfecho observado – e a causalidade entre eles [201].

Uma lista inicial destes pacientes foi obtida pelos Serviços de Hematologia do HC-FMUSP e do ICESP, bem como pelos Serviços de Anatomia Patológica do HC-FMUSP e do ICESP.

### 4.1.1 Critérios de inclusão

- Idade ao diagnóstico maior ou igual a 18 anos e
- LPSNC com histopatologia LNHDGCB CD20+, a qual foi revista e

confirmada prospectivamente por hematopatologista do Departamento de Patologia da FMUSP.

### 4.1.2 Critérios de exclusão

- Imunodeficiências congênitas ou adquiridas (por exemplo: infecção por HIV, pós transplante de órgão);
- Linfoma primário ocular;
- Envolvimento secundário em SNC de linfoma sistêmico;
- Sorologia positiva para o vírus HIV (com ou sem Síndrome da Imunodeficiência Adquirida);
- Desenvolvimento de outro subtipo de linfoma até a data de censura;
- História prévia ou concorrente de linfoma de células B indolente;
- Indisponibilidade de amostra tecidual;
- Prontuário médico não recuperado e
- Laudo histopatológico divergente entre o diagnóstico retrospectivo e a nova análise histopatológica retrospectiva.

Os dados clínico-epidemiológicos, laboratoriais e de imagem foram obtidos a partir da análise de prontuários médicos manuais ou informatizados, nos quais se destacaram variáveis clínicas e demográficas, como: data de nascimento; sexo; raça; data de diagnóstico; número de linhas de tratamento; datas de início e de término de tratamento; tipos de tratamento oncológico realizados; tipo de resposta clínica ao tratamento; data de obtenção de remissão, progressão e recidiva; data de óbito e da última avaliação clínica; situação atual do linfoma na data de censura; IPI modificado, estádio clínico ao diagnóstico, presença de sinais e sintomas de hipertensão intracraniana, alteração de comportamento, alteração de memória, déficit neurológico focal, localização do tumor, PS na primeira consulta no Serviço de Hematologia; PS após término de cada linha de tratamento. Dados laboratoriais histopatológicos, padrão de infiltração perivascular, proteinorraquia e glicorraquia, outros marcadores no CSF, sorologia para HIV e EBV, exames de imagem de TC e RMN, bioquímica geral e hematológica também foram coletados quando disponíveis.

Foi feito contato telefônico com pacientes e/ou familiares em casos de perda de seguimento para identificar a situação atualizada do paciente. Em pacientes cujo contato telefônico não foi possível, realizou-se prospecção ativa no site da Receita Federal pelo número do Cadastro de Pessoa Física (CPF), permitindo-se avaliar se o paciente estava registrado como vivo até o ano fiscal anterior ao da pesquisa. Quando disponível, a *causa mortis* foi coletada. A coleta dos dados clínicos foi realizada até 01 de dezembro de 2017 (data de censura de coleta).

## 4.2 Diagnóstico anatomopatológico

O diagnóstico de LPSNC foi obtido por biópsia incisional estereotáxica ou aberta do tecido acometido. O produto da biópsia foi analisado por coloração de hematoxilina-eosina (H&E) e IHQ para pesquisar os antígenos linfoides B (CD20, CD22 ou CD79a), T (CD3) e Ki67 no Serviços de Anatomia Patológica do HC/ICESP-FMUSP. Nos casos em que o paciente foi submetido a mais de um procedimento diagnóstico, foi considerada apenas a biópsia mais representativa da lesão em estudo.

As lâminas disponíveis dos casos inicialmente selecionados foram disponibilizadas para revisão central realizada por hematopatologista no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Caso necessário, lâminas extras foram confeccionadas para auxiliar no diagnóstico conforme orientações da hematopatologista.

Os critérios da OMS foram utilizados para confirmação histopatológica. As células neoplásicas foram positivas para os marcadores da linhagem B (CD20, CD22 ou CD79a) [5,36,52]. Pacientes com indisponibilidade amostral ou com diagnóstico final discordante do original foram excluídos.

Em algumas amostras, foi realizado no momento do diagnóstico inicial painel de IHQ para Linfoma B e Linfomas T, sendo analisado também IHQ anti-CD3 nas células tumorais e linfócitos reacionais infiltrativos (TIL). TIL foi analisado em campo de pequeno a médio aumento com atenção para os vasos que circundavam o tumor e para as células tumorais. A expressão de CD3 foi

analisada como variável categórica como 0% ou ≥1%.

Não foram realizadas novas reações de IHQ anti-CD3 por carência de material histopatológico.

## 4.3 Estadiamento

História e exame físico fazem parte da rotina do serviço de hematologia, assim como avaliação laboratorial com hemograma completo, contagem de reticulócitos, bioquímica, função renal, avaliação hepática, dosagem sérica de ácido úrico, DHL, β2 microglobulina, sorologia para HIV, hepatite B e C. A presença de sintomas B foi definida mediante perda de peso superior a 10% do peso corpóreo basal em período inferior a seis meses e/ou febre persistente acima de 38ºC sem caracterização de infecção e/ou sudorese noturna recorrente [202].

Os pacientes eram estadiados de acordo com a época de entrada no serviço com TC ou ressonância nuclear magnética de crânio. Para excluir doença sistêmica, realizaram-se TCs de pescoço, tórax, abdômen e pelve além de biópsia de medula óssea. Punção lombar com análise bioquímica e morfológica incluindo citologia oncótica, proteinorraquia, glicorraquia e citometria de fluxo também foram realizadas. Os dados foram coletados conforme sua disponibilidade e registrados numa tabela de coleta de dados, sendo posteriormente categorizados.

## 4.4 Tratamento

Os pacientes incluídos no estudo receberam intenção curativa com protocolo Abrey, constituído por indução com cinco ciclos de HD-MTX 3,5 g/m$^2$, procarbazine 100 mg/m$^2$/d e vincristine 1.4 mg/m$^2$ endovenoso, [203]. Ocorreram algumas variações conforme o ano de tratamento ou condições clínicas dos pacientes. O metotrexate foi administrado por via endovenosa em 3 horas, com ciclos de 21 dias. Não foi realizado ajuste da dose do metotrexate de acordo com o clearence de creatinina. Hidratação, resgate com leucovorina e prescrição de G-CSF profilático foram realizados de acordo com as rotinas do

serviço presentes à época. Pacientes que obtiveram RC receberam regime de consolidação com WBRT (30 a 40Gy em até 20 frações) ou 2 ciclos de 28 dias com citarabina em altas doses (2 g/m$^2$/12 horas D1 até D4). Pacientes com RP receberam até mais 2 ciclos de tratamento de indução conforme descrito previamente. Pacientes com doença estável ou PD foram submetidas a WBRT.

Em 2018, uma nova rotina foi discutida no Serviço de Hematologia, incluindo tratamento com Anti-CD20 (rituximab), ainda a ser implementada.

## 4.5 Avaliação de resposta

Até o ano de 2005, as definições de RC, RP, PD e DE eram estabelecidas de acordo com a interpretação do médico assistente ou radiologista. Imagens anteriores a 2005 não estavam mais disponíveis, o que impediu a reavaliação de forma retrospectiva. Os dados foram coletados conforme registrados no prontuário dos pacientes à época e dos laudos radiológicos disponíveis.

A partir de 2005, adotaram-se critérios de resposta clínica para LPSNC conforme diretriz publicada [51]. A resposta terapêutica foi determinada por critérios clínicos e imagenológicos avaliados por TC, RNM, assim como punção lombar, avaliação oftalmológica, se disponíveis. Tais dados foram coletados conforme o prontuário e laudos radiológicos disponíveis.

## 4.6 Seguimento dos pacientes

Os pacientes foram acompanhados após término do tratamento com história e exame físico, exames laboratoriais e de imagem 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 anualmente a partir do quinto ano de remissão.

## 4.7 Reações de IHQ

Todas as lâminas disponíveis e as reações de IHQ previamente realizadas pelos pacientes no Departamento de Patologia da FMUSP e HC FMUSP foram recuperadas e analisadas novamente no Departamento de Patologia da FMUSP. Para inclusão no estudo, todos os pacientes precisavam ter suas lâminas/biópsias novamente avaliadas, confirmando o diagnóstico de LPSNC, independentemente do laudo inicial. Novas lâminas e colorações poderiam ser realizadas a partir das biópsias para se poder confirmar o diagnóstico de LPSNC, caso necessário.

Reações de IHQ para as proteínas de interesse foram realizadas conforme descritos nesta Seção 4.7.2 . A padronização da técnica encontra-se no Quadro 3.

### 4.7.1 Obtenção das amostras

Os blocos correspondentes às biópsias dos pacientes foram procurados nos dos blocários do HC-FMUSP e do ICESP. Pacientes sem biópsia/bloco disponível para a realização das técnicas de IHQ e moleculares foram excluídos do estudo.

As biópsias tinham sido fixadas em formalina e incluídas em parafina. Os blocos selecionados correspondiam às lâminas utilizadas para confirmar o diagnóstico anatomopatológico de LPSNC. Todos os pacientes com diagnóstico revisto e confirmado de LPSNC com critério de inclusão foram selecionados para reações de IHQ adicionais para pesquisa das proteínas MYC, BCL2, OCT1, MGM1, LMO2 e PD1. As reações foram realizadas em cortes de 3-4 µ dos blocos de parafina no Laboratório de IHQ do Departamento de Patologia da FMUSP. Devido à escassez de material, os primeiros cortes obtidos foram separados para extração de RNA e o restante, para a IHQ. Portanto, alguns pacientes não tiveram material suficiente para realizar todas as reações de IHQ das proteínas de interesse.

As técnicas descritas da reação de IHQ encontram-se na seção 4.7.2 , conforme a rotina do Departamento de Patologia da FM-USP. Não foram

realizadas reações de IHQ para BCL6 devido à escassez do material e porque a pesquisa de expressão gênica do *BCL6* foi adicionada posteriormente ao estudo.

### 4.7.2 Técnica da reação de IHQ

A IHQ foi realizada pela técnica convencional para material fixado em formol e incluído em parafina para as proteínas relacionadas aos genes em estudo (MYC, BCL2, POU2F1, MGMT, LMO2 e PDCD1).

Utilizaram-se os Ac monoclonais anti-c-MYC (clone Y69, Abcam, Cambridge, Massachussets, EUA), anti-BCL2 (clone 124, Cell Marque, Rocklin, California, EUA), anti-LMO2 (clone SP51, Cell Marque, Rocklin, California, EUA), anti-MGMT (clone MT3,1, Abcam, Cambridge, Massachussets, EUA), anti-OCT-1 (clone AB151, Abcam, Cambridge, Massachussets, EUA) e anti-PDCD1 (clone NAT105, Abcam, Cambridge, Massachussets, EUA).

As reações de IHQ foram padronizadas por meio de diluições seriadas dos anticorpos primários e diferentes pH antes do processamento das amostras dos pacientes. Controles positivos e negativos (omissão do anticorpo primário) foram realizados para todas as amostras. O resultado da padronização encontra-se no Quadro 3.

Os cortes de biópsia de Sistema Nervoso Central de 3-4 µm de espessura foram dispostos em lâminas salinizadas (Sigma Chemical Co, St. Louis, Missouri, EUA) em suporte adequado. O processo de desparafinação foi feito por exposição das lâminas ao xilol aquecido em estufa à temperatura de 60-65ºC por 5 minutos com subsequentes lavagens rápidas em três banhos de xilol frio.

Para hidratação, as lâminas foram colocadas em dois banhos de álcool absoluto, um banho de álcool a 95ºC e outro de álcool a 70ºC. Em seguida, foram lavadas em água corrente, em água deionizada e deixadas em tampão fosfato pH 7,4. A recuperação dos sítios antigênicos foi realizada em alta temperatura em Tris-EDTA pH9. O bloqueio da peroxidase endógena das hemácias foi realizado com peróxido de hidrogênio 10v (3%). Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, água destilada e deixadas em

tampão tris-fosfato pH 7.4 (TBS). Os anticorpos foram utilizados nas concentrações conforme Quadro 3. As lâminas foram incubadas *overnight* a 4ºC em câmara úmida. Posteriormente foram incubadas com o anticorpo secundário Polímero Novolink (Leica Biosystems Newcastle, UK) por 30 minutos em estufa a 37 graus. Foi utilizado o cromógeno Diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha). Posteriormente efetuou-se a contracoloração com Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha).

As lâminas foram analisadas em microscópio convencional. A leitura das lâminas foi feita estimando-se 200 células por campo quando possível, em um total de vinte campos de 40x. Foi utilizada análise semiquantitativa por dois observadores distintos, estabelecendo-se valor de consenso para cada caso. A análise semiquantitativa foi padronizada em escala de percentual de células atípicas, positivas para as proteínas interesse em intervalos de 25% (0%-totalmente ausência-, 1 a 25%, 26% a 50%, 51% a 75%, 76% a 100%).

| **Ac Monoclonais** | **Diluição final e pH*** | **Tecido** | **Marca** | **Código** |
|---|---|---|---|---|
| MYC (rabbit Clone Y69) | 1:100 pH9 | Linfoma de Burkitt | Abcam | ab 32072 |
| BCL2 (clone 124) | 1:100 pH9 | Amígdala | Cell Marque | 226M-96 |
| LMO2 (rabbit clone SP51) | 1:50 pH9 | Amígdala | Cell Marque | 370R-16 |
| MGMT (clone MT3.1) | 1:400 pH9 | Amígdala | Abcam | ab 39253 |
| POU2F1 (rabbit Clone AB151) | 1:200 pH9 | Amígdala | Abcam | ab 15112 |
| PDCD1 (clone NAT 105) | 1:100 pH9 | Amígdala | Abcam | ab 52587 |

*do tampão de recuperação antigênica

**Quadro 3 -** Padronização dos marcadores de IHQ utilizados

## 4.8 Método molecular

### 4.8.1 Obtenção das amostras

Para este estudo, foram realizados cortes de 5 µM de espessura em micrótomos manuais disponibilizados em tubos de 1,7 mL. As lâminas do micrômetro foram higienizadas com RNAse para evitar contaminação entre os pacientes e os cortes foram realizados no Departamento de Patologia da FMUSP. A extração de RNA foi realizada em até uma semana após obtenção dos cortes.

### 4.8.2 Extração de RNA de amostras fixadas em formol e incluídas em parafina

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.

A cada tubo de 1.7 ml contendo cortes 5 µm, foi adicionado 1,5 ml do reagente xilol a 100% para a desparafinização. Os tubos foram agitados em vórtex vigorosamente por 10 segundos, incubados a 37ºC por dez minutos e centrifugados durante dois minutos a 20.000 x g em temperatura ambiente, para obtenção de botão celular.

Posteriormente, removeu-se o sobrenadante por pipetagem cuidadosa, para não remover do botão celular. Em seguida, as células foram lavadas com 1,5 ml de etanol a 100%, nova agitação em vórtex por 10 segundos, novamente centrifugação a 20.000 x g por dois minutos, em temperatura ambiente e posterior remoção do sobrenadante. Após repetição do procedimento, as células foram incubadas por dez minutos à temperatura ambiente até evaporar totalmente o etanol residual.

Em seguida, as células foram ressuspensas em 150 µL de tampão PKD® (Qiagen) adicionados 10 µL de proteinase K. A amostra foi incubada a 55ºC por quinze minutos e, após isso, a 80ºC por mais quinze minutos. Adicionaram-se 320 µL do tampão RBC (*Red Blood Cell Lysis Buffer*), para otimização de lise de hemácias numa suspensão celular única com efeito mínimo nos leucócitos.

O lisado foi homogeneizado e transferido para coluna eliminadora de gDNA e centrifugado por trinta segundos, a 8000 x g. Em seguida, descartou-se a coluna, adicionaram-se 720 µL de etanol a 100% e transferiram-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. Em seguida, adicionaram-se 500 µL do tampão RPE® (Qiagen) à coluna *MinElute ENeasy*, fechando-se delicadamente a tampa. Procedeu-se à centrifugação por quinze segundos a 8.000 x g, descartando-se o líquido. Adicionaram-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, descartando-se o líquido. Em seguida, transferiu-se a coluna *MinElute ENeasy* para novo tubo coletor de 2 ml, o qual foi centrifugado com a tampa aberta por cinco minutos, à velocidade de 20.000 x g.

Então foi descartado o tubo coletor, transferindo-se a coluna *MinElute Eneasy* para outro tubo, agora de 1,7 ml. Adicionaram-se 30 µL de água livre de RNase à coluna, centrifugando-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 -20ºC até o momento do uso.

A concentração de RNA de cada amostra foi determinada no equipamento *NanoDrop Spectrophotometer ND-1000*, e sua integridade foi analisada no *RNA Nano Chip 2100 Bioanalyzer,* da Agilent.

### 4.8.3 Preparação do cDNA

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de 1,0 µg do RNA total. A preparação foi realizada conforme orientações do fabricante *Thermo Fisher* para o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.* O cDNA foi obtido da reação contendo 1µg de RNA total, 0,8 µL de 25X dNTP Mix (100 mM), 2,0 µL de RT Buffer (10 X tampão de reação), 2 µL de RT Randon Primers (10X), 1 µL *MultiScribe Reverse Transcriptase* (transcriptase reversa) e $H_2O$ tratada com dietilpirocarbonato (DPEC), com a obtenção do volume final de 20 µL. As amostras foram submetidas às temperaturas de 25ºC por dez minutos, 37ºC por 120 minutos e 85ºC por cinco minutos no termociclador *Veriti*

*Thermo Cycler* da *Thermo Fisher* para obtenção do cDNA. Em seguida, foram adicionados 180 µL de $H_2O$ tratada com DPEC.

### 4.8.4 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

A RT-qPCR foi realizada para os genes *MYC* (Hs 202453, ref.158378085), *BCL2* (Hs 0060823, ref. 158378081), *LMO2* (Hs 00277106, ref. 158378089), *MGMT* (Hs 501522, ref. 158378073), *POU2F1* (Hs 283402, ref. 158378077), *PDCD1* (Hs 158297, ref. 158378093) e *BCL6* (Hs 478588, ref. 19673829) – todos da *IDT technologies* (Coralville, Iowa, EUA). Como controle endógeno, foram utilizados os genes *GUSB* (*Catalog number*: 4310888E), *GAPDH* (*Catalog number*: 4352934E) e *RPLPO* (*Catalog number*: 4326314E) da *Applied Biosystems* (Foster City, CA, EUA). Foi utilizado o *TaqMan Universal PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA) e sua análise foi 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]). O Ct é o ponto de referência no qual a elevação do sinal fluorescente corresponde ao crescimento exponencial dos produtos da PCR[204]. As curvas de eficiência e quantificação gênica foram obtidas a partir de diluições seriadas.

A quantificação relativa baseou-se na construção de curva padrão a partir de quantidades conhecidas do cDNA do gene de interesse, diluídos dez vezes em triplicata com objetivo de obter quatros pontos na referida curva, totalizando-se quatro pontos na curva. Esta curva foi feita de cDNA total de um *pool* contendo 5 linfonodos normais [205]. Esta estratégia permitiu obter a quantidade relativa do gene de interesse em cada amostra pela disposição em gráfico contruído, colocando-se no eixo y o número de ciclos necessários para amplificação e, no eixo x, a quantidade correspondente de cDNA na curva padrão. A água sempre foi utilizada como controle negativo.

Ao final, os valores relativos de expressão gênica *BCL2, MYC, LMO2, MGMT, POU2F1, PDCD1* e *BCL6* foram normatizados em relação ao mRNA do gene endógeno *GUSB, GADPH* e *RPLPO*. O gene *GUSB* foi selecionado para

normatização por ser o mais discriminativo das amostras.

### 4.8.5 Eficiência gênica avaliada

A eficiência gênica encontra-se na Tabela 4.

**Tabela 4 -** Eficiências gênicas avaliadas

| Genes | R2 | Eficiência (%) |
|---|---|---|
| *MYC* | 0.99 | 98,70% |
| *BCL2* | 0.99 | 94,10% |
| *LMO2* | 0.99 | 96,40% |
| *MGMT* | 0.99 | 95,20% |
| *POU2F1* | 0.99 | 96,80% |
| *PDCD1* | 0.99 | 103,50% |
| *BCL6* | 0.99 | 102,90% |
| *GUSB* | 0.99 | 97,30% |
| *GAPDH* | 0.99 | 95,33% |
| *RPLPO* | 0.99 | 98,25% |

## 4.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram elaboradas por meio do aplicativo *Statistical Package for Social Sciences* – SPSS, versão 11.0 para Windows (Chicago, Il- USA). As variáveis quantitativas podem ser discretas quando determinadas por números inteiros ou contínuas quando representadas por qualquer valor de variação em escala numérica infinita. As variáveis categóricas ou qualitativas não são quantificáveis, mas medidas por meio de sua classificação em categorias, sendo apresentadas como frequências absolutas e porcentagens [206].

Neste estudo, utilizaram-se variáveis quantitativas contínuas (por exemplo, expressão gênica de *MYC, BCL2, LMO2, MGMT, POU2F1, PDCD1 e BCL6)* e variáveis qualitativas categóricas (por exemplo: sexo, raça, entre outras). Variáveis contínuas, como idade inferior a 60 anos e expressão gênica

menor que a mediana ou o ponto de corte estabelecido por Curva de ROC, foram transformadas em categóricas.

A análise univariada para medir associação entre as variáveis categóricas/qualitativas foi realizada pelo Teste Exato de Fischer. O Teste *T-Student* foi utilizado para as comparações entre as variáveis quantitativas e os desfechos selecionados [207,208]. Na análise univariada, foram considerados estatisticamente significantes valores até p ≤0,100, ou seja, com no máximo de 10% de chance de rejeitar a hipótese de igualdade quando ela é verdadeira. Devido ao pequeno tamanho amostral, optou-se por não realizar análise multivariada. Refratariedade, recaída e suas relações estatísticas foram avaliadas apenas na primeira linha de tratamento.

A análise da sobrevida é uma medida frequentemente utilizada para avaliar grupos com neoplasia. As curvas de SG, SLD e SLP foram estimadas pelo Método de Kaplan-Meier. No Método de Kaplan-Meier, os intervalos de tempo não são fixos, mas determinados pelo aparecimento de uma “falha”, e os sobreviventes ao longo do tempo são ajustados pela censura (os casos censurados entram no cálculo da função da probabilidade de sobrevida acumulada até o momento da perda) [209]. O Teste de Log-Rank foi utilizado para comparar as curvas de sobrevida particionadas por variáveis categóricas, porém os testes de Breslow e Tahone-Ware também foram calculados [210]. Estes testes são particularmente importantes quando as curvas não apresentam riscos proporcionais. O teste de Log-Rank tem peso maior no início e no meio de seguimento, o teste de Breslow tem peso maior no início do seguimento e o teste de Tahone-Ware tem peso maior no final do seguimento. Não foi realizada análise multivariada por regressão de Cox devido ao pequeno tamanho amostral [211]. As definições das Curvas de Sobrevida, Refratariedade e Recidiva encontram-se Quadro 4.

| Pontos de interesse | Definição |
|---|---|
| SG | Intervalo entre a data do diagnóstico e a data do último seguimento* (em meses) ou óbito, considerando-se como evento o óbito por qualquer etiologia. Razões para censura incluem: término do seguimento (paciente vivo) ou perda de seguimento. |
| SLD | Intervalo entre a data da RC e a data da recidiva (em meses), último seguimento ou óbito, considerando-se eventos a recidiva. Razões para censura incluem: término do seguimento (paciente vivo e sem progressão de doença) ou perda de seguimento. Esta curva só pôde ser calculada em pacientes que tenham obtido RC na primeira linha de tratamento. |
| SLP | Calculada como o tempo transcorrido entre o diagnóstico e o momento da progressão, recidiva, o último seguimento ou óbito (em meses), considerando-se como eventos PD ou recidiva. Esta curva só pôde ser calculada em pacientes que receberam pelo menos algum tipo de tratamento oncológico. Razões para censura incluem: término do seguimento (paciente vivo e sem progressão de doença) ou perda de seguimento. |
| Refratariedade | Definida como ausência de resposta (completa ou parcial) à primeira linha de tratamento. |
| Recidiva | Definida como PD após uma RC na primeira linha de tratamento. |

*Se a última data de seguimento conforme registro no prontuário foi inferior à data de censura de coleta de dados (01/12/2017), os pacientes tiveram seus status (vivo/morto) confirmados por via telefônica, quando possível, o mais próximo possível da data de censura. [212,213]

**Quadro 4 -** Definições das Curvas de Sobrevida, Refratariedade e Recidiva

Para determinar o melhor ponto de corte de positividade de expressão proteica por IHQ, utilizaram-se estimativa de sensibilidade e especificidade nos pontos de cortes previamente estabelecidos de 0%, 25%, 50%, 75% e 100% por Curvas de ROC (*Receiver Operator Characteristic Curve*) [214,215].

Algumas amostras apresentaram expressão gênica normatizada de valor zero considerando-se até cinco casas decimais, o que correspondeu a ausência absoluta de expressão. Estas amostras tiveram reações de rt-PCR repetidas, confirmando-se os resultados iniciais. Por tratar-se de ausência absoluta de expressão gênica, tornou-se impossível proceder ao cálculo logarítmico, dado que log 0 = menos infinito, para estas amostras. Desta forma,

a categorização da expressão gênica em variável quantitativa levaria à exclusão de várias amostras, diminuindo ainda mais o tamanho amostral, além de excluirem-se pacientes com expressão gênica ausente, o que poderia influenciar na interpretação das associações. Para evitar a exclusão destas amostras nas análises, optou-se por transformar a expressão gênica em variável categórica ao determinar o melhor ponto de corte de positividade da expressão gênica normatizada com o uso de estimativas de sensibilidade e especificidade por Curvas de ROC (*Receiver Operator Characteristic Curve*)[214,215].

Baseado nos pontos de corte estabelecidos obtidos através das Curvas de ROC, foi feito um teste de concordância (correlação) entre a expressão gênica e a expressão proteica (relacionados ao RT-qPCR e IHQ, respectivamente). O Coeficiente de Youden permite avaliar a performance dos testes diagnósticos. Coeficiente de Youden com valor zero corresponde à mesma proporção de testes positivos no grupo controle e no grupo com doença; Coeficiente de Youden com valor de 1 corresponde à ausência de Falsos Positivos e Falsos Negativos. O Coeficiente de Youden, porém, ignora a associação entre a sensibilidade e a especificidade do teste, podendo levar a achados errôneos [216]. O Coeficiente de Kappa é mais frequentemente utilizado e permite avaliar o desempenho dos testes diagnósticos com maior acurácia[217,218]. A classificação subjetiva por Kappa encontra-se na Tabela 5.

**Tabela 5 -** Classificação Subjetiva por Kappa

| **Valor** | **Interpretação da Associação** |
|---|---|
| <0,00 | pobre *(poor)* |
| 0,01 < valor < 0,20 | ligeira *(slight)* |
| 0,21 < valor < 0,40 | fraca *(fair)* |
| 0,41 < valor < 0,60 | moderada *(moderate)* |
| 0,61 < valor < 0,80 | substancial *(substantial)* |
| 0,81 < valor < 1,00 | quase perfeita *(almost perfect)* |
| 1,00 | perfeita *(perfect)* |

# 5 RESULTADOS

## 5.1 Casuística

Entre 01 de janeiro de 1995 e 31 de dezembro de 2016, 51 pacientes tiveram registro de “linfoma com acometimento em SNC” conforme demonstrado na Figura 4. Dois pacientes não tinham blocos teciduais disponíveis. Após a revisão histopatológica, catorze pacientes 14/49 (28,5%) foram excluídos por não apresentarem diagnóstico compatível com LPSNC LNHDGCB CD20+. Trinta e cinco (68,2%) do total de pacientes foram incluídos no estudo.

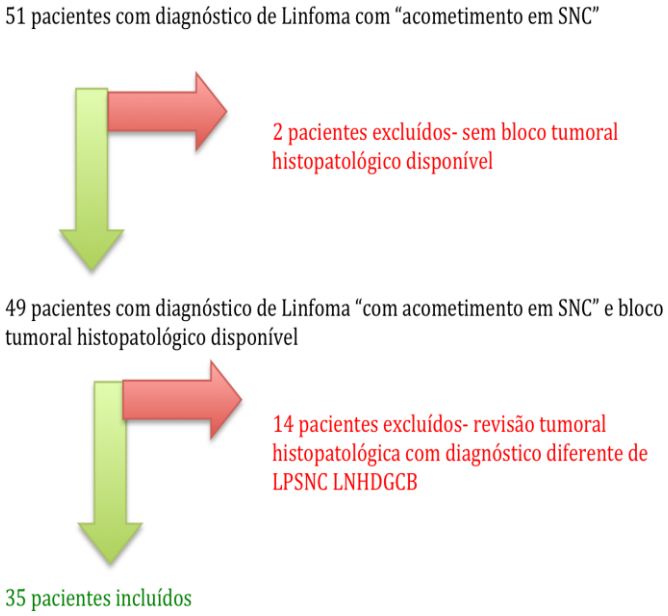



**Figura 4 -** Fluxograma da exclusão

A data de censura de coleta dos dados foi 01 de dezembro de 2017 com mediana de tempo de seguimento de 41 meses (1,1- 171,8). O tempo de seguimento foi calculado entre a data de diagnóstico e a data de óbito (em meses) ou a última data de seguimento (conforme registro em prontuário médico).

A mediana de idade ao diagnóstico foi de 62 anos (26,2-83,9). Vinte e

seis (74,2%) pacientes evoluíram a óbito até a data da censura. A *causa mortis* não se encontrava disponível nos prontuários, portanto não pode ser coletada.

A mediana de tempo de seguimento entre os pacientes vivos foi de 69,4 meses (16,1- 171,8 meses) e dos pacientes que evoluíram a óbito foi de 26,6 meses (1,1- 92,4 meses), conforme demonstrado na Tabela 6.

**Tabela 6 -** Tempos de seguimento

| Variável | Geral (%/n) | Status em 01/12/2017 | |
|---|---|---|---|
| | | Vivo (%/n) | Óbito (%/n) |
| **Número Total de Pacientes** | | | |
| % (n) | 100 (35) | 25,71 (9) | 74,2 (26) |
| **Tempo de Seguimento (meses)** | | | |
| média (dp) | 43,8 ( 39,18 ) | 77,5 ( 50,11 ) | 32,2 ( 27,10 ) |
| 1ºq;mediana;3ºq | 7,7 : 41,0 : 66,3 | 38,1 : 69,4 : 111,3 | 6,2 : 26,6 : 53,7 |
| mín ; máx | 1,1 : 171,8 | 16,1 : 171,8 | 1,1 : 92,4 |
| **Intervalo de Tempo entre Diagnóstico e Óbito (meses)** | | | |
| média (dp) | - | - | 32,2 ( 27,10 ) |
| 1ºq;mediana;3ºq | - | - | 6,2 : 26,6 : 53,7 |
| mín ; máx | - | - | 1,1 : 92,4 |
| **Intervalo de Tempo entre Diagnóstico e Última Consulta (meses)** | | | |
| média (dp) | - | 77,5 ( 50,11 ) | - |
| 1ºq;mediana;3ºq | - | 38,1 : 69,4 : 111,3 | - |
| mín ; máx | - | 16,1 : 171,8 | - |

## 5.2 Características clínico-laboratoriais ao diagnóstico

A mediana de idade ao diagnóstico foi de 62 anos (26,2 a 83,9 anos). A maioria dos pacientes era do sexo feminino (57,1%), apresentava acometimento de regiões profundas de SNC (77,1%), citologia oncótica negativa no LCR (91,4%) e PS inicial 0,1 ou 2 na primeira consulta no Serviço de Hematologia (57,2%). Com relação ao IPI modificado, 20% apresentavam IPI baixo (0+1), 48,6% apresentavam IPI intermediário (2+3) e 31,4%

apresentavam alto risco (4+5). As características clínicas dos pacientes encontram-se na Tabela 7.

As características clínico-laboratoriais por paciente encontram-se no Anexo A.

**Tabela 7 -** Características clínico-laboratoriais dos pacientes selecionados
(continua)

| Variável | Geral (%/n) |
|---|---|
| **Número total de pacientes** | |
| | 100% (35) |
| **Idade ao Diagnóstico (anos)** | |
| média (dp) | 60,1 ( 15,22 ) |
| 1ºq;mediana;3ºq | 49,8 : 62,0 : 72,9 |
| mín ; máx | 26,2 : 83,9 |
| ≤ 60 anos | 45,7% (16) |
| >60 anos | 54,3% (19) |
| **Sexo** | |
| masculino | 42,9% (15) |
| feminino | 57,1% (20) |
| **Acometimento de Regiões Profundas** | |
| não | 22,9% (8) |
| sim | 77,1% (27) |
| **Citologia LCR** | |
| citologia negativa | 91,4% (32) |
| citologia positiva | 5,7% (2) |
| desconhecido | 2,9% (1) |
| **Presença de HIC ao Diagnóstico** | |
| não | 71,4% (25) |
| sim | 28,6% (10) |
| **P.S. Inicial** | |
| 0 | 8,6% (3) |
| 1 | 25,7% (9) |
| 2 | 22,9% (8) |
| 3 | 37,1% (13) |
| 4 | 5,7% (2) |

**Tabela 7 -** Características clínico-laboratoriais dos pacientes selecionados
(conclusão)

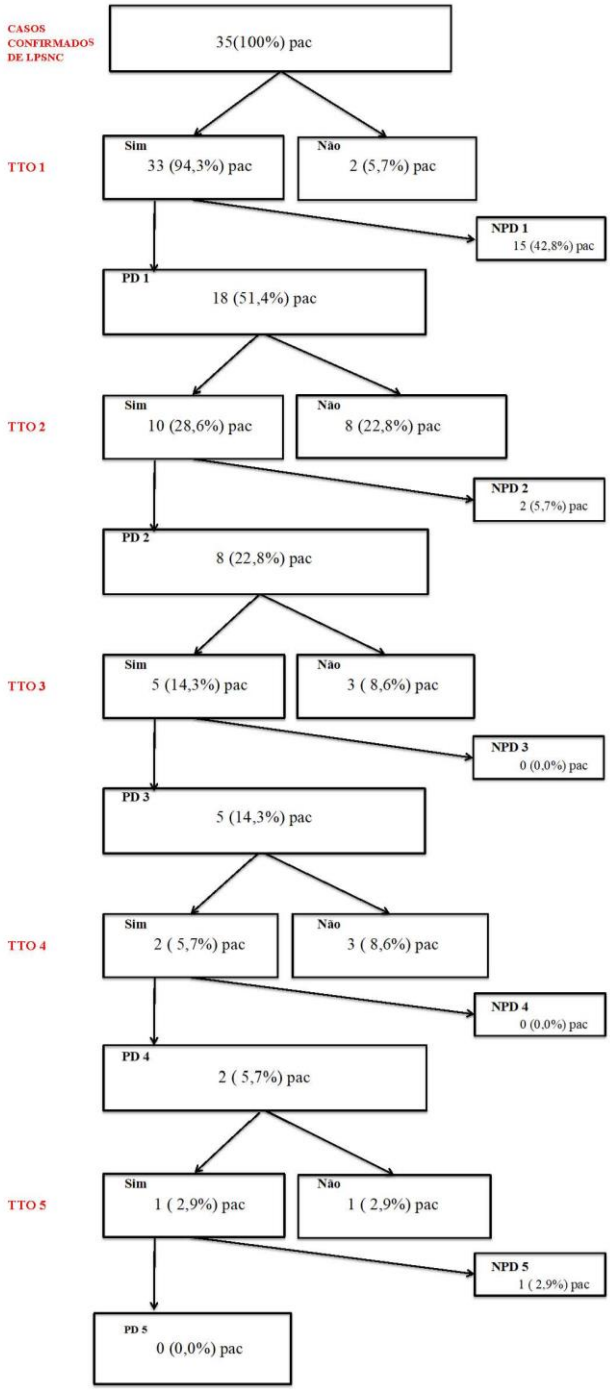
| Variável | Geral (%/n) |
|---|---|
| **Número total de pacientes** | |
| | 100% (35) |
| **RISCO IPI Modificado para LPSNC** | |
| Baixo (0+1) | 20% (7) |
| intermediário (2+3) | 48,6% (17) |
| alto (4+5) | 31,4% (11) |

## 5.3 Tratamentos oncológicos e resposta clínica

Com relação às linhas de tratamento oncológico com intuito curativo, observou-se que (Figura 5):

- 94,3% receberam pelo menos uma linha de tratamento (33/35);
- 28,6% receberam uma segunda linha de tratamento (10/35);
- 14,3% receberam uma terceira linha de tratamento (5/35);
- 5,7% receberam uma quarta linha de tratamento (2/35) e
- 2,9% receberam uma quinta linha de tratamento oncológico (1/35).

A maioria dos pacientes (51,4%;18/35) apresentou PD em algum momento da sua história clínica, porém apenas 28,6% submeteram-se a nova linha de tratamento. As características da primeira e da segunda linha de tratamento oncológico encontram-se nas Seções 5.3.1 e 5.3.2. A maioria dos pacientes (61%;21/35) recebeu radioterapia, em especial como consolidação (76%;16/21) ou terapia única (24%;5/21). Nenhum paciente foi submetido a TMO.




**Legenda**: Pac= Paciente/ / TTO 1= Primeira Linha de Tratamento/ TTO 2= Segunda Linha de Tratamento/ TTO 3= Terceira Linha de Tratamento/ TTO 4 =Quarta Linha de Tratamento/ TTO 5= Quinta Linha de Tratamento PD 1= Primeira Progressão de Doença/ PD 2= Segunda Progressão de Doença/ PD 3= Terceira Progressão de Doença/ PD 4= Quarta Progressão de Doença/ PD 5= Quinta Progressão de Doença / NPD 1= Ausência de Progressão de Doença após a Primeira Linha de Tratamento/ NPD 2= Ausência de Progressão de Doença após a Segunda Linha de Tratamento/ NPD 3= Ausência de Progressão de Doença após a Terceira Linha de Tratamento/ NPD 4= Ausência de Progressão de Doença após a Quarta Linha de Tratamento/ NPD 5= Ausência de Progressão de Doença após a Quinta Linha de Tratamento

**Figura 5 -** Número de linhas de tratamento oncológico

### 5.3.1 Primeira Linha de Tratamento Oncológico com Intuito Curativo

Quase todos os pacientes foram submetidos à primeira linha de tratamento oncológico (94,3%;33/35), sendo a quimioterapia baseada em HD-MTX a opção terapêutica mais utilizada (84%;28/33), seguida de radioterapia isolada (16%;5/33), com mediana de duração de tratamento de 4 meses e taxa de resposta global (TRG) de 72,8%. Dois pacientes não foram submetidos a nenhuma linha de tratamento, pois não tinham condições clínicas. Assim, para estes foi realizado tratamento paliativo. Nenhum paciente recebeu tratamento oncológico com anti-CD20 (rituximab) em primeira linha, pois não estava disponibilizado no Sistema Único de Saúde (SUS).

A maioria dos pacientes obteve RC (45,5%;15/33) à terapia de primeira linha, 27,3% (9/33) obtiveram RP e 27,3% (9/33) apresentaram PD. A taxa de refratariedade foi de 27,3% (9/33) (Tabela 8 e Gráfico 1). Apesar da alta taxa de resposta, a maioria dos pacientes apresentou PD em algum momento após a primeira linha de tratamento (54,5%;18/33). O Anexo B apresenta informações sobre a primeira linha de tratamento oncológico.

**Tabela 8 -** Taxas de resposta global, parcial, completa e refratariedade à primeira linha de tratamento oncológico

| Variável | Número de pacientes | Taxa |
|---|---|---|
| Taxa de Resposta Completa | 15/33 | 45,5% |
| Taxa de Resposta Parcial | 9/33 | 27,3% |
| Taxa de Resposta Global [1] | 24/33 | 72,8% |
| Taxa de Refratariedade [2] | 9/33 | 27,3% |
| Taxa de Recaída após RC | 3/15 | 20% |

(1) corresponde à soma da RP + RC;
(2) corresponde à fração de pacientes submetidos ao tratamento que apresentaram PD ou DE durante ou ao término do tratamento;

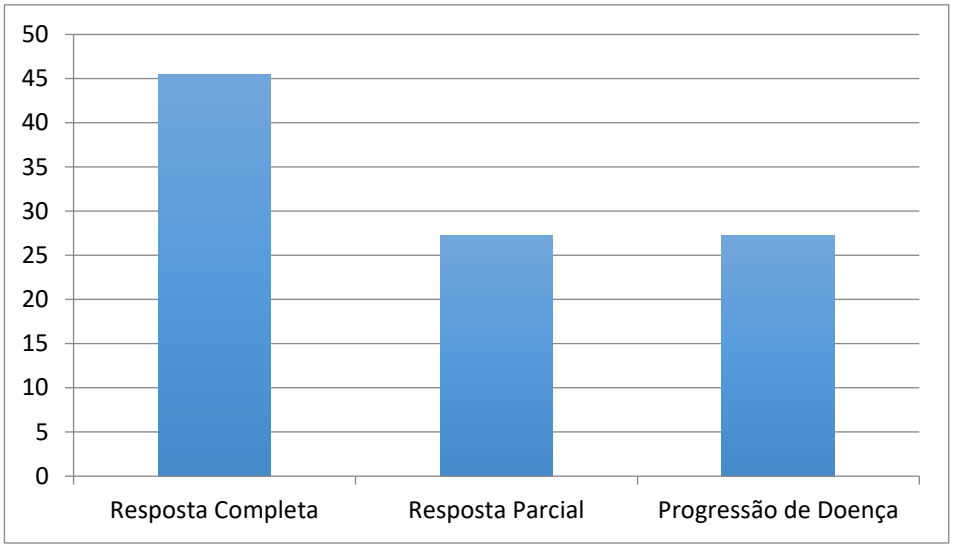



**Gráfico 1 -** Taxas de Resposta à Primeira Linha de Tratamento Oncológico

### 5.3.2 Segunda Linha de Tratamento Oncológico com Intuito Curativo

Dos 18 pacientes que apresentaram PD, a maioria (55,55%;10/18) foi submetida a uma segunda linha de tratamento, com mediana de duração de tratamento de dois meses. Aos pacientes sem condições clínicas de tratamento curativo, foi oferecido tratamento paliativo. Apesar da alta taxa de resposta após término do tratamento (60%;6/10), a maioria dos pacientes evoluiu com PD em algum momento (80%;8/10), conforme Tabela 9.

**Tabela 9 -** Taxas de resposta global, parcial, completa e refratariedade à segunda linha de tratamento oncológico

| Variável | Número de pacientes | Taxa |
|---|---|---|
| Taxa de Resposta Completa | 2/10 | 20,00% |
| Taxa de Resposta Parcial | 4/10 | 40,00% |
| Taxa de Resposta Global | 6/10 | 60,00% |
| Taxa de Refratariedade | 4/10 | 40,00% |

## 5.4 Expressão Proteica

Os resultados obtidos para a pesquisa de expressão proteica por IHQ estão disponibilizados na Tabela 10. A célula de origem (COO) foi classificada de acordo com os critérios de Hans [10]. Apenas 34% (12/35) dos casos puderam ser caracterizados, sendo 75% (9/12) classificados como não-GCB. Anti-CD3 foi realizado em 91,4% (32/35) dos casos, sendo a maioria (87,5%) positivo em linfócitos reacionais infiltrativos. A pesquisa de Ki67 foi realizada em 82,9% (29/35) dos casos e todos apresentaram índice de positividade > 70%. Não foi possível realizar reações de IHQ adicionais devido à escassez do material.

**Tabela 10 -** Descrição das revisões das reações de imuno-histoquímica disponíveis

| Variável | | Geral (%/n) |
|---|---|---|
| **Número Total de Pacientes** | | |
| | | 100% (35) |
| **anti-CD20** | | |
| | negativo | 0% (0) |
| | positivo | 100% (35) |
| **anti-CD3** | | |
| | negativo | 80% (28) |
| | positivo | 11,4% (4) |
| | não avaliado | 8,6% (3) |
| **anti-BCL6** | | |
| | negativo | 22,9% (8) |
| | positivo | 17,1% (6) |
| | não avaliado | 60% (21) |
| **anti-MUM1** | | |
| | negativo | 8,6% (3) |
| | positivo | 25,7% (9) |
| | não avaliado | 65,7% (23) |
| **COO Subtipo** | | |
| | GCB | 11,4% (4) |
| | não -GCB | 31,4% (11) |
| | não avaliado | 57,1% (20) |

Os resultados disponíveis encontram-se na Tabela 11.

A pesquisa da proteína MYC foi realizada em 94,3% (33/35) dos pacientes, dos quais a maioria apresentou valor > 50% (21/33;63,6%). BCL2 foi pesquisado em 91.4% (32/35), com resultado > 50% na maioria dos casos (27/32;84,5%). A proteína LMO2 foi pesquisada em 91,4% (32/35), em cuja maioria resultou não reativa (13/32;40,6%). A proteína MGMT foi realizada em 88,6% (31/35), sendo negativo em todos os casos. A expressão proteica de POU2F1 foi realizada em 94,3% (33/35), com resultado > 75% na maiotia dos casos (30/33;93,9%). A proteína PDCD1 foi pesquisada em 94,3%(33/35), sendo a maioria não reativa (30/33;90,9%).

**Tabela 11 -** Resultados das reações de imuno-histoquímica das proteínas de interesse

| Variável | | Geral (%/n) |
|---|---|---|
| **Número Total de Pacientes** | | |
| | | 100% (35) |
| **anti-MYC** | | |
| | 0%-50% | 34,2% (12) |
| | 51%-100% | 60% (21) |
| | não disponível | 5,8% (2) |
| **anti-BCL2** | | |
| | 0%-50% | 14,2% (5) |
| | 51%-100% | 80% (28) |
| | não disponível | 5,8% (2) |
| **anti-LMO2** | | |
| | 0%-25% | 40% (14) |
| | 26%-100% | 51,4% (18) |
| | não disponível | 8,6% (3) |
| **anti-MGMT** | | |
| | negativo | 88,6% (31) |
| | positivo | 0,0% |
| | não disponível | 11,4% (4) |
| **anti-POU2F1** | | |
| | negativo | 0,0% |
| | positivo | 94,2% (33) |
| | não disponível | 5,8% (2) |
| **anti-PDCD1** | | |
| | negativo | 85,7% (30) |
| | positivo | 8,6% (3) |
| | não disponível | 5,7% (2) |

## 5.5 Expressão Gênica

A expressão absoluta gênica dos genes *MYC, BCL2, LMO2, MGMT, POU2F1, PDCD1* e *BCL6* foi avaliável em, respectivamente, 60%, 60%, 60%, 60%, 65,7%, 60% e 65,7% dos casos (Tabela 12). Os resultados da expressão normatizada dos genes de interesse por paciente encontram-se no Anexo C. Foram realizados testes comparativos para todas as variáveis entre a amostra total (n=35) e a subamostra contendo apenas pacientes com expressão gênica avaliável. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a amostra total e a subamostra (Anexo D).

**Tabela 12 -** Amplificação normatizada dos genes de interesse

(continua)

| Variável | Geral (%/n) |
|---|---|
| **Número Total de Pacientes** | |
| | 100% (35) |
| **GENE *MYC*** | |
| número de amostras amplificadas | 21 |
| média (dp) | 0,201 (0,1778 ) |
| 1ºq;mediana;3ºq | 0,015 : 0,201 : 0,322 |
| mín ; máx | 0,000 : 0,641 |
| <0,201041 (n) | 47,6% (10) |
| ≥0,201041 (n) | 52,4% (11) |
| TOTAL (n) | 100% (21) |
| **GENE *BCL2*** | |
| número de amostras amplificadas | 21 |
| média (dp) | 0,906 (1,2381 ) |
| 1ºq;mediana;3ºq | 0,110 : 0,564 : 1,192 |
| mín ; máx | 0,000 : 5,566 |
| <0,3516 (n) | 38,0% (8) |
| ≥0,3516 (n) | 62,0% (13) |
| TOTAL (n) | 100% (21) |

**Tabela 12** - Amplificação normatizada dos genes de interesse

(continuação)

| Variável | Geral (%/n) |
|---|---|
| **Número Total de Pacientes** | |
| | 100% (35) |
| **GENE *LMO2*** | |
| número de amostras amplificadas | 21 |
| média (dp) | 3,877 (5,0025 ) |
| 1ºq;mediana;3ºq | 0,296 : 1,636 : 6,850 |
| mín ; máx | 0,000 : 17,506 |
| <0,689232 (n) | 33,3% (7) |
| ≥0,689232 (n) | 66,7% (14) |
| TOTAL (n) | 100% (21) |
| **GENE *MGMT*** | |
| número de amostras amplificadas | 21 |
| média (dp) | 0,760 (2,2315 ) |
| 1ºq;mediana;3ºq | 0,000 : 0,000 : 0,277 |
| mín ; máx | 0,000 : 10,072 |
| <0,335666 (n) | 76,2% (16) |
| ≥0,335666 (n) | 23,8% (5) |
| TOTAL (n) | 100% (21) |
| **GENE *POU2F1*** | |
| número de amostras amplificadas | 23 |
| média (dp) | 1,748 (2,0030 ) |
| 1ºq;mediana;3ºq | 0,000 : 1,448 : 2,828 |
| mín ; máx | 0,000 : 6,301 |
| <1,44819 (n) | 47,8% (11) |
| ≥1,44819 (n) | 52,2% (12) |
| TOTAL (n) | 100% (23) |

**Tabela 12** - Amplificação normatizada dos genes de interesse
(conclusão)

| Variável | Geral (%/n) |
|---|---|
| **Número Total de Pacientes** | |
| | 100% (35) |
| **GENE *PDCD1*** | |
| número de amostras amplificadas | 21 |
| média (dp) | 1,324 (2,4693 ) |
| 1ºq;mediana;3ºq | 0,000 : 0,000 : 1,870 |
| mín ; máx | 0,000 : 9,215 |
| <2,00938 (n) | 76,2% (16) |
| ≥2,00938 (n) | 23,8% (5) |
| TOTAL (n) | 100% (21) |
| **GENE *BCL6*** | |
| número de amostras amplificadas | 23 |
| média (dp) | 2,899 (2,6369 ) |
| 1ºq;mediana;3ºq | 0,648 : 2,716 : 3,787 |
| mín ; máx | 0,000 : 9,091 |
| <2,73477 (n) | 47,8% (11) |
| ≥2,73477 (n) | 52,2% (12) |
| TOTAL (n) | 100% (23) |

## 5.6 Construção de Curvas de ROC *(receiver operator characteristic curve*, em inglês)

### 5.6.1 Curvas de ROC para expressão proteica

Os resultados de IHQ para as proteínas de interesse foram quantificadas em quartis. Curvas de ROC puderam ser construídas para as proteínas MYC, BCL2 e LMO2 em relação à SG e à SLP. Para as demais proteínas, não foi possível construir curvas de ROC devido ao excesso de ausência de expressão (MGMT e PD1) ou excesso de positividade (OCT1). Após revisão da literatura para estas proteínas, optou-se por determinar como ponto de corte a ausência ou a presença de expressão. Os pontos de corte selecionados foram aqueles

com maior RV+ e menor RV-, podendo-se então transformar os resultados das IHQ em variáveis categóricas dicotômicas (menor ou maior / igual ao ponto de corte). A Tabela 13 - apresenta os pontos de corte da IHQ utilizados com base na construção das Curvas de ROC, conforme descrito na Seção 4.9. As Curvas de ROC para as proteínas MYC, BCL2 e LMO2 encontram-se, respectivamente, nos Anexos E, F e G.

**Tabela 13 -** Revisão bibliográfica dos pontos de corte da reação de imuno-histoquímica das proteínas de interesse e pontos de corte selecionados neste estudo

| Proteína de interesse | Ponto de corte [1] | Ponto de corte selecionado [2] |
|---|---|---|
| MYC | 50% [219] | **50%** |
| BCL2 | 40% [219]; 50% [220] | **50%** |
| LMO2 | 30% [164] | **25%** |
| MGMT | 5-10% [29,175,221] | **Positivo versus Negativo [4]** |
| POU2F1 | Positivo versus Negativo [3222] | **Positivo versus Negativo [4]** |
| PDCD1 | <1%; 1-10%; 11-25%; 26-50%; 51-75%, ≥76%[223] | **Positivo versus Negativo [4, 5]** |

(1) de acordo com os artigos descritos; (2) de acordo com a metodologia da curva de ROC; (3) presença ou ausência de imunofixação nas células tumorais; (4) >0 versus ≤0; (5) analisado na membrana celular e citoplasma

### 5.6.2 Curvas de ROC para expressão gênica normatizada

Conforme descrito na Seção 4.9, utilizaram-se as curvas de ROC para selecionar pontos de corte da expressão gênica normatizada a fim de transformar esta variável numérica em categórica dicotômica. Desta forma, os pacientes com ausência absoluta de expressão gênica puderam ser incluídos nas análises, pois não existe logaritmo de zero em qualquer base. Curvas de ROC foram construídas para todos os genes normatizados para os desfechos de SG e SLP, sendo selecionados os pontos de corte com maior RV+ e menor

RV (Tabela 14). As curvas de ROC para a expressão gênica normatizada dos genes *MYC, MGMT, PDCD1, BCL2, LMO2, POU2F1* e *BCL6* encontram-se nos Anexos H, I, J, K, L, M e N.

**Tabela 14 -** Pontos de corte da expressão normatizada dos genes de interesse

| Variável | Ponto de Corte | Metodologia |
|---|---|---|
| *MYC* | ≥0,201041 vs <0,201041 | Curva de ROC |
| *BCL2* | ≥0,3516 vs <0,3516 | Curva de ROC |
| *LMO2* | ≥0,689232 vs <0,689232 | Curva de ROC |
| *MGMT* | ≥0,335666 vs <0,335666 | Curva de ROC |
| *POU2F1* | ≥1,44819 vs <1,44819 | Curva de ROC |
| *PDCD1* | ≥2,00938 vs <2,00938 | Curva de ROC |
| *BCL6* | ≥2,73477 vs <2,73477 | Curva de ROC |

## 5.7 Curvas de Sobrevida

Conforme descrito na Tabela 6, a mediana de acompanhamento de toda a coorte foi de 41 meses (mínimo de 1,1 e máximo de 171,8 meses). A mediana do intervalo de tempo entre o diagnóstico e o óbito foi de 26,6 meses (mínimo de 1,1 e máximo de 92,4 meses). Até a data da censura, 26/35 pacientes tinham evoluído a óbito. As construções das curvas de SG, SLP e SLD pelo método de Kaplan-Meier encontram-se no Anexo O.

### 5.7.1 Sobrevida Global

A SG mediana foi de 42,6 meses (IC95% 26,6-58,6 meses). A probabilidade de SG em 24 meses foi 65,5%; a probabilidade de SG em 48 meses foi de 43,8% e a probabilidade de SG em 60 meses foi de 40,4% (Gráfico 2).

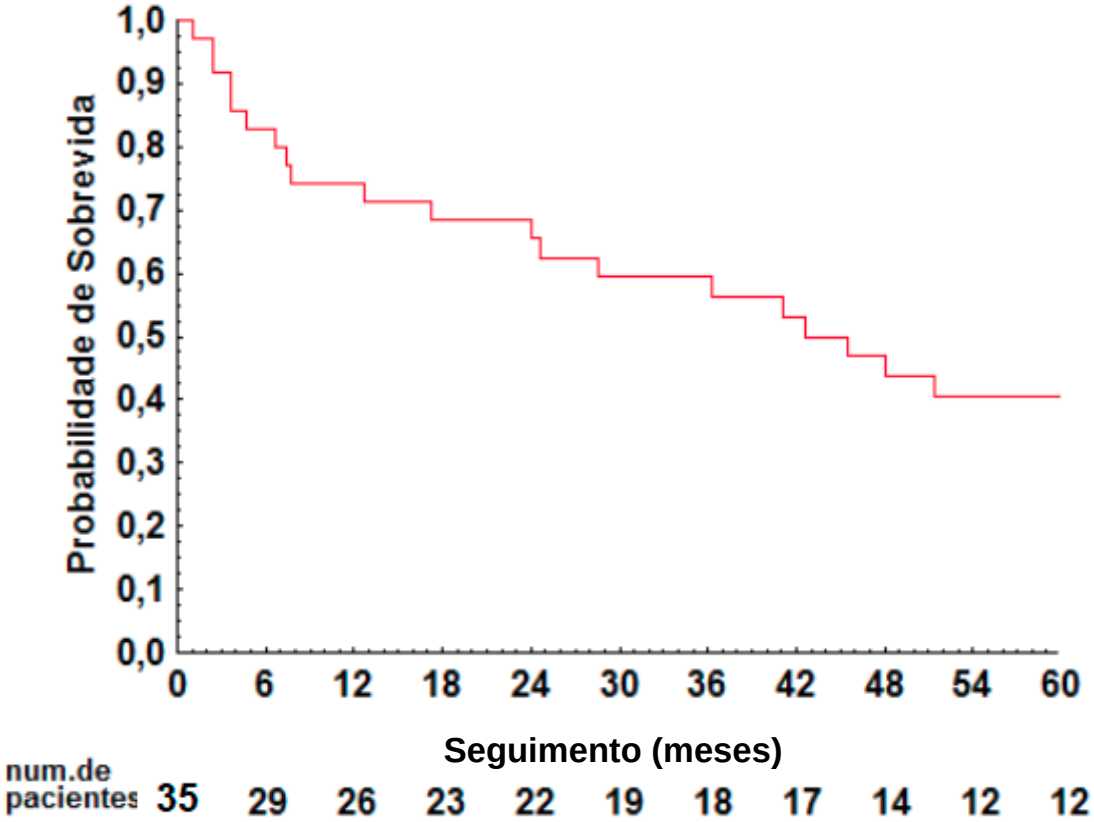



**Gráfico 2 -** Curva de Sobrevida Global nos pacientes com LPSNC

### 5.7.2 Sobrevida Livre de Doença (1ª linha de tratamento)

A SLD mediana foi de 59,2 meses (IC95% 31,9- 86,6 meses). A curva de Kaplan-Meier (Gráfico 3).

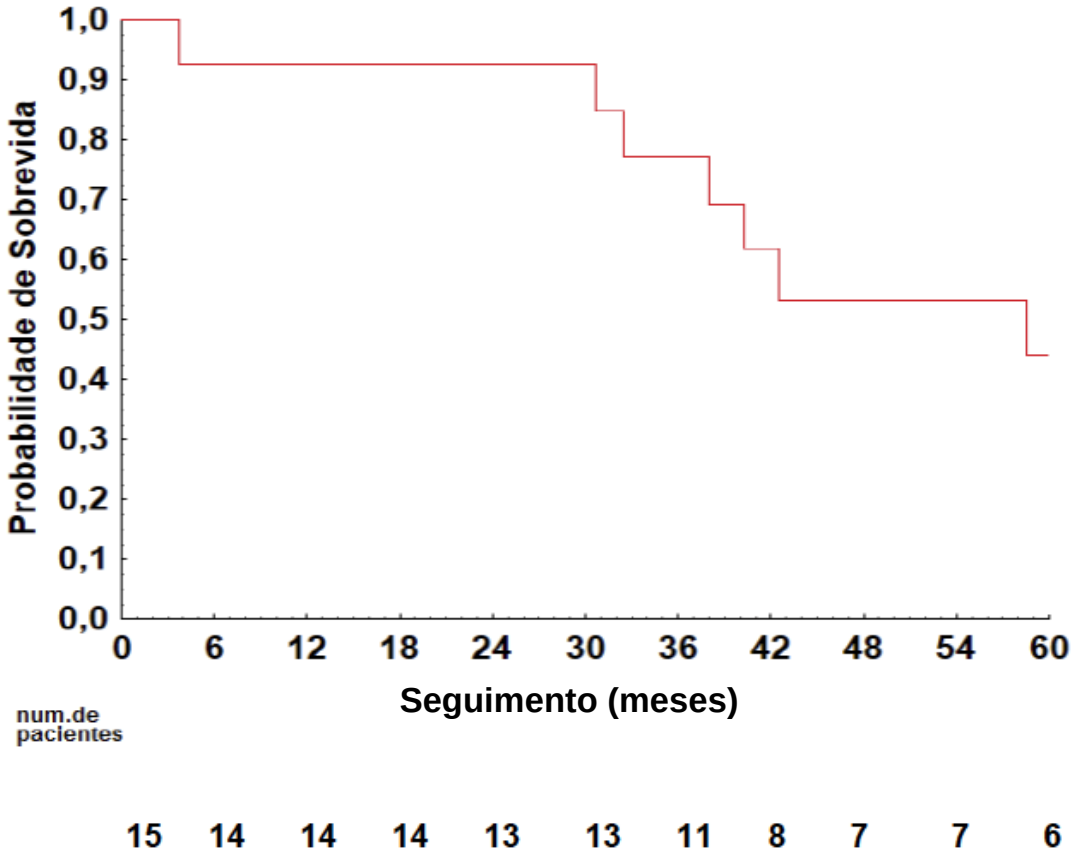



**Gráfico 3 -** Curva de Sobrevida livre de doença nos pacientes com LPSNC

### 5.7.3 Sobrevida Livre de Progressão (1ª linha de tratamento)

A SLP mediana foi de 41 meses (IC95% 19,7-62,4 meses). A probabilidade de SLP em 24 meses foi de 63,6%, a probabilidade de SLP em 48 meses foi de 37,1% e a probabilidade de SLP em 60 meses foi de 25,9% (Gráfico 4).

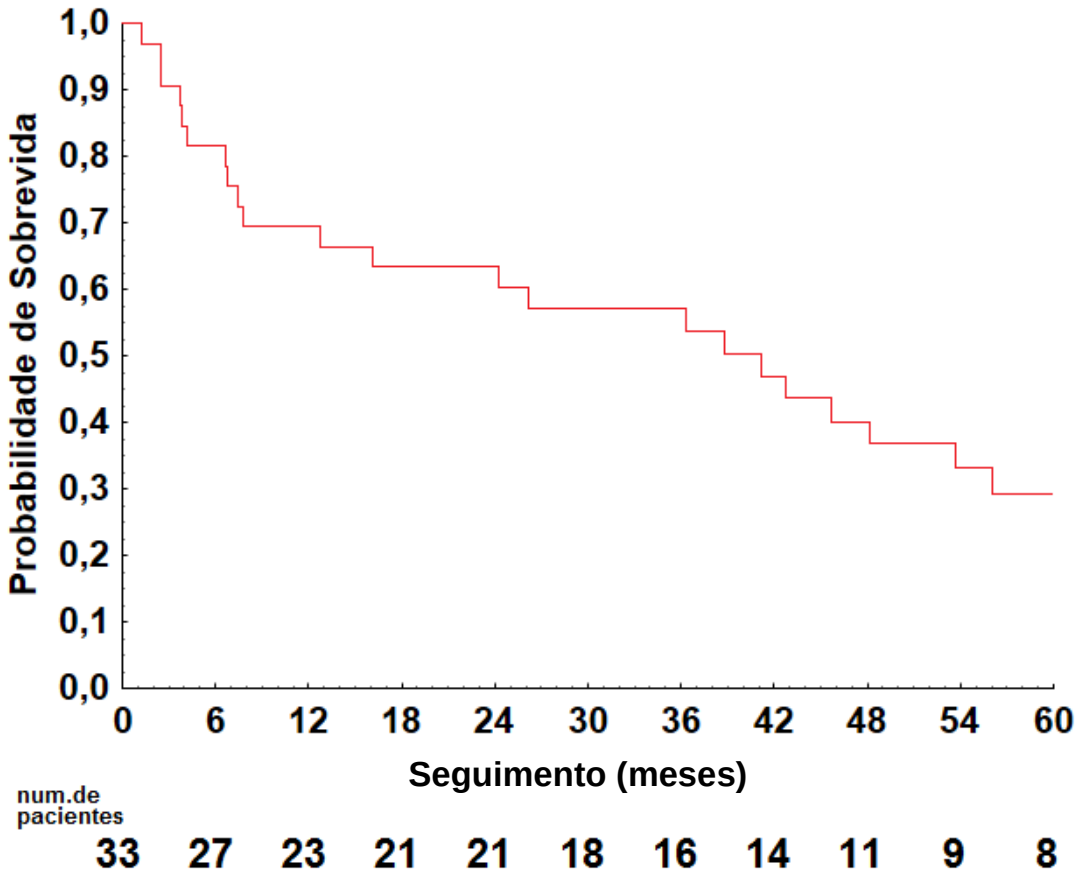



**Gráfico 4 -** Curva de Sobrevida livre de progressão nos pacientes com LPSNC

## 5.8 Fatores de Prognóstico para SG, SG 2 anos, SLD e SLP

### 5.8.1 Análise Univariada para SG e SG em 24 meses

Até a última data de coleta de dados (01/12/2017), 74,3% (26/35) evoluíram a óbito e 25,7% (9/35) estavam vivos. Nove pacientes evoluíram a óbito em até 1 ano após o diagnóstico e 12 pacientes evoluíram a óbito em até 2 anos após o diagnóstico.

Com relação à Sobrevida Global, as variáveis idade >60 anos, IPI modificado ≥2, P.S. ≥3, ausência de tratamento com radioterapia, expressão gênica de *MYC* ≥ 0,201041, BCL2 ≥51%, refratariedade à primeira linha de tratamento e progressão de doença após a primeira linha de tratamento estiveram associadas a pior prognóstico, com diferença estatisticamente significante (p ≤0,1). Os valores de HR, IC95% e valor P (log-rank) encontram-se na Tabela 15.

Com relação à SG em 2 anos, a P.S. ≥3, ausência de tratamento com radioterapia, expressão gênica de *MYC* ≥ 0,201041, LMO2 ≤25%, refratariedade à primeira linha de tratamento e progressão de doença após a primeira linha de tratamento estiveram associadas a pior prognóstico**,** com diferença estatisticamente significante (p ≤0,1). Os valores de HR, IC95% e valor P (log-rank) encontram-se na Tabela 16.

**Tabela 15 -** Análise univariada de Cox para SG

| Variáveis | HR (IC 95%) | valor p** |
|---|---|---|
| Idade (> 60 anos vs≤ 60 anos) | **2,466 (1,091;5,573)** | **0,025** |
| IPI modificado (2+3+4+5 vs 0+1) | **3,564 (1,055;12,036)** | **0,029** |
| P.S. (3+4 vs 0+1+2) | **7,005 (2,671;18,37)** | **<0,001** |
| Radioterapia (Não vs Sim) | **3,413 (1,516;7,683)** | **0,002** |
| COO (não-GCB vs GCB) | 1,877 (0,397;8,882) | 0,417 |
| anti-CD3 (Negativo vs Positivo) | 4,464 (0,6;33,229) | 0,109 |
| anti-MYC (51-100% vs 0-50%) | 1,186 (0,502;2,802) | 0,696 |
| anti-BCL2 (51-100% vs 0-50%) | **3,559 (0,833;15,196)** | **0,067** |
| anti-LMO2 (0-25% vs 26-100%) | 1,67 (0,736;3,793) | 0,215 |
| anti-MGMT (1-100% vs 0%)# | | |
| anti-PDCD1 (1-100% vs 0%) | 0,516 (0,12;2,215) | 0,364 |
| anti-POU2F1 (1-100% vs 0%)* | | |
| gene *MYC* (≥0,201041 vs <0,201041) | **6,117 (1,617;23,149)** | **0,003** |
| gene *BCL2* (≥0,3516 vs <0,3516) | 1,934 (0,652;5,739) | 0,227 |
| gene *LMO2* (<0,689232 vs ≥0,689232) | 2,099 (0,747;5,895) | 0,151 |
| gene *MGMT* (≥0,335666 vs <0,335666) | 1,793 (0,546;5,894) | 0,331 |
| gene *POU2F1* (<1,44819 vs ≥1,44819) | 1,179 (0,453;3,067) | 0,735 |
| gene *PDCD1* (<2,00938 vs ≥2,00938) | 1,539 (0,34;6,965) | 0,573 |
| gene *BCL6* (<2,73477 vs ≥2,73477) | 0,952 (0,356;2,543) | 0,922 |
| Refratariedade (Sim vs Não) | **28,272 (5,823;137,272)** | **<0,001** |
| PD após 1 linha tratamento (Sim vs Não) | **3,248 (1,33;7,932)** | **0,006** |

# Não pode ser calculado, pois todos os pacientes tinham anti-MGMT 0%
* Não pode ser calculado, pois todos os pacientes tinham anti-POU2F1 100%
** em vermelho: valores com diferença estatisticamente significante valor p≤0,05/ em negrito: valores com diferença estatisticamente significante 0,10≥ valor p>0,05
*** *Since coefficients did not converge, no further models will be fitted.*

**Tabela 16 -** Análise univariada de Cox para SG em 2 anos

| Variáveis | HR (IC 95%) | valor p** |
|---|---|---|
| Idade (> 60 anos vs≤ 60 anos) | 2,025 (0,609;6,742) | 0,239 |
| IPI modificado (2+3+4+5 vs 0+1) | 3,388 (0,437;26,273) | 0,214 |
| P.S. (3+4 vs 0+1+2) | **5,851 (1,568;21,83)** | **0,003** |
| Radioterapia (Não vs Sim) | **2,874 (0,908;9,095)** | **0,060** |
| COO (não-GCB vs GCB) | 0,973 (0,196;4,832) | 0,973 |
| anti-CD3 (Negativo vs Positivo) | 1,616 (0,207;12,636) | 0,643 |
| anti-MYC (51-100% vs 0-50%) | 0,473 (0,152;1,478) | 0,187 |
| anti-BCL2 (51-100% vs 0-50%) | 2,087 (0,269;16,182) | 0,470 |
| anti-LMO2 (0-25% vs 26-100%) | **8,131 (1,737;38,068)** | **0,002** |
| anti-MGMT (1-100% vs 0%)# | | |
| anti-PDCD1 (1-100% vs 0%) | 0,877 (0,113;6,803) | 0,900 |
| anti-POU2F1 (1-100% vs 0%)* | | |
| gene *MYC* (≥0,201041 vs <0,201041) | **3,597 (0,723;17,888)** | **0,095** |
| gene *BCL2* (≥0,3516 vs <0,3516 ) | 2,187 (0,44;10,863) | 0,326 |
| gene *LMO2* (<0,689232 vs ≥0,689232) | 2,173 (0,542;8,704) | 0,261 |
| gene *MGMT* (≥0,335666 vs <0,335666 ) | 2,958 (0,689;12,704) | 0,127 |
| gene *POU2F1* (<1,44819 vs ≥1,44819) | 1,528 (0,41;5,7) | 0,523 |
| gene *PDCD1* (<2,00938 vs ≥2,00938) | 2,354 (0,289;19,145) | 0,409 |
| gene *BCL6* (<2,73477 vs ≥2,73477 ) | 1,294 (0,347;4,821) | 0,699 |
| Refratariedade (Sim vs Não) | **20,955 (4,349;100,967)** | **<0,001** |
| PD após 1 linha tratamento (Sim vs Não) | **4,053 (0,859;19,116)** | **0,055** |

# Não pode ser calculado, pois todos os pacientes tinham anti-MGMT 0%

* Não pode ser calculado, pois todos os pacientes tinham anti-POU2F1 100%

** em vermelho: valores com diferença estatisticamente significante valor p≤0,05/ em negrito: valores com diferença estatisticamente significante 0,10≥ valor p>0,05

*** *Since coefficients did not converge, no further models will be fitted.*

### 5.8.2 Análise Univariada para SLD

Até a última data de coleta de dados (01/12/2017), a maioria dos pacientes recebeu algum tipo de primeira linha de tratamento oncológico (94%; 33/35), com taxa de resposta completa de 45,5% (15/33) e de recaída após resposta completa de 20% (2/15). Com relação à SLD, a idade >60 anos, IPI modificado ≥2, P.S. ≥3, ausência de tratamento com radioterapia estiveram associados a pior prognóstico, com diferença estatisticamente significante (p ≤0,1). Os valores de HR, IC95% e valor P (log-rank) encontram-se na Tabela 17.

**Tabela 17 -** Análise univariada de Cox para SLD

(continua)

| **Variáveis** | **HR (IC 95%)** | **valor p**** |
|---|---|---|
| Idade (> 60 anos vs≤ 60 anos) | **3,333 (0,773;14,376)** | **0,088** |
| IPI modificado (2+3+4+5 vs 0+1) | **0,177 (0,021;1,489)** | **0,076** |
| P.S. (3+4 vs 0+1+2) | **10,272 (1,807;58,393)** | **0,002** |
| Radioterapia (Não vs Sim) | **4,126 (0,966;17,623)** | **0,039** |
| COO (não-GCB vs GCB) | * | NA |
| anti-CD3 (Negativo vs Positivo) | 0,894 (0,105;7,573) | 0,918 |
| anti-MYC (51-100% vs 0-50%) | 1,392 (0,279;6,935) | 0,687 |
| anti-BCL2 (51-100% vs 0-50%) | *** | NA |
| anti-LMO2 (0-25% vs 26-100%) | *** | NA |
| anti-MGMT (1-100% vs 0%)# | | |
| anti-PDCD1 (1-100% vs 0%) | *** | NA |
| anti-POU2F1 (1-100% vs 0%)* | | |
| gene *MYC* (≥0,201041 vs <0,201041) | 2,924 (0,26;32,934) | 0,364 |
| gene *BCL2* (≥0,3516 vs <0,3516 ) | 1,423 (0,126;16,043) | 0,774 |
| gene *LMO2* (<0,689232 vs ≥0,689232) | 0,237 (0,021;2,674) | 0,207 |
| gene *MGMT* (≥0,335666 vs <0,335666 ) | *** | NA |
| gene *POU2F1* (<1,44819 vs ≥1,44819) | 1,732 (0,235;12,783) | 0,586 |
| gene *PDCD1* (<2,00938 vs ≥2,00938) | *** | NA |

**Tabela 17 -** Análise univariada de Cox para SLD

(conclusão)

| **Variáveis** | **HR (IC 95%)** | **valor p**** |
|---|---|---|
| gene *BCL6* (<2,73477 vs ≥2,73477 ) | 4,472 (0,279;71,807) | 0,247 |
| Refratariedade (Sim vs Não) | | NA |
| PD após 1 linha tratamento (Sim vs Não) | 2,697 (0,489;14,86) | 0,236 |

# Não pode ser calculado, pois todos os pacientes tinham anti-MGMT 0%

* Não pode ser calculado, pois todos os pacientes tinham anti-POU2F1 100%

** em vermelho: valores com diferença estatisticamente significante valor p≤0,05/ em negrito: valores com diferença estatisticamente significante 0,10≥ valor p>0,05

*** *Since coefficients did not converge, no further models will be fitted.*

### 5.8.3 Análise Univariada para SLP

Até a última data de coleta de dados (01/12/2017), a maioria dos pacientes recebeu algum tipo de primeira linha de tratamento oncológico (94%; 33/35), com taxa de resposta global de 72,7% (24/33), porém a maioria dos pacientes apresentou PD em algum momento após RP ou RC (75%; 18/24).

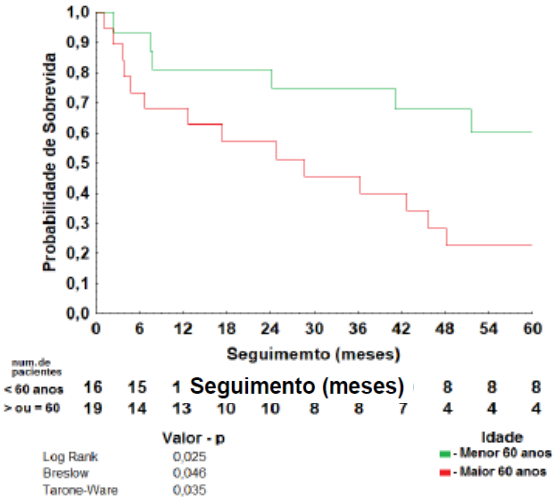
Com relação à SLP, idade >60 anos, IPI modificado ≥2, P.S. ≥3, ausência de tratamento com radioterapia, expressão gênica de *MYC* ≥ 0,201041, BCL2 ≥51%, expressão gênica de *LMO2* <0,689232, expressão gênica de *MGMT* ≥0,335666, refratariedade à primeira linha de tratamento e progressão de doença após a primeira linha de tratamento estiveram associados a pior prognóstico, com diferença estatisticamente significante (p ≤0,1). Os valores de HR, IC95% e valor P (log-rank) encontram-se na Tabela 18.

**Tabela 18 -** Análise univariada de Cox para SLP

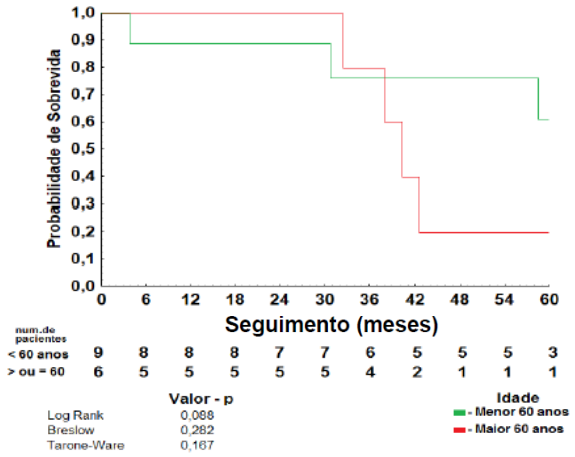
| **Variáveis** | **HR (IC 95%)** | **valor p**** |
|---|---|---|
| Idade (> 60 anos vs ≤ 60 anos) | **2,857 (1,239;6,589)** | **0,010** |
| IPI modificado (2+3+4+5 vs 0+1) | **4,151 (1,193;14,446)** | **0,001** |
| P.S. (3+4 vs 0+1+2) | **3,951 (1,651;9,454)** | **0,001** |
| Radioterapia (Não vs Sim) | **2,281 (1,027;5,067)** | **0,037** |
| COO (não-GCB vs GCB) | 3,225 (0,391;26,588) | 0,248 |
| anti-CD3 (Negativo vs Positivo) | 4,386 (0,588;32,746) | 0,115 |
| anti-MYC (51-100% vs 0-50%) | 1,519 (0,6;3,85) | 0,374 |
| anti-BCL2 (51-100% vs 0-50%) | **3,376 (0,784;14,534)** | **0,083** |
| anti-LMO2 (0-25% vs 26-100%) | 1,677 (0,715;3,935) | 0,229 |
| anti-MGMT (1-100% vs 0%)# | | |
| anti-PDCD1 (1-100% vs 0%) | 0,838 (0,196;3,583) | 0,811 |
| anti-POU2F1 (1-100% vs 0%)* | | |
| gene *MYC* (≥0,201041 vs <0,201041) | **3,96 (1,192;13,147)** | **0,016** |
| gene *BCL2* (≥0,3516 vs <0,3516 ) | 1,98 (0,651;6,021) | 0,221 |
| gene *LMO2* (<0,689232 vs ≥0,689232) | **2,718 (0,87;8,493)** | **0,073** |
| gene *MGMT* (≥0,335666 vs <0,335666) | **3,749 (0,879;15,993)** | **0,056** |
| gene *POU2F1* (<1,44819 vs ≥1,44819) | 0,909 (0,334;2,477) | 0,852 |
| gene *PDCD1* (<2,00938 vs ≥2,00938) | 1,762 (0,389;7,979) | 0,456 |
| gene *BCL6* (<2,73477 vs ≥2,73477) | 0,815 (0,301;2,211) | 0,687 |
| Refratariedade (Sim vs Não) | **75,672 (8,96;638,734)** | **<0,001** |
| PD após 1 linha tratamento (Sim vs Não) | **5,425 (2,094;14,053)** | **<0,001** |

#Não pode ser calculado, pois todos os pacientes tinham anti-MGMT 0%
*Não pode ser calculado, pois todos os pacientes tinham anti-POU2F1 100%
** em vermelho: valores com diferença estatisticamente significante valor p≤0,05/ em negrito: valores com diferença estatisticamente significante 0,10≥ valor p>0,05
*** *Since coefficients did not converge, no further models will be fitted.*

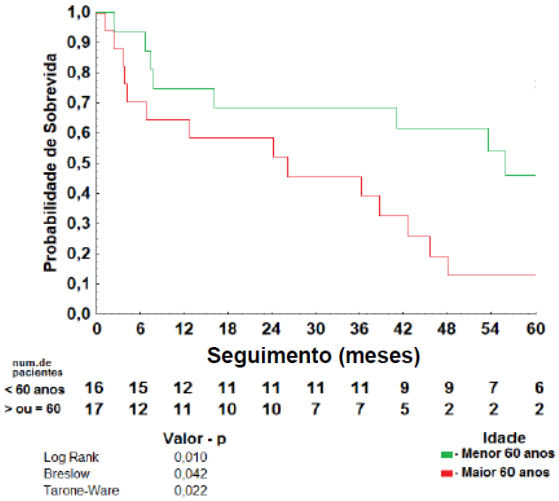
### 5.8.4 Testes de Log-Rank: gráficos por variáveis analisadas




a) Teste de Log-Rank para SG
HR (IC95%)= 2,466 (1,091; 5,573)

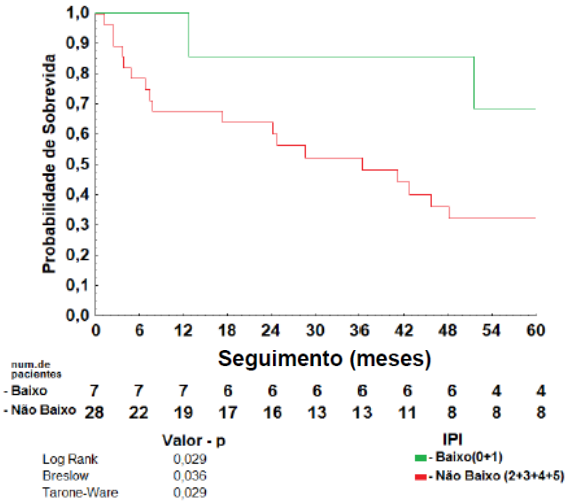



b) Teste de Log-Rank para SLD
HR (IC95%)= 3,33 (0,773; 14,376)

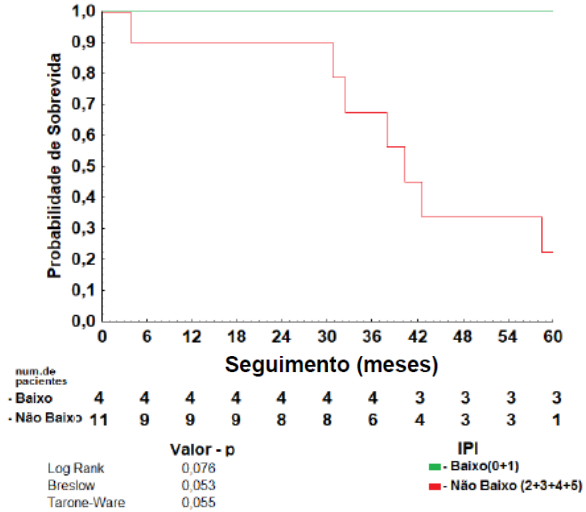



c) Teste de Log-Rank para SLP
HR (IC95%)= 2,857 (1,239; 6,589)

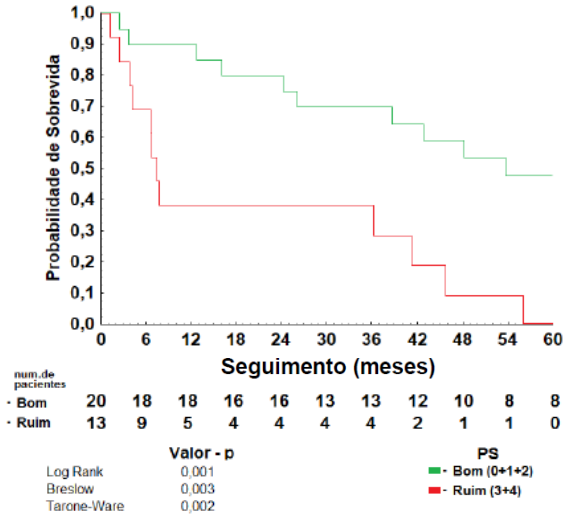
**Gráfico 5 -** Teste de Log-rank – Variável: Idade (> 60 anos vs ≤ 60 anos)




a) Teste de Log-Rank para SG
HR (IC95%)= 3,564 (1,055; 12,036)

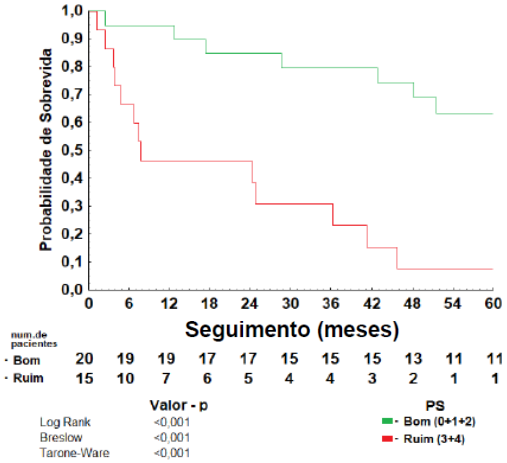



b) Teste de Log-Rank para SLD
HR (IC95%)= 0,177 (0,21; 1,489)

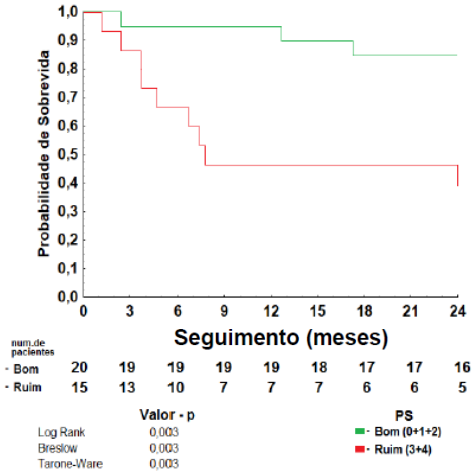



c) Teste de Log-Rank para SLP
HR (IC95%)=4,151 (1,193; 14,446)

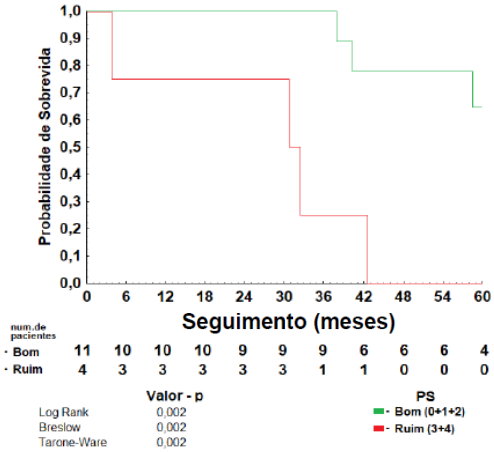
**Gráfico 6 -** Teste de Log-rank – Variável: IPI modificado (2+3+4+5 vs 0+1)



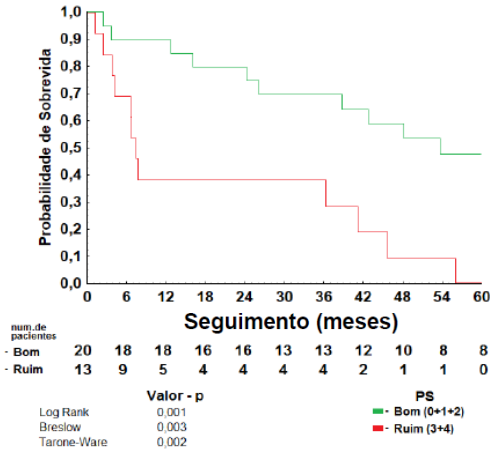

a) Teste de Log-Rank para SG
HR (IC95%)= 7,005 (2,671; 18,37)




b) Teste de Log-Rank para SG 24 meses
HR (IC95%)= 5,851 (1,568; 21,83)

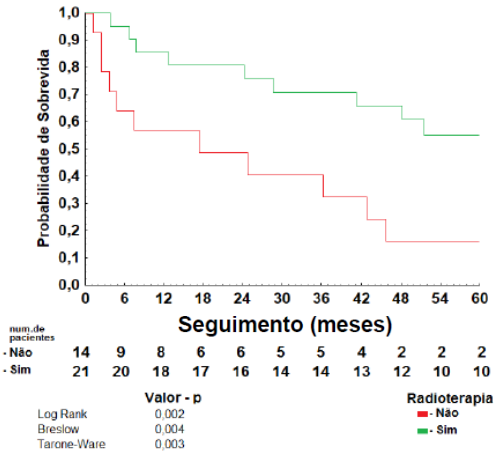



c) Teste de Log-Rank para SLD
HR (IC95%)= 10,272 (1,807; 58,393)

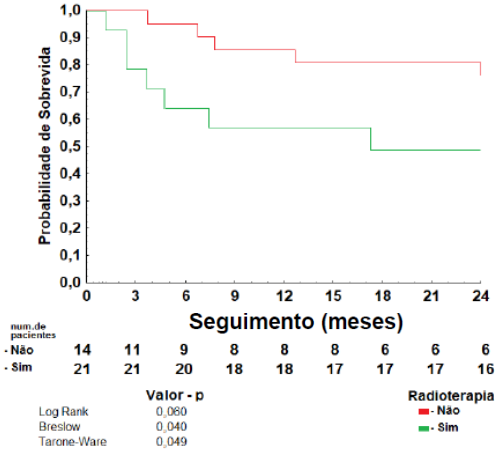



d) Teste de Log-Rank para SLP
HR (IC95%)= 3,951 (1,651; 9,454)

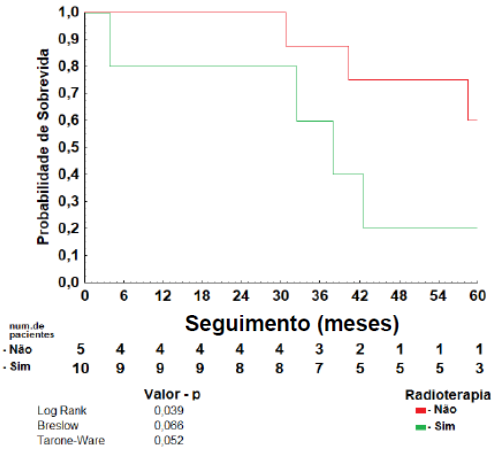
**Gráfico 7 -** Teste de Log-rank – Variável: Performance Status (3+4 vs 0+1+2)



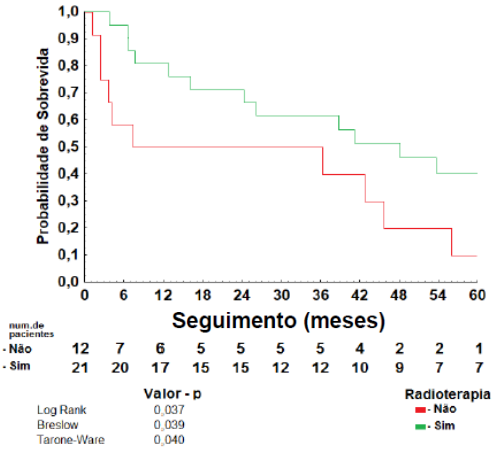

a) Teste de Log-Rank para SG
HR (IC95%)= 3,413 (1,516; 7,683)




b) Teste de Log-Rank para SG 24 meses
HR (IC95%)= 2,874 (0,908; 9,095)

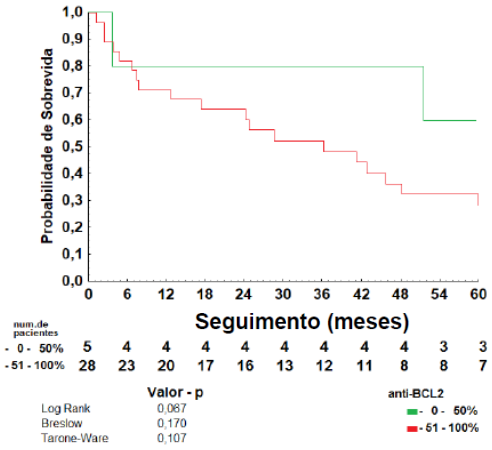



c) Teste de Log-Rank para SLD
HR (IC95%)= 4,126 (0,966; 17,623)

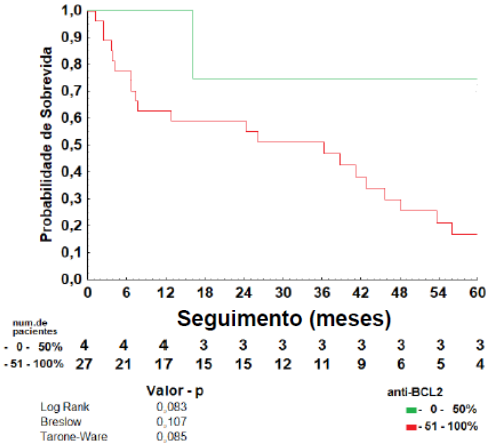



d) Teste de Log-Rank para SLP
HR (IC95%)= 2,281 (1,027; 5,067)

**Gráfico 8 -** Teste de Log-rank – Variável: Radioterapia (Não realizada vs Realizada)

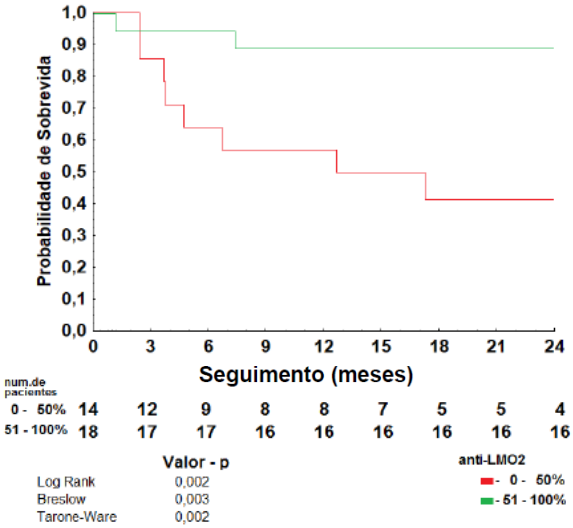



a) Teste de Log-Rank para SG
HR (IC95%)= 3,559 (0,833; 15,196)



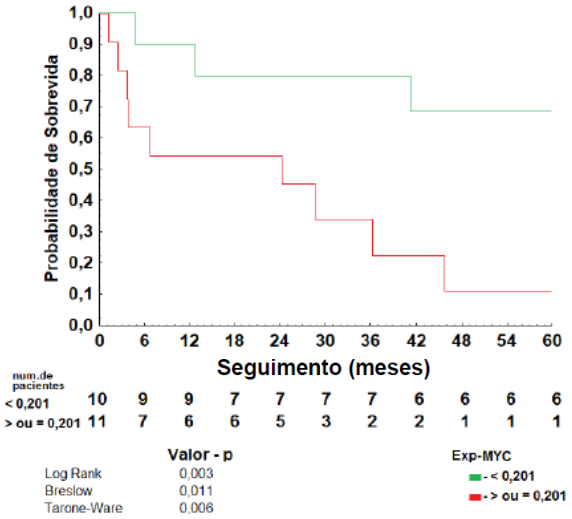

b) Teste de Log-Rank para SLP
HR (IC95%)= 3,376 (0,784; 14,534)

**Gráfico 9 -** Teste de Log-rank – Variável: Anti-BCL2 (51-100% vs 0-50%)

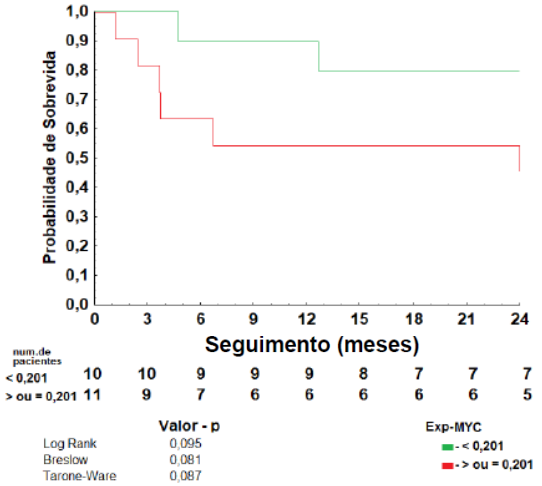



a) Teste de Log-Rank para SG 24 meses
HR (IC95%)=8,131 (1,737; 38,068)

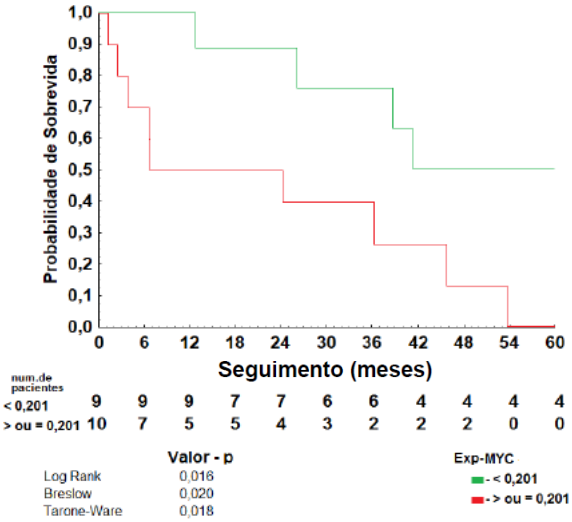
**Gráfico 10 -** Teste de Log-rank – Variável: anti-LMO2 (0-25% vs ≥26%)




a) Teste de Log-Rank para SG
HR (IC95%)= 6,117 (1,617; 23,149)

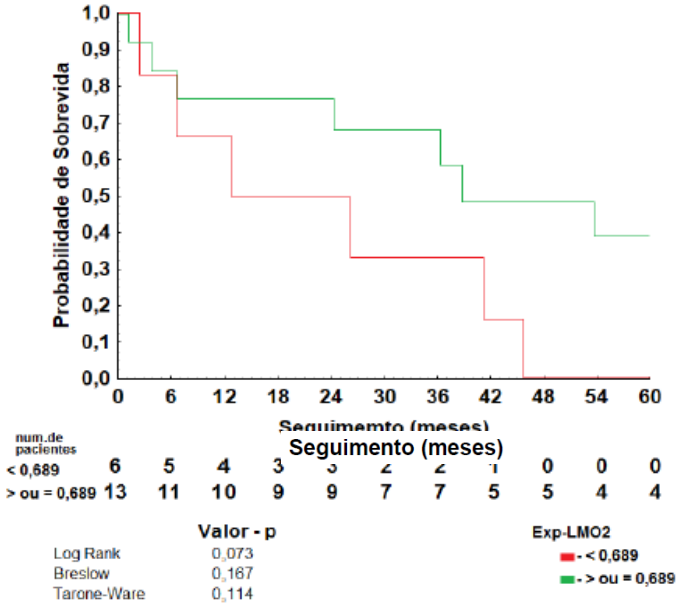



b) Teste de Log-Rank para SG 24 meses
HR (IC95%)= 3,597 (0,723; 17,888)



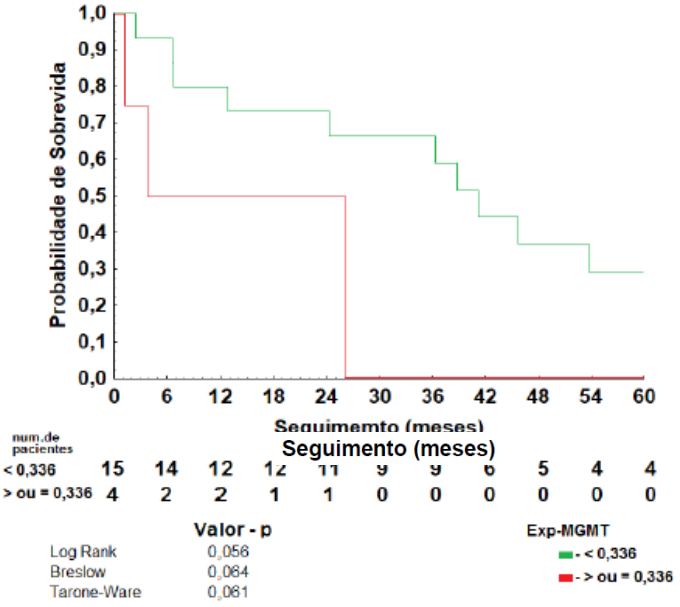

c) Teste de Log-Rank para SLP
HR (IC95%)= 3,96 (1,192; 13,147)

**Gráfico 11 -** Teste de Log-rank – Variável: Gene *MYC* (≥0,201041 vs <0,201041)




a) Teste de Log-Rank para SLP
HR (IC95%)= 2,718 (0,87; 8,493)

**Gráfico 12 -** Teste de Log-rank – Variável: Gene *LMO2* (<0,689232 vs ≥0,689232)




a) Teste de Log-Rank para SLP
HR (IC95%)=3,749 (0,879; 15,993)

**Gráfico 13 -** Teste de Log-rank – Variável: Gene *MGMT* (≥0,335666 vs <0,335666)

## 5.9 Fatores de Prognóstico para Mortalidade até a data de censura e Mortalidade em 2 anos após o diagnóstico

### 5.9.1 Análise Univariada

Análises univariadas para Mortalidade Global e Mortalidade em 2 anos foram realizadas para as variáveis estudadas, conforme demonstrado na Tabela 19.

Com relação à Mortalidade Global, Idade >60 anos IPI modificado ≥2, PS ≥3, ausência de tratamento radioterápico, CD3 negativo, expressão gênica de *MYC* ≥0,201041,BCL2 >51%, expressão gênica de *PD1* ≥2,00938, PD após a 1ª linha de tratamento estiveram associados com aumento de risco de óbito durante o seguimento em análise univariada (p ≤0,1).

Com relação à Mortalidade em até 2 anos após o diagnóstico, ausência de tratamento radioterápico, LMO2 ≤25% e refratariedade à primeira linha de tratamento (p=0,001) estiveram associados com maior risco de óbito (risco de morte em até 2 anos após diagnóstico) em análise univariada (p ≤0,1).

**Tabela 19 -** Análise univariada para Mortalidade Global e Mortalidade em 2 Anos

| **Variáveis** | **Óbito global** | | **Óbito em até 24 meses após o diagnóstico** | |
|---|---|---|---|---|
| | **OR (IC 95%)** | **valor p** | **OR (IC 95%)** | **valor p** |
| Idade (> 60 anos vs≤ 60 anos) | **6,61 (1,13-38,70)** | **0,027** | 2,18 (0,51-9,33) | 0,295 |
| IPI modificado (2+3+4+5 vs 0+1) | **6,13 (1,03-36,45)** | **0,036** | 3,88 (0,41-36,79) | 0,219 |
| P.S. (3+4 vs 0+1+2) | **9,33 (1,02-85,70)** | **0,028** | **8,5 (1,71-42,28)** | **0,006** |
| Radioterapia (Não vs Sim) | **8,00 (0,87-73,40)** | **0,043** | 2,74 (0,62-12,08) | 0,182 |
| COO (não-GCB vs GCB) | 4,50 (0,37-54,16) | 0,234 | 1,20 (0,12-11,87) | 0,880 |
| anti-CD3 (Negativo vs Positivo) | **13,80 (1,18-161,72)** | **0,015** | 1,67 (0,15-18,22) | 0,678 |
| anti-MYC (51-100% vs 0-50%) | 2,13 (0,42-10,75) | 0,364 | 2,50 (0,57-10,93) | 0,225 |
| anti-BCL2 (51-100% vs 0-50%) | **9,00 (1,13-71,96)** | **0,023** | 2,25 (0,47-10,78) | 0,312 |
| anti-LMO2 (0-25% vs 26-100%) | 1,05 (0,19-5,69) | 0,958 | **14,4 (2,31-89,94)** | **0,002** |
| anti-MGMT (Positivo x Negativo) | NA | NA | NA | |
| anti-PDCD1 (Positivo x Negativo) | 0,25 (0,01-4,60) | 0,328 | NA | |
| anti-POU2F1 (Positivo x Negativo) | NA | NA | NA | |
| gene *MYC* (≥0,201041 vs <0,201041) | **10,00 (0,91-110,29)** | **0,043** | 4,80 (0,68-33,80) | 0,112 |
| gene *BCL2* (≥0,3516 vs <0,3516 ) | 2,00 (0,29-13,74) | 0,488 | 2,57 (0,37-17,83) | 0,344 |
| gene *LMO2* (≥0,689232 vs <0,689232) | NA | 0,046 | 0,30 (0,05-1,99) | 0,215 |
| gene *MGMT* (≥0,335666 vs <0,335666) | 1,82 (0,16-20,71) | 0,635 | 3,3 (0,41-26,37) | 0,259 |
| gene *POU2F1* (≥1,44819 vs <1,44819) | 1,13 (0,17-7,24) | 0,903 | 0,60 (0,11-3,25) | 0,561 |
| gene *PDCD1* (≥2,00938 vs <2,00938) | **0,15 (0,02-1,70)** | **0,082** | 0,32 (0,03-3,56) | 0,352 |
| gene *BCL6* (≥2,73477 vs <2,73477) | 0,44 (0,06-3,11) | 0,419 | 0,60 (0,11-3,25) | 0,561 |
| Refratariedade (Sim vs Não) | NA | 0,034 | **88,00 (6,99-1108,27)** | **0,001** |
| PD após 1 linha tratamento (Sim vs Não) | **19,43 (2,03-185,73)** | **0,003** | 5,20 (0,9-30,08) | 0,057 |

## 5.10 Fatores de Prognóstico para Risco de Recaída e Refratariedade na primeira linha de tratamento

### 5.10.1 Análise Univariada

Em análise univariada, Idade > 60 anos foi associado a maior risco de refratariedade à primeira linha de tratamento oncológico com diferença estatisticamente significante (p ≤0,1). Idade >60 anos, IPI ≥2, CD3 negativo, expressão gênica de *MYC* ≥0,201041, expressão gênica de *PD1* ≥2,00938 estiveram associados a maior risco de recaída após a primeira linha de tratamento com diferença estatisticamente significante (p ≤0,1), conforme demonstrado na Tabela 20.

**Tabela 20 -** Análise univariada para Refratariedade e Recaída

| Variáveis | Refratariedade | | Recaída | |
|---|---|---|---|---|
| | **OR (IC 95%)** | **valor p** | **OR (IC 95%)** | **valor p** |
| Idade (>60 anos vs ≤ 60 anos) | **9 (0,76-106,01)** | **0,067** | **12,44 (1,31-117,93)** | **0,012** |
| IPI modificado (2+3+4+5 vs 0+1) | 6,75 (0,53-86,56) | 0,127 | **7,33 (1,17-46,05)** | **0,024** |
| P.S. (3+4 vs 0+1+2) | **NA** | **0,031** | NA | NA |
| Radioterapia (Não vs Sim) | **NA** | **0,031** | 5,5 (0,59-51,52) | 0,112 |
| COO (não-GCB vs GCB) | NA | NA | 2 (0,11-34,82) | 0,644 |
| anti-CD3 (Negativo vs Positivo) | 4 (0,27-58,56) | 0,309 | **12,62 (1,97-148,13)** | **0,021** |
| anti-MYC (51-100% vs 0-50%) | 1,17 (0,13-10,22) | 0,893 | 4 (0,69-23,23) | 0,115 |
| anti-BCL2 (51-100% vs 0-50%) | **NA** | **0,008** | 5,75 (0,62-54,43) | 0,102 |
| anti-LMO2 (0-25% vs 26-100%) | 1(0,07-14,64) | 1 | 1,67 (0,28-10,09) | 0,583 |
| anti-MGMT (1-100% vs 0%) | NA | | NA | |
| anti-PDCD1 (1-100% vs 0%) | NA | | NA | |
| anti-POU2F1 (1-100% vs 0%) | NA | | NA | |
| gene *MYC* (≥0,201041 vs <0,201041) | 4,5 (0,25-80,57) | -0,322 | **7,2 (0,62-83,35)** | **0,098** |
| gene *BCL2* (≥0,3516 vs <0,3516 ) | 4,5 (0,25-80,57) | 0,322 | 1,2 (0,15-9,77) | 0,868 |
| gene *LMO2* (≥0,689232 vs <0,689232) | **NA** | **0,024** | **NA** | **0,085** |
| gene *MGMT* (≥0,335666 vs <0,335666) | NA | 0,371 | 1,09 (0,09-13,78) | 0,948 |
| gene *POU2F1* (≥1,44819 vs <1,44819) | 3 (0,19-47,96) | 0,453 | 0,86 (0,11-6,62) | 0,885 |
| gene *PDCD1* (≥2,00938 vs <2,00938) | NA | 0,264 | **0,11 (0,01-1,15)** | **0,052** |
| gene *BCL6* (≥2,73477 vs <2,73477) | 0,20 (0,01-3,66) | 0,285 | 0,86 (0,11-6,62) | 0,885 |
| Refratariedade (Sim vs Não) | NA | 0,403 | NA | 0,127 |
| PD após 1 linha tratamento (Sim vs Não) | 4 (0,34-47,11) | 0,267 | **NA** | **0,001** |

## 5.11 Correlação entre expressão gênica e expressão proteica

As Tabelas 21, 22 e 23 apresentaram as correlações entre as expressões gênicas (RT-qPCR normatizadas de *MYC, BCL2* e *LMO2*) e suas proteínas correspondentes (anti-MYC, anti-BCL2 e anti-LMO2). Teste de concordância para BCL6 não pode ser realizado, pois não foram realizadas reações de IHQ prospectivamente neste estudo. Os outros genes/proteínas de interesse (PD1, MGMT e OCT1) não puderam ser calculados devido à ausência ou ao excesso de expressão gênica ou proteica.

Houve correlação moderada entre a expressão gênica de *MYC* (<0,201041 vs ≥0,201041) e sua respectiva proteína (0/1/2 vs 3/4), com coeficiente de Kappa=0,596 e valor p=0,022. O mesmo ocorreu entre a expressão gênica de *BCL2* (<0,3516 vs ≥0,3516) e sua respectiva proteína (0/1/2 vs 3/4), com coeficiente de Kappa=0,426 e valor p=0,042.

O Anexo P demonstra as médias e medianas de expressão gênica normatizada em cada quartil de IHC da proteína correspondente.

**Tabela 21 -** Correlação entre IHQ proteína MYC e expressão gênica *MYC*

| **MYC** | | **expressão gênica** | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **<0.201041** | **≥0.201041** | total %(n) |
| **IHQ Anti-MYC** | **0%-50%** | 35 % (7) | 10 % (2) | 45 % (9) |
| | **51%-100%** | 10 % (2) | 45 % (9) | 55 % (11) |
| | total %(n) | 45 % (9) | 55 % (11) | **100 % (20)** |
| **Porcentagem de concordância** | | 80,0% | | **Acurácia Geral** |
| **Porcentagem de discordância** | | 20,0% | | |
| **Coeficiente de Kappa** | | | | classificação** |
| **valor** | | 0,596 | | **moderada** |
| **teste hipótese** | H0: igual a zero | **p = 0,022** | | **rejeita H0** |
| **sensibilidade** | | 0,778 | | |
| **especificidade** | | 0,818 | | |
| **valor preditivo positivo** | | 0,778 | | |
| **valor preditivo negativo** | | 0,818 | | |
| **Coef de Youden** | | 0,596 | | |
| **Eficiência** | | 0,798 | | |

* considerando expressão gênica como teste gold (ouro)
** classificação da concordância obtida pelo coeficiente de Kappa

**Tabela 22 -** Correlação entre IHQ proteína BCL2 e expressão gênica *BCL2*

| BCL2 | | expressão gênica | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **<0.3516** | **≥0.3516** | total %(n) |
| **IHQ Anti-BCL2** | **0%-50%** | 14,3 % (3) | 0 % (0) | 14,3 % (3) |
| | **51%-100%** | 23,8 % (5) | 61,9 % (13) | 85,7 % (18) |
| | total %(n) | 38,1 % (8) | 61,9 % (13) | **100 % (21)** |
| **Porcentagem de concordância** | | 76,2% | | **Acurácia Geral** |
| **Porcentagem de discordância** | | 23,8% | | |
| **Coeficiente de Kappa** | | | | classificação** |
| **valor** | | 0,426 | | **moderada** |
| **teste hipótese** | H0: igual a zero | **p = 0,042** | | **rejeita H0** |
| **sensibilidade** | | 0,375 | | |
| **especificidade** | | 1,000 | | |
| **valor preditivo positivo** | | 1,000 | | |
| **valor preditivo negativo** | | 0,722 | | |
| **Coef de Youden** | | 0,375 | | |
| **Eficiência** | | 0,688 | | |

* considerando expressão gênica como teste gold (ouro)
** classificação da concordância obtida pelo coeficiente de Kappa

**Tabela 23 -** Correlação entre IHQ proteína LMO2 e expressão gênica *LMO2*

| LMO2 | | expressão gênica | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **<2.57603** | **≥2.57603** | total %(n) |
| **IHQ Anti-LMO2** | **0%-25%** | 33,3 % (7) | 14,3 % (3) | 47,6 % (10) |
| | **26%-100%** | 23,8 % (5) | 28,6 % (6) | 52,4 % (11) |
| | total %(n) | 57,1 % (12) | 42,9 % (9) | **100 % (21)** |
| **Porcentagem de concordância** | | 61,9% | | **Acurácia Geral** |
| **Porcentagem de discordância** | | 38,1% | | |
| **Coeficiente de Kappa** | | | | classificação** |
| **Valor** | | 0,243 | | **Fraca** |
| **teste hipótese** | H0: igual a zero | p = 0,387 | | aceita H0 |
| **sensibilidade** | | 0,583 | | |
| **especificidade** | | 0,667 | | |
| **valor preditivo positivo** | | 0,700 | | |
| **valor preditivo negativo** | | 0,545 | | |
| **Coef de Youden** | | 0,250 | | |
| **Eficiência** | | 0,625 | | |

* considerando expressão gênica como teste gold (ouro)
** classificação da concordância obtida pelo coeficiente de Kappa

## 6 DISCUSSÃO

Este estudo foi desenhado como uma coorte unicêntrica retrospectiva. Apesar das limitações deste tipo de estudo, na literatura se encontram disponíveis principalmente estudos de coorte unicêntricos, retrospectivos com amostras populacionais pequenas em LPSNC (menores que 50) [24,131,224,225]. O número de pacientes obtido foi levado em consideração no plano de análises estatísticas, sendo planejadas apenas estatística descritiva e análises univariadas. Análises multivariadas, regressões logísticas e de Cox são geralmente utilizadas para identificação de fatores de risco e biomarcadores, porém apresentam resultados menos tangíveis e confiáveis quando o número de observações é pequeno e múltiplos fatores confundidores precisam ser ajustados. Portanto, não elas não foram realizadas [226]. Estudos com amostras pequenas podem limitar as análises estatísticas, principalmente quando múltiplas variáveis são analisadas e comparadas, apresentando maiores margem de erro, intervalos de confiança, resultados falso positivos, podendo hiperestimar a magnitude da associação, com menor precisão dos resultados e conclusões que precisam ser interpretadas com cautela [226]. O tamanho do efeito esperado também tem impacto no cálculo do tamanho amostral, por exemplo. Estudos que analisam biomarcadores com baixo OR ou HR esperados precisam de amostras maiores para que o efeito real possa ser diferenciado de uma variação aleatória [227].

Em nosso estudo, a maioria dos pacientes era do sexo feminino (57,1%) e a mediana de idade ao diagnóstico foi de 62 anos, similar à literatura. Houve predomínio do sexo feminino, com mediana de idade entre 65 e 67 anos em aproximadamente 51% dos pacientes [19,228].

Dez pacientes tiveram diagnóstico de LPSNC com 70 anos ou mais, representando 29% dos casos. O acometimento de população idosa tem sido verificado no LPSNC. Segundo dados do *Central Brain Tumor Registry of the United States* and SEER, foi evidenciado um aumento de incidência de LPSNC acima de 70 anos entre 1973 e 2013 (de 0,2 para 2,1/100.000 pessoas) [46]. Apesar de idade não ser o melhor biomarcador para tolerabilidade ao

tratamento ou preditor de toxicidade, pacientes acima de 70 anos apresentam mais frequentemente redução de suas funções fisiológicas, que impactam na farmacocinética e farmacodinâmica dos fármacos utilizados no tratamento oncológico, o que colabora para o aumento do risco de toxicidade e morbi-mortalidade [229]. Como discutido posteriormente, o tratamento oncológico na população estudada foi individualizado, e a idade dos pacientes foi um dos determinantes na escolha terapêutica, a fim de minimizar a toxicidade e proporcionar melhor qualidade de vida.

Vários fatores clínicos são considerados na decisão do tratamento oncológico, incluindo o *performance status*. Neste estudo, apesar de a maioria (22/35; 65,7%) dos pacientes apresentar inicialmente PS ≥2, quase a totalidade (33/35; 94,2%) foi submetida a alguma linha de tratamento oncológico. Dados semelhantes foram demonstrados num estudo retrospectivo com 378 pacientes, em que 58% dos pacientes apresentavam PS ≥2 e 98% foram submetidos a algum tipo de tratamento oncológico [230]. *Performance status* está associado à sobrevida global em pacientes com LDGCB e LPSNC, assim como em outros tumores. Geralmente um PS avançado está associado a doença em estádio mais avançado, com pior prognóstico e menor tolerabilidade ao tratamento oncológico, limitando opções terapêuticas. Àinda que contribuísse para o incremento de suas toxicidades, conforme demonstrado, não foi impeditivo de tratamento oncológico na presente coorte.

Conforme previamente exposto, a maioria dos pacientes apresentava idade >60 anos e PS≥2. Estes foram os primeiros fatores de mau prognósticos identificados em pacientes com LPSNC, corroborado por diversos estudos independentemente da escolha terapêutica [95,230-232]. Em nosso estudo, idade >60 anos foi associada a piores SG, SLD, SLP e refratariedade ao tratamento e P.S. ≥3 foram associados a piores SG, SG 2 anos, SLD e SLP (valor p ≤0,1), alinhados com dados da literatura. Tais dados demonstram a necessidade de novas opções terapêuticas para esta população para que causem menor morbi-mortalidade.

Apesar de punção lombar ser contraindicada em pacientes com LPSNC em até 42% dos pacientes [233], nesta coorte foi realizada em quase a totalidade dos pacientes (97%). No entanto, a maioria (91%) apresentou citologia oncótica

negativa, similar a dados da literatura. Dados publicados evidenciam citopatologia oncótica positiva em apenas 13% dos casos (quando associado à citometria de fluxo) [234,235]. A pesquisa de células neoplásicas como citologia é um método de baixa sensibilidade e com alta taxa de resultados falso negativos, mesmo em pacientes com evidência de extensa infiltração meníngea, o que poderia justificar os resultados encontrados [230,236]. Apesar disso, há relatos de diagnóstico de LPSNC pela associação de citologia oncótica e citometria de fluxo, demonstrando que tal procedimento possui valor clínico e prognóstico e foi factível nesta população [234].

A localização topográfica do LPSNC no SNC tem importante papel prognóstico, além de ter impacto na realização do procedimento de biópsia esterotáxica. Diferentemente do estudo conduzido por Ferreri *et al*., no qual apenas 36% dos pacientes apresentavam acometimento de regiões profundas em SNC (regiões periventriculares, gânglios da base, corpo caloso, tronco cerebral e cerebelo), neste estudo a maioria (77%) apresentava acometimento de regiões profundas do SNC evidenciado por exames de imagem [230].

Considerando os fatores prognósticos já descritos, como idade, PS e acometimento de regiões profundas, a maioria dos pacientes apresentava risco IPI modificado de risco intermediário e alto (80%), o que demonstra a alta prevalência de fatores de mau prognóstico na população estudada. É descrito que pacientes com IPI modificado de risco intermediário e alto estão associados a pior prognóstico, com SG em 2 anos entre 48%-57% e 17%-24%, respectivamente, independentemente do tratamento utilizado, similares aos encontrados no presente estudo [230]. Em nosso estudo, em análise univariada, o IPI modificado ≥2 foi associado a pior SG, SLD, SLP e maior recaída ($p \leq 0,1$). Desta forma, confirma-se tratar de um fator de prognóstico adverso na nossa população, corroborando dados de Ferreri *et al*. e Cady *et al*. [68,69]. A análise de IPI modificado é de fácil execução, o que permite a identificação precoce de pacientes com mau prognóstico, que muitas vezes necessitam de acompanhamento médico mais frequente e tratamentos mais agressivos. Portanto, deve ser realizado assim que possível nos pacientes com LPSNC.

O tipo de acesso e o fluxo de sistema público de saúde também pode ter impacto prognóstico, ao retardar o diagnóstico e na escolha teratêutica. Neste

estudo, os pacientes eram referenciados de serviços primários e secundários de saúde por suspeita de tumores em SNC ao Serviço de Neurocirurgia do HC-FMUSP para realização de procedimentos diagnósticos e terapêuticos. Após suspeita de linfoma em SNC, os pacientes eram então encaminhados ao Serviço de Hematologia do HC-FMUSP para acompanhamento e tratamento. Portanto, a data de confirmação diagnóstica na nossa população dependia de variáveis como demora para obtenção de acesso aos serviços de saúde e à inespecificidade dos sintomas clínicos iniciais do LPSNC, o que comumente pode levar à demora diagnóstica. Diagnósticos tardios podem levar à deterioração clínica dos pacientes, o que interfere na escolha do tratamento e tolerância ao mesmo e causa impacto no prognóstico, na SG e nas taxas de resposta, conforme demonstrado num estudo brasileiro com pacientes com LDGCB sistêmico tratados no HC-FMUSP [237]. Além disso, a infiltração do linfoma no SNC por longo período pode levar a dano tecidual, o que dificulta o diagnóstico e piora piorar o PS (com menor tolerabilidade ao tratamento), levando à perda de autonomia, a danos neurológicos com sintomas debilitantes muitas vezes irreversíveis apesar da obtenção de RC e ao tratamento, com alta morbidade da patologia [238]. No presente estudo, não foi possível calcular o intervalo entre o início de sintomas e o procedimento diagnóstico realizado. No entanto, conforme discutido posteriormente, as taxas de SG observadas neste estudo foram semelhantes às dos principais estudos realizados em países desenvolvidos [22,23,68]. Isso sugere que este intervalo pode ter sido semelhante. É provável que a maioria dos pacientes em todo o mundo tenha alguma demora diagnóstica devido aos diagnósticos diferenciais nesta população.

Considerando os dados obtidos e alinhados com boas práticas clínicas, pôde-se observar individualização na escolha terapêutica baseada nas condições clínicas dos pacientes. Alinhada com literatura médica, a maioria dos pacientes foi submetida à quimioterapia baseada em HD-MTX (63,6%). Monoquimioterapia ou WBRT isolada foram indicadas principalmente para pacientes isosos, com mediana etária de 69 anos devido à maior tolerabilidade e menor toxicidade aguda, apesar de proporcionarem taxas de resposta inferiores e menos duradouras [57,98,239]. A taxa de resposta global encontrada após a primeira linha de tratamento foi de 72,8%, semelhante a dados

publicados por Ferreri *et al*. (RG 69%) em pacientes tratados com HD-MTX [230]. Estes dados confirmam a qualidade de tratamento oferecido no complexo HC-FMUSP, similar a dados apresentados internacionalmente.

WBRT foi prescrita como consolidação de tratamento ou tratamento isolado. A maioria dos pacientes (9/12; 75%) recebeu radioterapia como regime de consolidação após indução, por apresentarem melhores condições clínicas satisfatórias e bom PS. Radioterapia isolada foi prescrita principalmente para pacientes sem condições clínicas de tolerar tratamentos oncológicos com maior toxicidade. Em nosso estudo, tratamento com radioterapia foi associado com melhores SG, SLD, SLP (valor p ≤0,1). Como a análise multivariada não foi realizada, a interpretação de radioterapia como fator de bom prognóstico deve ser considerada com cautela, principalmente porque a radioterapia isolada e a radioterapia como regime de consolidação não foram analisadas separadamente como fator prognóstico, devido ao baixo número de pacientes. No entanto, o potencial benefício da radioterapia é discutido na literatura, principalmente como tratamento isolado, por exemplo. Em um estudo retrospectivo com 82 pacientes, a radioterapia isolada foi associada à melhor SG quando comparada a tratamento suportivo em pacientes com LPSNC e PS ruim, incluindo em pacientes idosos, podendo ser utilizada como terapia em pacientes com condições clínicas limítrofes [240]. O benefício da radioterapia como regime de consolidação é questionável, principalmente em face de novas opções terapêuticas e risco de neurotoxicidade [22].

Apesar de um possível ganho de SG com WBRT, é importante ressaltar que, de modo geral, os pacientes submetidos à radioterapia não apresentavam dados/acompanhamento neurológico ou cognitivo progressivos registrados no prontuário, de forma que a neurotoxicidade tardia não pôde ser analisada neste estudo. Isso é de extrema importância na nossa coorte, por se tratar majoritariamente de população idosa e pelo fato de a maioria dos pacientes ter sido submetida a tratamento radioterápico. Dessa forma, dados sobre opções terapêuticas e neurotoxicidade neste estudo necessitam ser interpretados com cautela. Num estudo conduzido por Ferreri *et al*., WBRT foi associado a declínio neurológico de funções executoras e de aprendizado em 50% dos pacientes em até 2 anos [20].

Apesar da alta taxa de resposta global aos tratamentos oncológicos e radioterápicos descritos na literatura, existe uma alta taxa de recorrência e refratariedade (50% e 30%, respectivamente). A recaída e refratariedade após tratamento oncológico estão associadas a pior prognóstico [93]. Em nosso estudo, a taxa de refratariedade (27,30%) foi similar à literatura médica. Refratariedade à primeira linha de tratamento e PD após a primeira linha de tratamento estiveram associados a pior prognóstico, incluindo piores SG, SG 2 anos, SLP (valor p ≤0,1), conforme esperado.

Novos estudos clínicos e novas opções terapêuticas têm surgido no LPSNC. Em nosso estudo, nenhum paciente foi submetido a tratamento com rituximabe ou TMO, o qual tem sido adicionado ao serviço do HC-FMUSP em 2018, após a data limite de seleção dos pacientes.

Resseção neurocirúrgica não foi recomendada como opção terapêutica em nenhum dos pacientes desta coorte, por não fazer parte do arsenal terapêutico e pelo fato de LPSNC ser uma patologia multifocal [241]. Isso também demonstra possivelmente o alto grau de suspeição de LPSNC em exames de imagem, com indicação do procedimento cirúrgico correto.

O presente estudo confirmou a alta mortalidade do LPSNC, com SG mediana de 42,6 meses (IC95% 26,6-58,6 meses), semelhante aos dados da literatura, cuja SG mediana varia entre 20,6 meses (IC95% 12,4 a 33,4 meses) e 60 meses em pacientes tratados com radioterapia isolada e HD-MTX, respectivamente [198,203,231]. As SG em 24 e 48 meses (65,5% e 43,8%, respectivamente) também foram semelhantes aos dados da literatura médica, na qual pacientes são submetidos a tratamento basedo em HD-MTX (52 ±4% e 43,8%, respectivamente) [242,243] [53]. Dados do SEER têm demonstrado ganho de SG em 5 anos entre os períodos de 1992-1994 e 2004-2006 de 19,1% (IC95%: 14,8-23,8) e 30,1% (IC95%: 24,2-28,1%), respectivamente, devido às novas opções terapêuticas disponíveis [19]. Contudo, tal ganho de sobrevidas não pode ser analisado no presente estudo, pois os pacientes não foram separados por período de inclusão devido ao baixo tamanho amostral.

Com uma mediana de tempo de seguimento de 41 meses (1,1- 171,8), foi evidenciada uma alta taxa de mortalidade (74%), semelhante à maioria dos estudos disponíveis. Essa elevada mortalidade pode ser explicada pela

associação de diversos fatores que, em conjunto, conferiram prognóstico adverso. Destacamos características clínico-laboratoriais desfavoráveis, como elevado IPI ao diagnóstico, idade ao diagnóstico e PS inicial >2, entre outras. Tais dados demonstram a necessidade de diagnóstico mais precoce do LPSNC, antes da deterioração clínica, tratamento individualizado e o uso de novas opções terapêuticas, como *target therapies*.

Apesar de todos os pacientes terem sido acompanhados clinicamente durante ou após o tratamento oncológico, dados sobre a *causa mortis* não se encontravam disponíveis. A maioria dos pacientes (21/26; 80,7%) apresentava doença em atividade documentada na última consulta médica, sugerindo que a *causa mortis* poderia estar relacionada à progressão tumoral. Tais dados estão alinhados com um grande estudo retrospectivo com 370 pacientes tratados com quimioterapia e/ou radioterapia, em que a maioria (70,1%) evoluiu a óbito após 24 meses de seguimento, sendo as principais causas de óbito relacionadas ao linfoma (87%), à toxicidade do tratamento (8%), entre outros fatores [230].

Biomarcadores moleculares também foram selecionados e estudados, objetivando melhor compreensão da patogênese tumoral e identificação de fatores prognósticos. No presente estudo, a expressão gênica foi estudada utilizando o qRT-PCR, por ser considerado um método rápido, de alta sensibilidade e especificidade para a quantificação de expressão gênica [244]. Em nosso estudo, os *guidelines* MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) foram utilizados seguindo padronização internacional da técnica e dos descritores [204]. Foi observada ausência de amplificação gênica entre 34,3% e 40% das amostras. Os estudos foram realizados em amostras parafinadas, algumas delas bastante antigas. Vários fatores podem justificar a ausência de amplificação, como a possível degradação do RNA, a condição de emblocamento das amostras em parafina das amostras e a reduzida quantidade de tecido tumoral emblocado, pois, na maioria das biópsias, havia escassa quantidade amostral. Dentre outros fatores que podem ter interferido na qualidade do RNA extraído de amostras FFPE, estão a demora na fixação do material após a realização da biópsia, levando à degradação do RNA induzido por autólise e a fixação do tecido com formalina

não tamponada, levando à degradação ácida do RNA [245,246]. Tais fatores podem ter ocorrido na nossa população. Apesar disso, não foi evidenciada diferença estatisticamente significante das características clínicas e laboratoriais entre os pacientes da coorte analisada para expressão gênica e os que foram excluídos. Assim, afasta-se qualquer suspeição de seleção de pacientes de melhor ou pior prognóstico do ponto de vista clínico e laboratorial, já que os pacientes avaliados são representativos da amostra total.

A curva de amplificação das eficiências gênicas confirmam a qualidade das reações de RT-qPCR. O gene de referência *GUSB* foi selecionado como gene de referência/controle endógeno para controle e verificação das possíveis variações ou interferentes da reação de RT-qPCR e para análise da eficiência e da quantidade de RNA total [245,247]. Neste estudo, os dados quantitativos obtidos no RT-qPCR foram transformados em variáveis qualitativas pelo estabelecimento de pontos de corte obtidos em curvas de ROC. Isso foi necessário para a inclusão de pacientes com ausência absoluta de expressão dos genes selecionados. Estas amostras apresentaram amplificação do gene de referência e tiveram suas reações de RT-qPCR com expressão do gene de interesse indetectável. Estes resultados foram confirmados (resultado do *Ct* como indeterminado). É importante ressaltar que estas amostras tiveram reações com valor zero em até 5 dígitos decimais, apesar de realização da reação até o número máximo de ciclos. O significado deste resultado é que tais genes não eram expressos ou expressos em poucas células em baixo nível de maneira não detectável. Portanto, não podem ser excluídas de análises estatísticas e precisaram ser convertidas em variáveis categóricas [248].

A expressão gênica de *MYC* ≥0,201041 foi associada a piores SG, SG2 anos, SLP, óbito global e risco de recaída após tratamento (valor p ≤0,1), sendo considerado um biomarcador de mau prognóstico, o que corrobora dados da literatura médica. É sabido que hiperexpressão de MYC está associada à iniciação, à progressão e à manutenção tumoral, além de diversas neoplasias, como linfoma de Burkitt e Mieloma Múltiplo, o que confere um pior prognóstico [148,150].

Em nosso estudo, a maioria dos pacientes ficou acima dos pontos de corte estabelecidos para imunoexpressão proteica (60%) de MYC, porém sem

correlação prognóstica. Tal dado corrobora dados de Rubenstein *et al*., em cujo estudo prospectivo com 44 pacientes, a expressão gênica e proteica elevada de MYC (positividade nuclear >50%) foi identificada em 54% dos pacientes, porém sem correlação prognóstica [23]. O papel da expressão proteica de MYC também foi avaliado num estudo com 14 pacientes, onde a sua hipexpressão esteve associada à pior SG. No entanto, o ponto de corte utilizado foi de apenas 20%, diferentemente daquele utilizado em nosso estudo e no estudo de Rubenstein *et al*. [249]. Portanto, nosso estudo apresenta resultados alinhados com a literatura médica, demonstrando o papel prognóstico de MYC no LPSNC[75].

O gene *BCL2* regula a morte celular programada inclusive em linfócitos, e, quando hiperexpressa, pode bloquear a apoptose. Está associado à resistência à quimioterapia e à radioterapia, conferindo mau prognóstico[154,220,250,251]. Em nosso estudo, a maioria dos pacientes ficou acima dos pontos de corte estabelecidos para a expressão proteica de BCL2 (80%), similar a dados da literatura [252,253]. Sua hiperexpressão foi associada a piores SG e SLP (valor p ≤0,1), corroborando dados da literatura [252-254].

Tais dados precisam ser considerados conjuntamente com o tratamento recebido, pois nenhum paciente foi submetido à terapia com rituximabe. No LDGCB sistêmico, imunoexpressão de BCL2 é considerado um biomarcador de mau prognóstico, principalmente em estudos conduzidos na era pré-rituximabe[154,255]. Na era pós-rituximabe, o impacto prognóstico de hipexpressão de BCL2 parece ser reduzido. Num estudo com 399 pacientes, foi demonstrado que a adição de rituximabe ao esquema CHOP foi capaz de evitar a falha à quimioterapia em pacientes com hiperimunoexpressão de BCL2 [220]. Expressão gênica de *BCL2* ≥0,3516 não foi associada a nenhum dos desfechos clínicos estudados.

Em nosso estudo, o teste de correlação entre expressão gênica e expressão proteica pôde ser realizado apenas para MYC, BCL2 e LMO2. Não foi possível estabelecer ponto de corte para correlação de outros genes estudados devido ao excesso de expressão gênica indetectável (MGMT e PDCD1) ou excesso de hiperexpressão (POU2F1) [256].

Observamos correlação moderada (kappa entre 0,41-0,60) entre

expressão gênica e proteica de MYC, bem como de BCL2. Dados similares são encontrados na literatura médica, na qual a correlação entre expressão gênica e proteica é de apenas 40% (classificada como moderada). Isso deve-se a fatores como estabilidade proteica, taxa de transcrição e translação, taxa de degradação do mRNA, atividade do micRNA, regulação pós-transcripcional e de modificação pós-translacional [257]. De modo geral, o nível de transcriptoma não é diretamente proporcional ao nível de proteína, sendo insuficiente para explicar a relação entre genótipo e seu fenótipo [257]. A meia vida de uma proteína pode variar de minutos a dias, enquanto a taxa de degradação do mRNA fica em torno de 2-7 horas em mamíferos. Outro fator a ser considerado é que, nos mamíferos, há uma baixa taxa de transcrição de mRNA, quando comparado com à translação [258]. É comum a falta de proporcionalidade entre a expressão proteica e a expressão gênica de proteínas que não são controladas pela expressão gênica, mas por sua ativação, como é o caso das proteínas kinases cuja expressão gênica é constante, mas sua ativação varia ao longo do tempo [259]. Em estudos com células de câncer de mama, foi observada hiperexpressão proteica de POU2F1 sem concomitante hiperexpressão gênica (mRNA) possivelmente devido a alterações na metabolização e na degradação de POU2F1 [260]. Tais motivos podem explicar a ausência de correlação entre expressão gênica e proteica dos outros genes de interesse estudados e o fato de ter sido encontrada apenas correlação moderada para MYC e BCL2.

O gene *LMO2* e sua respectiva proteína possui papel crucial na hematopoiese e vem sendo estudado em tumores hematológicos, incluindo LPSNC [148]. Em nosso estudo, a maioria dos pacientes ficou acima dos pontos de corte para imunoexpressão proteica (51,4%) de LMO2. Alguns estudos têm demonstrado hiperexpressão de LMO2 em LPSNC quando comparados a LDGCB sistêmico. Num estudo com 32 pacientes com LPSNC, apenas 37% apresentavam imunoexpressão de LMO2, inferior ao nosso resultado [75]. No entanto, o ponto de corte utilizado por Four *et al*. foi de 30%, superior ao ponto de corte selecionado (25%) [75].

No nosso estudo, tanto a hiperexpressão proteica de LMO2 >25% quanto a gênica de *LMO2* ≥0,689232 estiveram associadas a melhor prognóstico (SG 2 anos e SLP, respectivamente, valor p ≤0,1). Tais dados

estão alinhados com dados da literatura médica, incluindo não apenas tumores hematológicos, mas outros como câncer de pâncreas, pulmão, entre outros[261,262].

O gene *MGMT* e sua proteína são frequentemente estudados em neoplasias devido ao seu impacto prognóstico e preditor de resposta a agentes alquilantes, usualmente utilizados no tratamento do LPSNC. Em nosso estudo, a mediana de expressão gênica do *MGMT* foi zero e nenhum paciente apresentou expressão proteica. É sabido que a metilação da região promotora de MGMT leva à ausência de expressão gênica e proteica, estando associada à patogênese de vários tumores, como carcinoma colorretal, carcinoma de pulmão, linfoma e glioblastoma [179]. Neste estudo, não foi realizada a análise de metilação da região promotora, porém a ausência de expressão proteica bem como a baixa expressão gênica poderiam ser secundárias à metilação da região promotora, com impacto prognóstico e talvez preditor de resposta a tratamentos com regimes alquilantes.

A expressão gênica de *MGMT* ≥0,335666 foi associada a pior prognóstico (SLP, valor p=0,056). No entanto, tais dados precisariam ser confirmados por análise multivariada conjuntamente com o tipo de tratamento recebido pelos pacientes e sua expressão proteica. O gene *MGMT* codifica uma proteína reparadora de DNA, que está associada na defesa celular contra mutagênese e toxicidade celular induzida por agentes alquilantes. Seu silenciamento genético está associado a melhor prognóstico (SG) nos pacientes que receberam quimioterapia com base em HD-MTX [29,176,252].

É sabido que o gene *POU2F1* (OCT1) codifica uma proteína com efeitos tumorigênicos [179]. Por esse motivo, as expressões gênica e proteica de POU2F1 (OCT1) foram analisadas, porém não foram associadas a nenhum dos desfechos clínicos estudados. O papel prognóstico de tal gene é conflitante entre diferentes estudos publicados. Em alguns estudos, a expressão proteica de POU2F1 foi associada à maior agressividade tumoral e pior prognóstico em tumores gástrico, de cólon, de próstata, de pulmão, de mama, entre outros [32]. Em outros estudos, a expressão gênica de *POU2F1* não foi considerada um biomarcador prognóstico [260].

Células cancerígenas apresentam mecanismos de escape ao sistema

imune, os quais têm sido considerados alvos terapêuticos e pesquisados também no LPSNC. A imunoexpressão de PDCD1 e PDL1 tem sido estudada como fator preditor de resposta e prognóstico em diferentes tumores [263,264]. Em nosso estudo, a mediana de expressão gênica de *PDCD1* foi zero, e a maioria dos pacientes (85%) não apresentou imunoexpressão proteica de PDCD1 nas células tumorais. Tais dados são discordantes da literatura. Num estudo com 32 pacientes com LPSNC, a imunoexpressão de PDCD1 no TIL e PDL1 nas células tumorais foi de 53% e de 37%, respectivamente. Num estudo com 20 pacientes, 60% apresentavam imunoexpressão de PDCD1 no TIL intratumoral[265].

No nosso estudo, a hipexpressão gênica de *PDCD1* ≥2,00938 foi associada a maior risco de recaída após tratamento e mortalidade global (valor p ≤0,1). No entanto, a expressão proteica de PDCD1 não foi associada a nenhum dos desfechos clínicos estudados, o que sugere não se tratar de um biomarcador prognóstico na nossa população. Num estudo retrospectivo com 76 pacientes conduzido por Cho *et al*., a expressão proteica de PDCD1 foi associada a piores SG e SLP, o que evidencia papel do microambiente tumoral no prognóstico destes pacientes [266]. Entretanto, o tamanho amostral e o ponto de corte para expressão proteica de PD1 foram diferentes (≥70 células/HPF) entre o nosso estudo e o estudo conduzido por Cho *et al*.

O papel do microambiente tumoral e a presença de TIL também foram estudados na nossa coorte, pela análise das reações de IHQ anti-CD3 previamente disponíveis. O CD3 é um complexo de proteínas transmembrana presente em linfócitos T, importante na ativação de linfócitos T citotóxicos e células T helper. Em nosso estudo, a imunoexpressão de CD3 foi pesquisada retrospectivamente em 92,4% dos pacientes (32/35), resultando ausente na maioria (28/32, 87,5%), conforme esperado no LPSNC subtipo LDCGB. A ausência de imunoexpressão de CD3 foi associada a maior risco de recaída após tratamento e maior mortalidade global (valor p ≤0,1). O complexo de proteínas CD3 é considerado um marcador de linhagem de células T e atua como um correceptor que se associa ao receptor de células T, com papel fundamental na resposta imune adaptativa [267]. Esse complexo está expresso em infiltração perivascular reativa de células T (TIL), sendo caracterizado

também por linfócitos reativos T isolados ou localizados entre parede vascular e as células neoplásicas [90].

Tais dados estão alinhados com a literatura, na qual a presença de infiltrado perivascular reativo de células T é considerado um biomarcador histopatológico de bom prognóstico. Num estudo com 73 pacientes com LPSNC, a presença de infiltrado perivascular de linfócitos T foi associada à melhor SG, independentemente do risco IPI modificado [56]. Importante ressaltar que *Ponzoni et al* realizou a análise qualitativa de TIL, e não quantitativa.

A expressão gênica de *BCL6* não foi associada a nenhum dos desfechos clínicos estudados, e sua expressão proteica não pôde ser estudada devido à falta de material histopatológico. O BCL6 é um importante regulador do sistema imune. Translocações cromossômicas de *BCL6* e de genes da cadeia de imunoglobulina são frequentes no LPSNC, com a ativação constitutiva do BCL6, levando à hiperexpressão gênica e proteica com consequente efeito tumorigênico [148,252,268,269]. Apesar de a imunoexpressão de BCL6 estar presente em aproximadamente 55% do LPSNC [270], sua importância prognóstica ainda é tema de discussão. Alguns estudos evidenciaram que a alta imunoexpressão de BCL6 (positividade nuclear >60%) foi associada a piores prognósticos (SG, SLP)[23,81]. Entretanto, estudos retrospectivos evidenciaram que a imunoexpressão de BCL6 estaria associada a melhor prognóstico (SG) [41].

## 7 CONCLUSÕES

- Com relação à expressão gênica normatizada temos que (em análise univariada): *MYC* ≥0,201041 foi associada a pior prognóstico (piores SG, SG em 2 anos e SLP; maior mortalidade global e risco de recaída); *BCL2* ≥0,3516 não foi considerada fator prognóstico; *LMO2* ≥0,689232 foi associada a melhor prognóstico (melhor SLP); *MGMT* ≥0,335666 foi associada a pior prognóstico (pior SLP); *PDCD1* ≥2,00938 foi associada a pior prognóstico (maior mortalidade global e risco de recaída); *POU2F1* ≥1,44819 e *BCL6* ≥2,73477 não foram consideradas fatores prognósticos;
- As características clínico-laboratoriais e de prognóstico desta coorte foram similares aos da literatura médica disponível. A mediana de idade ao diagnóstico foi de 62 anos, 77% apresentavam acometimento de regiões profundas de SNC ao diagnóstico e 80% apresentavam IPI modificado intermediário-alto. A SG mediana foi de apenas 42,6 meses (IC95% 26,6-58,6 meses), SLP mediana, de 41 meses (IC95% 19,7-62,4 meses) e SLD mediana, de 59,2 meses (IC95% 31,9-86,6 meses);
- Com relação à imunoexpressão proteica, temos que (em análise univariada): MYC >50% não foi considerada fator prognóstico; BCL2 >50% foi associada a pior prognóstico (piores SG e SLP; maior mortalidade global); LMO2 >25% foi associada a melhor desfecho clínico (melhor SG em 2 anos e menor mortalidade em 2 anos); expressão de MGMT, POU2F1 e PDCD1 não foram considerados fatores prognósticos e
- Houve correlação moderada entre a imunoexpressão proteica e a expressão gênica de MYC, bem como de BCL2.

# 8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1- Criação de banco de dados de pacientes do Serviço de Hematologia da FMUSP;
2- Realização de estudos retrospectivos multicêntricos em população brasileira, com uma coorte maior e realização de análises multivariadas e
3- Validação dos resultados encontrados em estudos prospectivos com LPSNC.

# 9 ANEXOS

**ANEXO A -** Características clínico-laboratoriais por paciente

(continua)

| | | | Pacientes que Evoluíram a Óbito | | | Pacientes vivos | | Características Clínicas | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pacientes | sexo | idade diagnóstico (anos) | óbito (a) | idade óbito (anos) | tempo entre diagnóstico e óbito meses | idade última consulta (anos) | tempo entre diagnóstico e última consulta (meses) | RISCO IPI modificado (b) | P.S inicial (c) | P.S inicial ≥2? (a) | Acometimento de regiões profundas em SNC? (a) | Citologia LCR positiva? (a) | Presença de HIC? (a) |
| P1 | 0 | 47,2 | 0 | | | 58,8 | 139,7 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| P2 | 0 | 54,0 | 1 | 54,6 | 7,3 | | | 2 | 4 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| P3 | 0 | 75,5 | 1 | 81,0 | 66,3 | | | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P4 | 0 | 67,9 | 1 | 75,6 | 92,4 | | | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| P6 | 1 | 62,0 | 0 | | | 68,1 | 73,8 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P7 | 1 | 82,2 | 1 | 82,4 | 2,4 | | | 2 | 4 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| P8 | 0 | 49,9 | 1 | 51,9 | 24,1 | | | 1 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| P9 | 0 | 72,9 | 1 | 79,3 | 76,6 | | | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| P10 | 1 | 61,1 | 1 | 61,2 | 1,1 | | | 2 | 3 | 1 | 0 | 2 | 1 |
| P11 | 1 | 78,7 | 1 | 81,1 | 28,5 | | | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| P13 | 1 | 49,8 | 1 | 53,2 | 41,0 | | | 2 | 3 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| P14 | 1 | 76,9 | 1 | 80,0 | 36,2 | | | 2 | 3 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| P15 | 1 | 77,5 | 1 | 78,1 | 6,7 | | | 2 | 3 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| P16 | 1 | 64,6 | 1 | 68,2 | 42,6 | | | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| P17 | 1 | 59,9 | 0 | | | 65,5 | 67,8 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| P18 | 1 | 76,6 | 1 | 80,4 | 45,5 | | | 2 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| P19 | 1 | 49,3 | 1 | 54,8 | 66,1 | | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P21 | 1 | 45,7 | 1 | 45,9 | 2,4 | | | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| P22 | 0 | 42,3 | 1 | 47,5 | 62,4 | | | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| P24 | 0 | 59,7 | 1 | 64,7 | 60,7 | | | 1 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| P25 | 1 | 56,5 | 1 | 60,8 | 51,4 | | | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| P26 | 1 | 28,0 | 0 | | | 34,9 | 82,8 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P27 | 1 | 53,1 | 0 | | | 67,4 | 171,8 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| P28 | 0 | 29,7 | 0 | | | 35,5 | 69,4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P30 | 1 | 66,9 | 1 | 69,0 | 24,7 | | | 1 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| P31 | 0 | 62,1 | 1 | 66,1 | 48,0 | | | 2 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| P32 | 1 | 66,2 | 1 | 67,6 | 17,2 | | | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| P36 | 0 | 41,2 | 0 | | | 45,3 | 49,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P37 | 1 | 65,9 | 1 | 66,9 | 12,6 | | | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| P40 | 0 | 83,9 | 1 | 84,2 | 3,7 | | | 2 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| P41 | 0 | 26,2 | 0 | | | 28,4 | 27,0 | 2 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| P42 | 1 | 73,6 | 0 | | | 74,9 | 16,1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| P43 | 1 | 69,0 | 1 | 69,3 | 3,7 | | | 1 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| P44 | 0 | 72,5 | 1 | 72,9 | 4,7 | | | 1 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| P51 | 0 | 56,6 | 1 | 57,2 | 7,7 | | | 1 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 |

a) 0= não, 1= sim; b) risco IPI modificado- Ferreri et al, 2003; c) PS inicial- Oken et al, 1982; d) 0= 0%, 1= entre 1% e 25%, 2= entre 26% e 50%, 3= entre 51% e 75%, 4= entre 76% e 100%, 5= Não Avaliável; e) 0= negativo, 1= positivo, 2= Não Avaliável; f) conforme critério de Hans, 0= GCB, 1= Não-GCB, 2= Não Avaliável; g) média da expressão gênica normatizada para os genes de interesse; h) 0= Resposta Completa, 1= Resposta Parcial, 2= Progressão de Doença, 3= Não Disponível; i) valores em branco correspondem a amostras não amplificadas

Características clínico-laboratoriais por paciente

(continuação)

| | Imuno-histoquímica das Proteínas de Interesse | | | | | | Imuno-histoquímica de Outras Proteínas Disponíveis (conforme disponibilidade e realização prévia) | | | | | | | Célula de Origem |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pacientes | anti-MYC (d) | anti-MGMT (d) | anti-PDCD1 (d) | anti-BCL2 (d) | anti-LMO2 (d) | anti-POU2F1 (d) | anti-CD20 (e) | anti-CD3 (e) | anti-CD56 (e) | Ki67 (e) | anti-BCL6 (e) | anti-CD10 (e) | anti-MUM1 (e) | COO SUBTIPO (f) |
| P1 | 2 | 0 | 0 | 4 | 2 | 4 | 1 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P2 | 1 | 5 | 0 | 4 | 4 | 3 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| P3 | 5 | 0 | 0 | 3 | 3 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P4 | 2 | 0 | 1 | 4 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P6 | 3 | 0 | 0 | 1 | 4 | 4 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| P7 | 3 | 0 | 0 | 4 | 1 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 |
| P8 | 4 | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | 1 |
| P9 | 4 | 0 | 0 | 4 | 3 | 4 | 1 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P10 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P11 | 4 | 0 | 0 | 3 | 3 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P13 | 3 | 0 | 0 | 4 | 2 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P14 | 4 | 0 | 0 | 4 | 3 | 4 | 1 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P15 | 4 | 0 | 4 | 4 | 0 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P16 | 1 | 0 | 0 | 3 | 4 | 4 | 1 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P17 | 2 | 0 | 1 | 2 | 2 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| P18 | 4 | 0 | 0 | 4 | 2 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P19 | 4 | 0 | 0 | 4 | 2 | 4 | 1 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P21 | 4 | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 |
| P22 | 3 | 0 | 0 | 4 | 4 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| P24 | 4 | 0 | 0 | 4 | 3 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P25 | 4 | 0 | 0 | 1 | 4 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| P26 | 1 | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 2 | 2 |
| P27 | 4 | 0 | 0 | 2 | 0 | 4 | 1 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P28 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| P30 | 3 | 5 | 0 | 4 | 0 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P31 | 3 | 0 | 0 | 3 | 3 | 4 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| P32 | 4 | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P36 | 3 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P37 | 2 | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| P40 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 | 1 | 1 |
| P41 | 3 | 0 | 0 | 4 | 4 | 4 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 1 |
| P42 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P43 | 4 | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| P44 | 1 | 0 | 0 | 3 | 0 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| P51 | 1 | 0 | 0 | 3 | 5 | 4 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |

a) 0= não, 1= sim; b) risco IPI modificado- Ferreri et al, 2003; c) PS inicial- Oken et al, 1982; d) 0= 0%, 1= entre 1% e 25%, 2= entre 26% e 50%, 3= entre 51% e 75%, 4= entre 76% e 100%, 5= Não Avaliável; e) 0= negativo, 1= positivo, 2= Não Avaliável; f) conforme critério de Hans, 0= GCB, 1= Não-GCB, 2= Não Avaliável; g) média da expressão gênica normatizada para os genes de interesse; h) 0= Resposta Completa, 1= Resposta Parcial, 2= Progressão de Doença, 3= Não Disponível; i) valores em branco correspondem a amostras não amplificadas

Características clínico-laboratoriais por paciente

(continuação)

| | Expressão Normatizada dos Genes de Interesse | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pacientes | MYC média (g) (i) | MGMT média (g) (i) | PDCD1 média (g) (i) | BCL2 média (g) (i) | LMO2 média (g) (i) | POU2F1 média (g) (i) | BCL6 média (g) (i) |
| P1 | 0,110 | 0,000 | 0,000 | 0,091 | 0,689 | 0,000 | 1,203 |
| P2 | | | | | | | |
| P3 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,130 | 2,576 | 4,386 | 4,923 |
| P4 | 0,000 | 0,336 | 0,000 | 0,645 | 0,157 | 1,568 | 1,703 |
| P6 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,197 | 7,140 | 0,000 | 3,297 |
| P7 | 0,341 | 0,000 | 0,000 | 1,842 | 0,138 | 1,722 | 3,277 |
| P8 | 0,235 | 0,000 | 0,000 | 2,205 | 0,000 | 0,000 | 0,648 |
| P9 | | | | | | | |
| P10 | 0,202 | 1,418 | 1,035 | 0,766 | 4,078 | 1,033 | 3,787 |
| P11 | 0,235 | 0,000 | 9,215 | 0,352 | 10,973 | 0,000 | 8,337 |
| P13 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 3,122 | 0,000 |
| P14 | 0,304 | 0,000 | 0,000 | 0,081 | 1,636 | 6,141 | 2,716 |
| P15 | 0,412 | 0,000 | 0,000 | 0,528 | 0,947 | 2,783 | 2,735 |
| P16 | | | | | | | |
| P17 | 0,030 | 0,011 | 0,000 | 0,079 | 1,991 | 1,448 | 0,639 |
| P18 | 0,371 | 0,000 | 0,000 | 1,472 | 0,451 | 0,000 | 1,113 |
| P19 | | | | | | 0,000 | 0,000 |
| P21 | | | | | | 0,000 | 0,000 |
| P22 | 0,475 | 0,000 | 1,730 | 5,566 | 17,506 | 1,683 | 7,376 |
| P24 | | | | | | | |
| P25 | | | | | | | |
| P26 | 0,000 | 0,000 | 6,405 | 1,159 | 1,051 | 6,301 | 9,091 |
| P27 | | | | | | | |
| P28 | | | | | | | |
| P30 | | | | | | | |
| P31 | | | | | | | |
| P32 | | | | | | | |
| P36 | | | | | | | |
| P37 | 0,070 | 0,218 | 0,000 | 0,324 | 0,065 | 4,481 | 1,640 |
| P40 | 0,214 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,436 | 0,000 | 0,271 |
| P41 | 0,641 | 0,070 | 4,159 | 0,652 | 7,785 | 0,000 | 5,446 |
| P42 | 0,198 | 2,524 | 2,663 | 1,189 | 13,780 | 2,828 | 3,346 |
| P43 | 0,201 | 10,072 | 2,009 | 0,564 | 6,560 | 2,134 | 3,427 |
| P44 | 0,178 | 1,318 | 0,592 | 1,194 | 3,463 | 0,568 | 1,705 |
| P51 | | | | | | | |

a) 0= não, 1= sim; b) risco IPI modificado- Ferreri et al, 2003; c) PS inicial- Oken et al, 1982; d) 0= 0%, 1= entre 1% e 25%, 2= entre 26% e 50%, 3= entre 51% e 75%, 4= entre 76% e 100%, 5= Não Avaliável; e) 0= negativo, 1= positivo, 2= Não Avaliável; f) conforme critério de Hans, 0= GCB, 1= Não-GCB, 2= Não Avaliável; g) média da expressão gênica normatizada para os genes de interesse; h) 0= Resposta Completa, 1= Resposta Parcial, 2= Progressão de Doença, 3= Não Disponível; i) valores em branco correspondem a amostras não amplificadas

#o valor 0,000 corresponde à ausência absoluta de expressão gênica, portanto um valor a ser considerado.

##NA- corresponde a reações de RT-qPCR que foram consideradas como não avaliáveis.

Características clínico-laboratoriais por paciente

(continuação)

| | Informações sobre Primeira Linha de Tratamento | | | | | | | | | Informações sobre Segunda Linha de Tratamento | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pacientes | TTO 1 Linha (a) | idade no TTO1 (anos) | Recebeu HD-MTX? (a) | duração TTO1 (meses) | melhor resposta clínica (h) | Apresentou PD? (a) | tempo entre final TTO 1 e PD (meses) | Recaída? (a) | Refratariedade? (a) | TTO 2 Linha (a) | Recebeu HD-MTX? (a) | idade no TTO2 (anos) | duração TTO2 (meses) | melhor resposta clínica (h) | Apresentou PD? (a) | tempo entre final TTO 2 e PD (meses) |
| P1 | 1 | 47,3 | 1 | 9,13 | 0 | 0 | | 0 | 0 | | | | | | | |
| P2 | 1 | 54,1 | 1 | 2,03 | 0 | 0 | | 0 | 0 | | | | | | | |
| P3 | 1 | 75,6 | 1 | 3,97 | 1 | 1 | 32,7 | | 0 | 1 | 1 | 78,7 | 2,5 | 1 | 1 | 11,9 |
| P4 | 1 | 67,9 | 1 | 5,00 | 1 | 1 | 21,0 | | 0 | 1 | 1 | 70,0 | 8,7 | 1 | 1 | 15,3 |
| P6 | 1 | 62,2 | 1 | 5,30 | 0 | 1 | 60,2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 67,7 | 2,8 | 0 | 0 | |
| P7 | 1 | 82,3 | 1 | 0,70 | 2 | 1 | 1,0 | | 1 | | | | | | | |
| P8 | 1 | 50,0 | 1 | 4,00 | 2 | 1 | 1,1 | | 1 | 1 | 0 | 50,4 | 1,0 | 0 | 1 | 10,8 |
| P9 | 1 | 73,0 | 0 | 5,00 | 0 | 0 | | 0 | 0 | | | | | | | |
| P10 | 1 | 61,2 | 1 | 0,13 | 2 | 1 | 0,0 | | 1 | | | | | | | |
| P11 | 1 | 78,8 | 1 | 5,50 | 1 | 1 | 17,8 | | 0 | 1 | 0 | 80,8 | 1,5 | 2 | 1 | 0,0 |
| P13 | 1 | 49,9 | 1 | 8,73 | 0 | 0 | | 0 | 0 | | | | | | | |
| P14 | 1 | 77,0 | 1 | 3,20 | 0 | 0 | | 0 | 0 | | | | | | | |
| P15 | 1 | 77,6 | 0 | 1,00 | 2 | 1 | 5,0 | | 1 | | | | | | | |
| P16 | 1 | 64,7 | 1 | 3,83 | 0 | 1 | 37,9 | 1 | 0 | | | | | | | |
| P17 | 1 | 60,1 | 1 | 5,97 | 0 | 0 | | 0 | 0 | | | | | | | |
| P18 | 1 | 76,8 | 1 | 0,60 | 0 | 1 | 42,4 | 1 | 0 | | | | | | | |
| P19 | 1 | 49,4 | 1 | 6,33 | 0 | 0 | | 0 | 0 | | | | | | | |
| P21 | 1 | 45,8 | 0 | 0,73 | 2 | 1 | 0,0 | | 1 | | | | | | | |
| P22 | 1 | 42,3 | 1 | 11,00 | 1 | 1 | 42,4 | | 0 | 1 | 1 | 46,9 | 4,5 | 2 | 1 | 0,8 |
| P24 | 1 | 59,8 | 1 | 5,80 | 1 | 1 | 49,0 | | 0 | 1 | 0 | 64,5 | 0,7 | 2 | 1 | 2,2 |
| P25 | 1 | 56,7 | 1 | 5,50 | 1 | 1 | 8,6 | | 0 | 1 | 1 | 58,1 | 4,2 | 1 | 1 | 20,0 |
| P26 | 1 | 28,1 | 1 | 2,27 | 1 | 0 | | | 0 | | | | | | | |
| P27 | 1 | 53,2 | 1 | 7,00 | 0 | 0 | | 0 | 0 | | | | | | | |
| P28 | 1 | 29,9 | 1 | 6,40 | 0 | 0 | | 0 | 0 | | | | | | | |
| P30 | 1 | 67,0 | 1 | 1,73 | 2 | 1 | 1,3 | | 1 | 1 | 0 | 67,2 | 1,0 | 2 | 1 | 0,9 |
| P31 | 1 | 62,1 | 1 | 7,47 | 0 | 0 | | 0 | 0 | | | | | | | |
| P32 | 1 | 66,3 | 1 | 2,20 | 2 | 1 | 0,4 | | 1 | 1 | 0 | 66,5 | 1,2 | 1 | 0 | |
| P36 | 1 | 41,4 | 1 | 6,90 | 0 | 0 | | 0 | 0 | | | | | | | |
| P37 | 1 | 66,1 | 0 | 2,37 | 1 | 0 | | | 0 | | | | | | | |
| P40 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | |
| P41 | 1 | 26,3 | 1 | 6,87 | 0 | 0 | | 0 | 0 | | | | | | | |
| P42 | 1 | 73,7 | 1 | 0,47 | 1 | 0 | | | 0 | | | | | | | |
| P43 | 1 | 69,2 | 0 | 1,07 | 2 | 1 | 0,0 | | 1 | | | | | | | |
| P44 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | |
| P51 | 1 | 56,7 | 1 | 3,27 | 2 | 1 | 3,4 | | 1 | | | | | | | |

a) 0= não, 1= sim; b) risco IPI modificado- Ferreri et al, 2003; c) PS inicial- Oken et al, 1982; d) 0= 0%, 1= entre 1% e 25%, 2= entre 26% e 50%, 3= entre 51% e 75%, 4= entre 76% e 100%, 5= Não Avaliável; e) 0= negativo, 1= positivo, 2= Não Avaliável; f) conforme critério de Hans, 0= GCB, 1= Não-GCB, 2= Não Avaliável; g) média da expressão gênica normatizada para os genes de interesse; h) 0= Resposta Completa, 1= Resposta Parcial, 2= Progressão de Doença, 3= Não Disponível; i) valores em branco correspondem a amostras não amplificadas

Características clínico-laboratoriais por paciente

(continuação)

| | Informações sobre Terceira Linha de Tratamento | | | | | | | Informações sobre Quarta Linha de Tratamento | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pacientes | TTO 3 Linha (a) | Recebeu HD-MTX? (a) | idade no TTO3 (anos) | duração TTO3 (meses) | melhor resposta clínica (h) | Apresentou PD? (a) | tempo entre final TTO 3 e PD (meses) | TTO 4 Linha (a) | Recebeu HD-MTX? (a) | idade no TTO4 (anos) | duração TTO4 (meses) | melhor resposta clínica (h) | Apresentou PD? (a) | tempo final TTO 4 e PD (meses) |
| P1 | | | | | | | | | | | | | | |
| P2 | | | | | | | | | | | | | | |
| P3 | 1 | 1 | 79,9 | 6,2 | 1 | 1 | 6,9 | | | | | | | |
| P4 | 1 | 1 | 72,0 | 6,0 | 1 | 1 | 13,0 | 1 | 1 | 73,1 | 9,0 | 0 | 1 | 6,8 |
| P6 | | | | | | | | | | | | | | |
| P7 | | | | | | | | | | | | | | |
| P8 | 1 | 1 | 51,4 | 4,4 | 2 | 1 | 0,6 | 1 | 0 | 51,8 | 0,4 | 2 | 1 | 0,3 |
| P9 | | | | | | | | | | | | | | |
| P10 | | | | | | | | | | | | | | |
| P11 | | | | | | | | | | | | | | |
| P13 | | | | | | | | | | | | | | |
| P14 | | | | | | | | | | | | | | |
| P15 | | | | | | | | | | | | | | |
| P16 | | | | | | | | | | | | | | |
| P17 | | | | | | | | | | | | | | |
| P18 | | | | | | | | | | | | | | |
| P19 | | | | | | | | | | | | | | |
| P21 | | | | | | | | | | | | | | |
| P22 | 1 | 1 | 47,3 | 1,4 | 2 | 1 | 0,3 | | | | | | | |
| P24 | | | | | | | | | | | | | | |
| P25 | 1 | 0 | 60,3 | 8,1 | 2 | 1 | 0,2 | | | | | | | |
| P26 | | | | | | | | | | | | | | |
| P27 | | | | | | | | | | | | | | |
| P28 | | | | | | | | | | | | | | |
| P30 | | | | | | | | | | | | | | |
| P31 | | | | | | | | | | | | | | |
| P32 | | | | | | | | | | | | | | |
| P36 | | | | | | | | | | | | | | |
| P37 | | | | | | | | | | | | | | |
| P40 | | | | | | | | | | | | | | |
| P41 | | | | | | | | | | | | | | |
| P42 | | | | | | | | | | | | | | |
| P43 | | | | | | | | | | | | | | |
| P44 | | | | | | | | | | | | | | |
| P51 | | | | | | | | | | | | | | |

a) 0= não, 1= sim; b) risco IPI modificado- Ferreri et al, 2003; c) PS inicial- Oken et al, 1982; d) 0= 0%, 1= entre 1% e 25%, 2= entre 26% e 50%, 3= entre 51% e 75%, 4= entre 76% e 100%, 5= Não Avaliável; e) 0= negativo, 1= positivo, 2= Não Avaliável; f) conforme critério de Hans, 0= GCB, 1= Não-GCB, 2= Não Avaliável; g) média da expressão gênica normatizada para os genes de interesse; h) 0= Resposta Completa, 1= Resposta Parcial, 2= Progressão de Doença, 3= Não Disponível; i) valores em branco correspondem a amostras não amplificadas

Características clínico-laboratoriais por paciente

(conclusão)

| | Informações sobre Quarta Linha de Tratamento | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pacientes | TTO 5 Linha (a) | Recebeu HD-MTX? (a) | idade no TTO5 (anos) | duração TTO5 (meses) | melhor resposta clínica (h) | Recebeu algum tratamento radioterápico? (a) | TMO? (a) |
| P1 | | | | | | 1 | 0 |
| P2 | | | | | | 0 | 0 |
| P3 | | | | | | 1 | 0 |
| P4 | 1 | 1 | 74,4 | 5,0 | 0 | 1 | 0 |
| P6 | | | | | | 1 | 0 |
| P7 | | | | | | 0 | 0 |
| P8 | | | | | | 1 | 0 |
| P9 | | | | | | 0 | 0 |
| P10 | | | | | | 0 | 0 |
| P11 | | | | | | 1 | 0 |
| P13 | | | | | | 1 | 0 |
| P14 | | | | | | 0 | 0 |
| P15 | | | | | | 1 | 0 |
| P16 | | | | | | 0 | 0 |
| P17 | | | | | | 1 | 0 |
| P18 | | | | | | 0 | 0 |
| P19 | | | | | | 1 | 0 |
| P21 | | | | | | 0 | 0 |
| P22 | | | | | | 1 | 0 |
| P24 | | | | | | 0 | 0 |
| P25 | | | | | | 1 | 0 |
| P26 | | | | | | 1 | 0 |
| P27 | | | | | | 1 | 0 |
| P28 | | | | | | 1 | 0 |
| P30 | | | | | | 0 | 0 |
| P31 | | | | | | 1 | 0 |
| P32 | | | | | | 0 | 0 |
| P36 | | | | | | 1 | 0 |
| P37 | | | | | | 1 | 0 |
| P40 | | | | | | 0 | 0 |
| P41 | | | | | | 1 | 0 |
| P42 | | | | | | 0 | 0 |
| P43 | | | | | | 1 | 0 |
| P44 | | | | | | 0 | 0 |
| P51 | | | | | | 1 | 0 |

a) 0= não, 1= sim; b) risco IPI modificado- Ferreri et al, 2003; c) PS inicial- Oken et al, 1982; d) 0= 0%, 1= entre 1% e 25%, 2= entre 26% e 50%, 3= entre 51% e 75%, 4= entre 76% e 100%, 5= Não Avaliável; e) 0= negativo, 1= positivo, 2= Não Avaliável; f) conforme critério de Hans, 0= GCB, 1= Não-GCB, 2= Não Avaliável; g) média da expressão gênica normatizada para os genes de interesse; h) 0= Resposta Completa, 1= Resposta Parcial, 2= Progressão de Doença, 3= Não Disponível; i) valores em branco correspondem a amostras não amplificadas

**ANEXO B -** Informações sobre a primeira linha de tratamento oncológico

| | | |
|---|---|---|
| **Número Total de Pacientes** | | |
| | % (n) | 100% (35) |
| **Recebeu 1 linha de tratamento?** | | |
| não | (n) | 5,7% (2) |
| sim | (n) | 94,3% (33) |
| total | (n) | 100% (35) |
| **IDADE (anos)** | | |
| | n | 33 |
| | média (dp) | 59,2 ( 14,91 ) |
| | 1ºq;mediana;3ºq | 49,7 : 61,2 : 71,1 |
| | mín ; máx | 26,3 : 82,3 |
| **MTX Altas Doses** | | |
| não | (n) | 15,2% (5) |
| sim | (n) | 84,8% (28) |
| total | (n) | 100% (33) |
| **Duração TTO1 (meses)** | | |
| | n | 33 |
| | média (dp) | 4,3 ( 2,83 ) |
| | 1ºq;mediana;3ºq | 1,9 : 4,0 : 6,4 |
| | mín ; máx | 0,1 : 11,0 |
| **Melhor Resposta Clínica Durante o Tratamento** | | |
| RC | (n) | 45,5% (15) |
| RP | (n) | 27,3% (9) |
| PD | (n) | 27,3% (9) |
| total | (n) | 100% (33) |
| **Apresentou PD em algum momento?** | | |
| não | (n) | 45,5% (15) |
| sim | (n) | 54,5% (18) |
| total | (n) | 100% (33) |
| **Recaída Após RC** | | |
| não | (n) | 80% (12) |
| sim | (n) | 20% (3) |
| total | (n) | 100% (15) |
| **Refratariedade à Primeira Linha de Tratamento** | | |
| não | (n) | 72,7% (24) |
| sim | (n) | 27,3% (9) |
| total | (n) | 100% (33) |
| **Intervalo entre Final de Tratamento e PD (meses)** | | |
| | n | 18 |
| | média (dp) | 18,0 ( 20,53 ) |
| | 1ºq;mediana;3ºq | 0,8 : 6,8 : 39,1 |
| | mín ; máx | 0,0 : 60,2 |

**ANEXO C -** Valores da expressão normatizada dos genes MYC, BCL2, POU2F1, MGMT, LMO2 e PDCD1 por paciente

(continua)

| Amostra | MYC | PDCD1 | 01/out | MGMT | BCL2 | BCL6 | LMO2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| P1 | 0,1103834 | 0 | **0** | 0 | 0,09072 | 1,20327293 | 0,68923207 |
| P2† | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| P3† | 0 | 0 | 4,385562 | 0 | 0,13021 | 4,92333543 | 2,57602771 |
| P4† | 0 | 0 | 1,567702 | 0,335666 | 0,64488 | 1,70344228 | 0,15703952 |
| P6* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,19728 | 3,29719402 | 7,14032912 |
| P7#† | 0,3405111 | 0 | 1,72209 | 0 | 1,84167 | 3,27660241 | 0,13764646 |
| P8#† | 0,2351414 | 0 | 0 | 0 | 2,2052 | 0,64762351 | 0 |
| P9† | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| P10#† | 0,2017973 | 1,0351888 | 1,033221 | 1,417807 | 0,7658 | 3,787009 | 4,07845604 |
| P11† | 0,2351788 | 9,2146338 | 0 | 0 | 0,3516 | 8,3368464 | 10,9727002 |
| P13† | 0 | 0 | 3122,622 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P14† | 0,3040957 | 0 | 6,14149 | 0 | 0,08092 | 2,715904 | 1,6358415 |
| P15#† | 0,412259 | 0 | 2,783416 | 0 | 0,52765 | 2,73477377 | 0,94713051 |
| P16*† | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| P17 | 0,0301969 | 0 | 1,448191 | 0,010951 | 0,07898 | 0,63889135 | 1,99124978 |
| P18*† | 0,371486 | 0 | 0 | 0 | 1,47173 | 1,11302554 | 0,45144126 |
| P19† | NA | NA | 0 | NA | NA | 0 | NA |
| P21#† | NA | NA | 0 | NA | NA | 0 | NA |
| P22† | 0,4745787 | 1,729677 | 1,682568 | 0 | 5,56582 | 7,37556864 | 17,5060425 |
| P24† | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| P25† | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |

Valores da expressão normatizada dos genes MYC, BCL2, POU2F1, MGMT, LMO2 e PDCD1 por paciente

(conclusão)

| Amostra | MYC | PDCD1 | 01/out | MGMT | BCL2 | BCL6 | LMO2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| P26 | 0 | 6,4048083 | 6,30088 | 0 | 1,15876 | 9,09111926 | 1,05112574 |
| P27 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| P28 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| P30#† | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| P31† | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| P32#† | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| P36 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| P37† | 0,0701626 | 0 | 4,481112 | 0,218243 | 0,32391 | 1,63956511 | 0,06489237 |
| P40† | 0,214366 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,2707965 | 0,43562553 |
| P41 | 0,6413885 | 4,158813 | 0 | 0,070006 | 0,65164 | 5,446246 | 7,78468333 |
| P42 | 0,1977622 | 2,6626342 | 2,827798 | 2,524375 | 1,18919 | 3,3456055 | 13,7798915 |
| P43#† | 0,2010405 | 2,0093818 | 2,134024 | 10,07229 | 0,56432 | 3,42655195 | 6,55950292 |
| P44† | 0,1775013 | 0,5917454 | 0,567903 | 1,31804 | 1,19433 | 1,70547543 | 3,4625705 |
| P51#† | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| | | | | | | | |
| Média | 0,20085 | 1,3241373 | 137,3782 | 0,760352 | 0,90641 | 2,89908039 | 3,87721089 |
| Mediana | 0,2010405 | 0 | 1,448191 | 0 | 0,56432 | 2,715904 | 1,6358415 |

A numeração das amostras seguiu o número original atribuído para a realização desse trabalho, que partir de uma casuística de 51 pacientes.
# Casos refratários primários. *Recaída tardia (>6 meses). † Óbitos durante o tratamento. NA: corresponde a amostras não amplificadas

**ANEXO D -** Comparação entre amostra total e a subamostra (incluídos apenas pacientes com amplificações gênicas avaliáveis)

(continua)

| Variável | | População Global (%/n) | Subamostra (%/n) | Comparação entre os Grupos valor - p |
|---|---|---|---|---|
| **Número de pacientes** | | | | |
| | n | 100% (35) | 60% (21) | |
| **Idade ao diagnóstico (anos)** | | | | teste t- student** |
| | media (dp) | 60,1 ( 15,22 ) | 63,2 ( 16,87 ) | 0,493 |
| **≤ 60 anos** | (n) | 45,7% (16) | 33,3% (7) | 0,412 |
| **> 60 anos** | (n) | 54,3% (19) | 66,7% (14) | |
| **total** | (n) | 100% (35) | 100% (21) | |
| **Sexo** | | | | teste de independência * |
| | frequência | | | 0,785 |
| **masculino** | (n) | 42,9% (15) | 38,1% (8) | |
| **feminino** | (n) | 57,1% (20) | 61,9% (13) | |
| **total** | (n) | 100% (35) | 100% (21) | |
| **Anti-MYC** | | | | teste de independência * |
| | frequência | | | |
| **0%-50%** | (n) | 36,4% (12) | 45% (9) | 0,573 |
| **51%-100%** | (n) | 63,6% (21) | 55% (11) | |
| **total** | (n) | 100% (33) | 100% (20) | |
| **Anti-MGMT** | | | | |
| | frequência | | | |
| **negativo** | (n) | 88,6% (31) | 100% (21) | |
| **positivo** | (n) | 0% (0) | 0% (0) | |
| **total** | (n) | 88,6% (31) | 100% (21) | |
| **Anti-PDCD1** | | | | teste de independência * |
| | frequência | | | 0,823 |
| **negativo** | (n) | 90,9% (30) | 85,7% (18) | |
| **positivo** | (n) | 9,1% (3) | 14,3% (3) | |
| **total** | (n) | 100% (33) | 100% (21) | |
| **Anti-BCL2** | | | | teste de independência * |
| | frequência | | | |
| **0%-50%** | (n) | 15,2% (5) | 14,3% (3) | 1,000 |
| **51%-100%** | (n) | 84,8% (28) | 85,7% (18) | |
| **total** | (n) | 100% (33) | 100% (21) | |

Comparação entre amostra total e a subamostra (incluídos apenas pacientes com amplificações gênicas avaliáveis)

\(continuação

| Variável | | População Global (%/n) | Subamostra (%/n) | Comparação entre os Grupos valor - p |
|---|---|---|---|---|
| **Anti-LMO2** | | | | teste de independência * |
| frequência | | | | |
| **0%-25%** | (n) | 43,8% (14) | 47,6% (10) | 1,000 |
| **26%-100%** | (n) | 56,3% (18) | 52,4% (11) | |
| **total** | (n) | 100% (32) | 100% (21) | |
| **Anti-POU2F1** | | | | teste de independência * |
| frequência | | | | 1,000 |
| **negativo** | (n) | 0% (0) | 0% (0) | |
| **positivo** | (n) | 94,4% (33) | 100% (21) | |
| **Anti-CD20** | | | | |
| frequência | | | | |
| **negativo (0)** | (n) | 0% (0) | 0% (0) | |
| **positivo (1)** | (n) | 100% (35) | 100% (21) | |
| **total** | (n) | 100% (35) | 100% (21) | |
| **Anti-CD3** | | | | teste de independência * |
| frequência | | | | 1,000 |
| **negativo (0)** | (n) | 87,5% (28) | 89,5% (17) | |
| **positivo (1)** | (n) | 12,5% (4) | 10,5% (2) | |
| **total** | (n) | 100% (32) | 100% (19) | |
| **Anti-CD56** | | | | |
| frequência | | | | |
| **negativo (0)** | (n) | 100% (6) | 100% (3) | |
| **positivo (1)** | (n) | 0% (0) | 0% (0) | |
| **total** | (n) | 100% (6) | 100% (3) | |
| **Ki67** | | | | |
| frequência | | | | |
| **negativo (0)** | (n) | 0% (0) | 0% (0) | |
| **positivo (1)** | (n) | 100% (29) | 100% (19) | |
| **total** | (n) | 100% (29) | 100% (19) | |
| **Anti-BCL6** | | | | teste de independência * |
| frequência | | | | 1,000 |
| **negativo (0)** | (n) | 57,1% (8) | 66,7% (6) | |
| **positivo (1)** | (n) | 42,9% (6) | 33,3% (3) | |
| **total** | (n) | 100% (14) | 100% (9) | |

Comparação entre amostra total e a subamostra (incluídos apenas pacientes com amplificações gênicas avaliáveis)

(continuação)

| Variável | | População Global (%/n) | Subamostra (%/n) | Comparação entre os Grupos valor - p |
|---|---|---|---|---|
| **Anti-CD10** | | | | teste de independência * |
| | frequência | | | 1,000 |
| **negativo (0)** | (n) | 73,3% (11) | 70% (7) | |
| **positivo (1)** | (n) | 26,7% (4) | 30% (3) | |
| **total** | (n) | 100% (15) | 100% (10) | |
| **Anti-MUM1** | | | | teste de independência * |
| | frequência | | | 1,000 |
| **negativo (0)** | (n) | 25% (3) | 25% (2) | |
| **positivo (1)** | (n) | 75% (9) | 75% (6) | |
| **total** | (n) | 100% (12) | 100% (8) | |
| **COO Subtipo** | | | | teste de independência * |
| | frequência | | | 1,000 |
| **GCB** | (n) | 26,7% (4) | 30% (3) | |
| **não-GCB** | (n) | 73,3% (11) | 70% (7) | |
| **total** | (n) | 100% (15) | 100% (10) | |
| **Acometimento de regiões profundas SNC** | | | | teste de independência * |
| | frequência | | | 0,508 |
| **não** | (n) | 22,9% (8) | 14,3% (3) | |
| **sim** | (n) | 77,1% (27) | 85,7% (18) | |
| **total** | (n) | 100% (35) | 100% (21) | |
| **LCR** | | | | teste de independência * |
| | frequência | | | 0,622 |
| **citologia negativa** | (n) | 94,1% (32) | 90% (18) | |
| **sim** | (n) | 5,9% (2) | 10% (2) | |
| **total** | (n) | 100% (34) | 100% (20) | |
| **HIC** | | | | teste de independência * |
| | frequência | | | 0,558 |
| **não** | (n) | 71,4% (25) | 61,9% (13) | |
| **sim** | (n) | 28,6% (10) | 38,1% (8) | |
| **total** | (n) | 100% (35) | 100% (21) | |

Comparação entre amostra total e a subamostra (incluídos apenas pacientes com amplificações gênicas avaliáveis)

(continuação)

| Variável | | População Global (%/n) | Subamostra (%/n) | Comparação entre os Grupos valor - p |
|---|---|---|---|---|
| **Idade ao óbito (anos)** | | | | teste t- student** |
| media (dp) | | 67,5 ( 11,63 ) | 71,0 ( 12,25 ) | 0,356 |
| frequência | | | | teste de independência * |
| **≤ 50 anos** | (n) | 26,9% (7) | 20% (3) | 0,458 |
| **50 a 69 anos** | (n) | 34,6% (9) | 20% (3) | |
| **≥ 70 anos** | (n) | 38,5% (10) | 60% (9) | |
| **total** | (n) | 100% (26) | 100% (15) | |
| **Tempo entre diagnóstico e óbito (meses)** | | | | teste t- student** |
| media (dp) | | 32,2 ( 27,10 ) | 28,8 ( 28,20 ) | 0,705 |
| frequência | | | | teste de independência * |
| **≤ 12 meses** | (n) | 34,6% (9) | 40% (6) | 0,916 |
| **12 a 36 meses** | (n) | 19,2% (5) | 20% (3) | |
| **≥ 36 anos** | (n) | 46,2% (12) | 40% (6) | |
| **total** | (n) | 100% (26) | 100% (15) | |
| **Idade na última consulta (anos)** | | | | teste t- student** |
| media (dp) | | 53,2 ( 17,34 ) | 55,1 ( 19,00 ) | 0,844 |
| **Tempo entre diagnóstico e última consulta (meses)** | | | | teste t- student** |
| media (dp) | | 77,5 ( 50,11 ) | 67,9 ( 44,21 ) | 0,709 |
| **Tempo de seguimento (meses)** | | | | teste t- student** |
| media (dp) | | 43,8 ( 39,18 ) | 39,9 ( 37,06 ) | 0,715 |
| **P.S. inicial1** | | | | teste t- student** |
| frequência | | | | teste de independência * |
| **0+1+2** | (n) | 57,1% (20) | 47,6% (10) | 0,584 |
| **3+4** | (n) | 42,9% (15) | 52,4% (11) | |
| **total** | (n) | 100% (35) | 100% (21) | |
| **Risco IPI** | | | | teste de independência * |
| frequência | | | | 0,572 |
| **baixa (0+1)** | (n) | 20% (7) | 9,5% (2) | |
| **intermediário (2+3)** | (n) | 48,6% (17) | 47,6% (10) | |
| **alto (4+5)** | (n) | 31,4% (11) | 42,9% (9) | |
| **total** | (n) | 100% (35) | 100% (21) | |
| frequência | | | | teste de independência * |
| **baixa (0+1)** | (n) | 20% (7) | 9,5% (2) | 0,459 |
| **não baixa (2+3+4+5)** | (n) | 80% (28) | 90,5% (19) | |
| **total** | (n) | 100% (35) | 100% (21) | |

Comparação entre amostra total e a subamostra (incluídos apenas pacientes com amplificações gênicas avaliáveis)

(continuação)

| Variável | | População Global (%/n) | Subamostra (%/n) | Comparação entre os Grupos valor - p |
|---|---|---|---|---|
| **Tratamento com RDT** | | | | teste de independência * |
| frequência | | | | 0,777 |
| **não** | (n) | 40% (14) | 33,4 (7) | |
| **sim** | (n) | 60% (21) | 66,6% (14) | |
| **total** | (n) | 100% (35) | 100% (9) | |
| **Realização DE TMO** | | | | teste de independência * |
| frequência | | | | |
| **não** | (n) | 100% (35) | 100% (21) | |
| **sim** | (n) | 0% (0) | 0% (0) | |
| **total** | (n) | 100% (35) | 100% (21) | |
| **Neurotoxicidades?** | | | | teste de independência * |
| frequência | | | | 0,786 |
| **não** | (n) | 57,1% (20) | 52,4% (11) | |
| **sim** | (n) | 42,9% (15) | 47,6% (10) | |
| **total** | (n) | 100% (35) | 100% (21) | |
| **PRIMEIRA LINHA DE TRATAMENTO ONCOLÓGICO** | | | | |
| **RECEBEU 1ª LINHA?** | | | | teste de independência * |
| frequência | | | | 0,626 |
| **não** | (n) | 5,7% (2) | 9,5% (2) | |
| **sim** | (n) | 94,3% (33) | 90,5% (19) | |
| **total** | (n) | 100% (35) | 100% (21) | |
| **Idade TTO1 (anos)** | | | | teste t- student** |
| | n | 33 | 19 | |
| | media (dp) | 59,2 ( 14,91 ) | 61,7 ( 16,88 ) | 0,576 |
| **HD-MTX 1** | | | | teste de independência * |
| frequência | | | | 1,000 |
| **não** | (n) | 15,2% (5) | 15,8% (3) | |
| **sim** | (n) | 84,8% (28) | 84,2% (16) | |
| **total** | (n) | 100% (33) | 100% (19) | |
| **Duração TTO1 (meses)** | | | | teste t- student** |
| | n | 33 | 19 | |
| | media (dp) | 4,3 ( 2,83 ) | 4,1 ( 3,24 ) | 0,799 |
| frequência | | | | teste de independência * |
| **≤ 4 meses** | (n) | 51,5% (17) | 57,9% (11) | 0,775 |
| **> 4 meses** | (n) | 48,5% (16) | 42,1% (8) | |
| **total** | (n) | 100% (33) | 100% (19) | |

Comparação entre amostra total e a subamostra (incluídos apenas pacientes com amplificações gênicas avaliáveis)

(conclusão)

| Variável | | População Global (%/n) | Subamostra (%/n) | Comparação entre os Grupos valor - p |
|---|---|---|---|---|
| **Resposta à primeira linha de tratamento** | | | | teste de independência * |
| frequência | | | | 0,715 |
| **RC** | (n) | 45,5% (15) | 36,8% (7) | |
| **RP** | (n) | 27,3% (9) | 36,8% (7) | |
| **PD** | (n) | 27,3% (9) | 26,3% (5) | |
| **total** | (n) | 100% (33) | 100% (19) | |
| **Apresentou PD?** | | | | teste de independência * |
| frequência | | | | 1,000 |
| **não** | (n) | 45,5% (15) | 42,1% (8) | |
| **sim** | (n) | 54,5% (18) | 57,9% (11) | |
| **total** | (n) | 100% (33) | 100% (19) | |
| **Recaída?** | | | | teste de independência * |
| frequência | | | | 1,000 |
| **não** | (n) | 80% (12) | 71,4% (5) | |
| **sim** | (n) | 20% (3) | 28,6% (2) | |
| **total** | (n) | 100% (15) | 100% (7) | |
| **Refratariedade?** | | | | teste de independência * |
| frequência | | 0% () | 0% () | 1,000 |
| **não** | (n) | 72,7% (24) | 73,7% (14) | |
| **sim** | (n) | 27,3% (9) | 26,3% (5) | |
| **total** | (n) | 100% (33) | 100% (19) | |
| **Se teve pd depois tto1, tempo entre final tratamento e pd 1 (meses)** | | | | teste t- student** |
| | n | 18 | 11 | |
| | media (dp) | 18,0 ( 20,53 ) | 20,3 ( 21,29 ) | 0,774 |

1ºq med 3ºq - 1ºquartil mediana 3ºquartil ; dp - desvio padrão

*** Teste de independência (teste exato de Fisher)**

**HIPÓTESES DO TESTE** Ho: há independência entre grupo e variável
HA: há associação entre grupo e variável

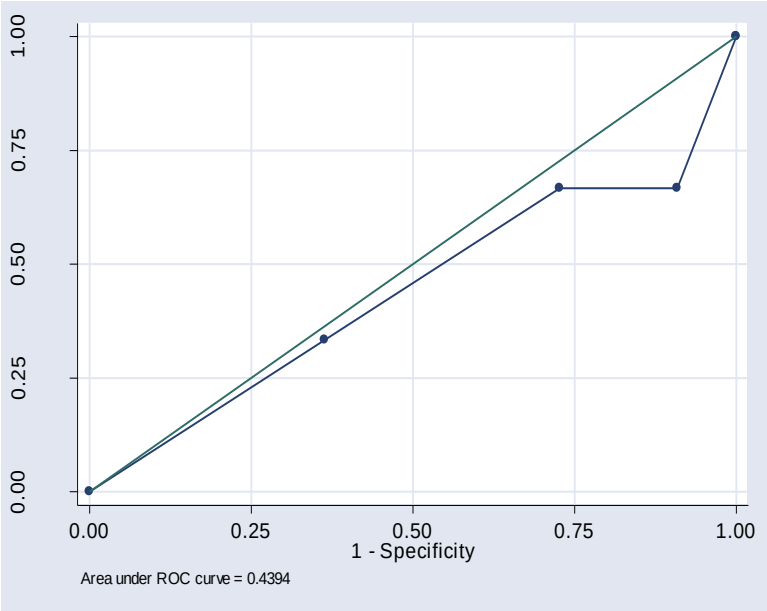
**** Teste T-student**

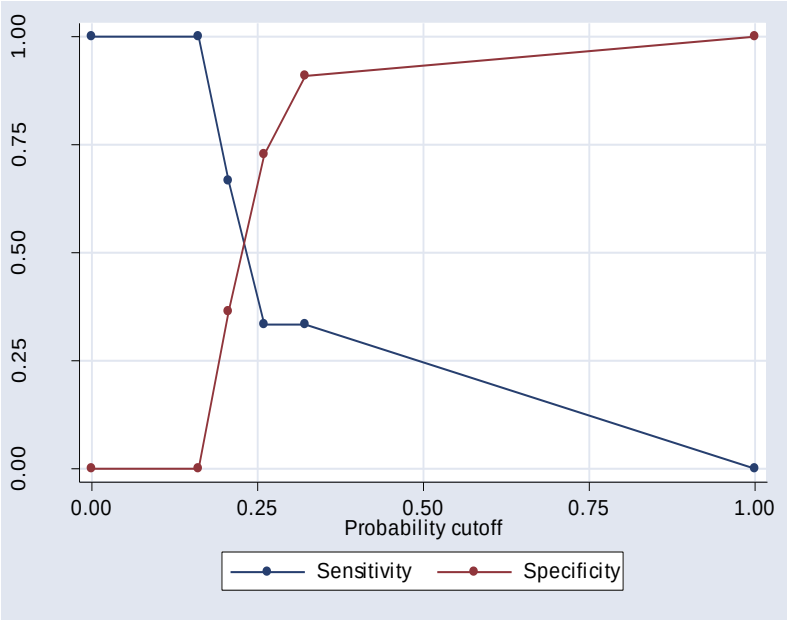
**HIPÓTESES DO TESTE** Ho: as médias dos grupos são iguais
HA: as médias dos grupos são diferentes

**ANEXO E -** Curvas de ROC para expressão da proteína MYC

*Considerando recaída*

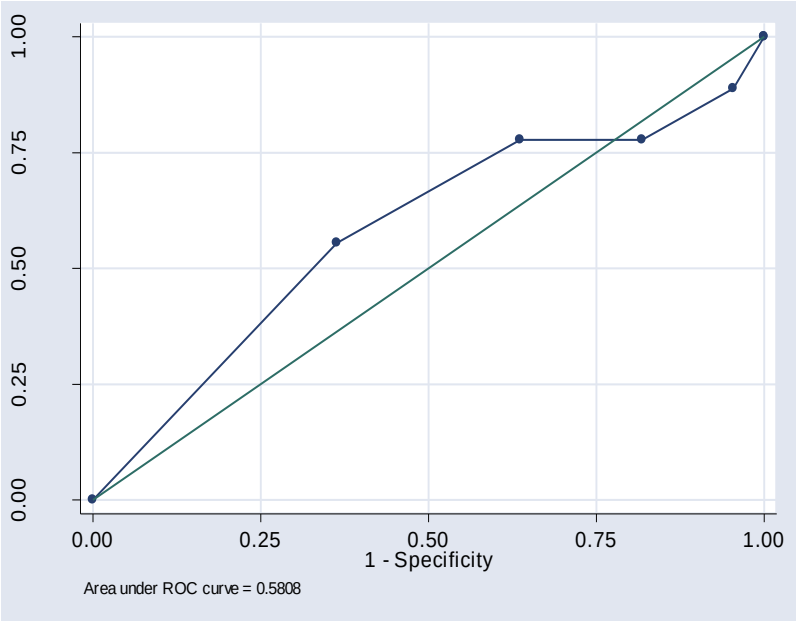
| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 1 ) | 0.00% | 100.00% | 78.57% | | 10 |
| ( >= 2 ) | 33.33% | 63.64% | 57.14% | 0.9167 | 10,476 |
| ( >= 3 ) | 66.67% | 27.27% | 35.71% | 0.9167 | 12,222 |
| ( >= 4 ) | 66.67% | 9.09% | 21.43% | 0.7333 | 36,667 |

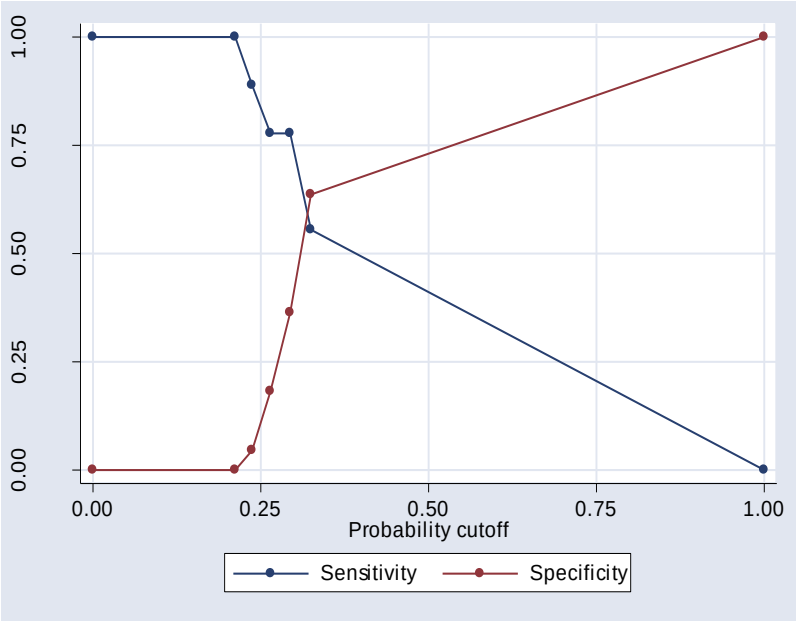


*Considerando refratariedade*

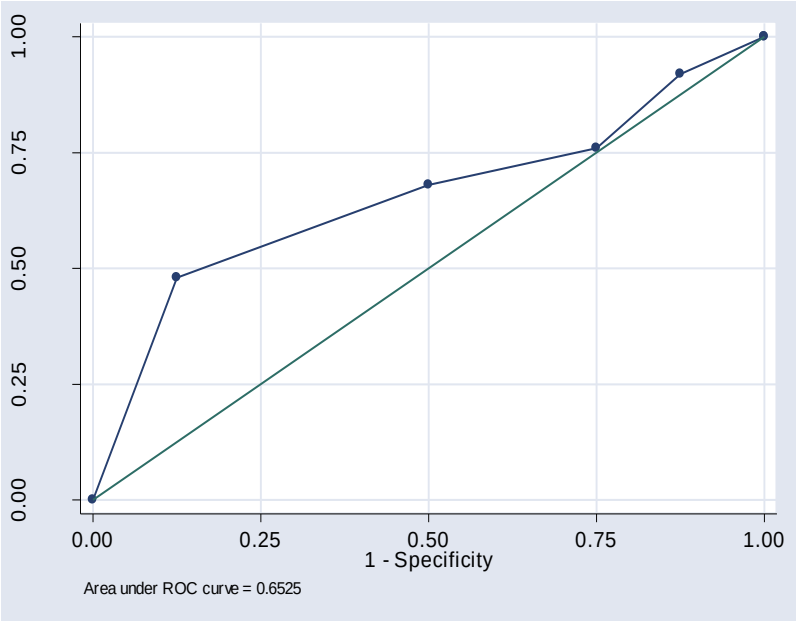
| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 100.00% | 0.00% | 29.03% | 1.0000 | |
| ( >= 1 ) | 88.89% | 4.55% | 29.03% | 0.9312 | 24,444 |
| ( >= 2 ) | 77.78% | 18.18% | 35.48% | 0.9506 | 12,222 |
| ( >= 3 ) | 77.78% | 36.36% | 48.39% | 1.2222 | 0.6111 |
| ( >= 4 ) | 55.56% | 63.64% | 61.29% | 1.5278 | 0.6984 |
| ( > 4 ) | 0.00% | 100.00% | 70.97% | | 10 |

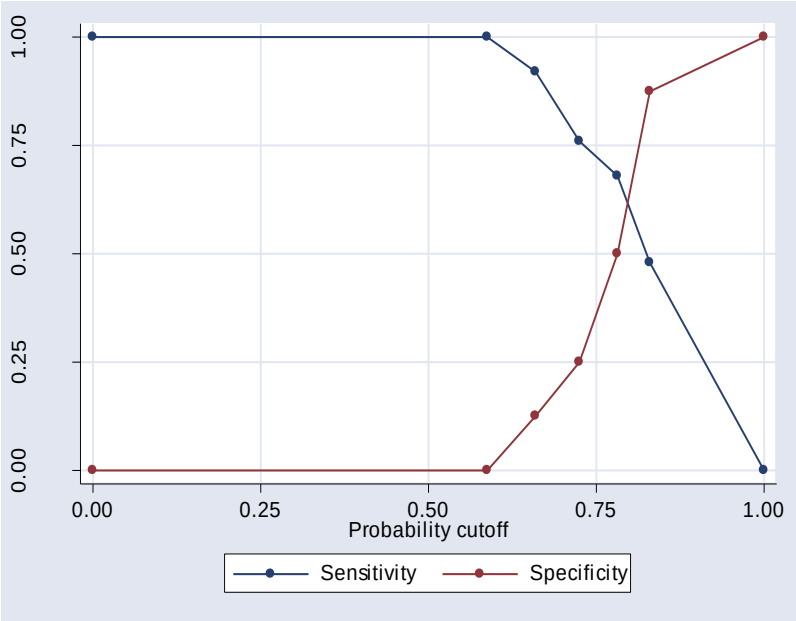


*Considerando óbito*

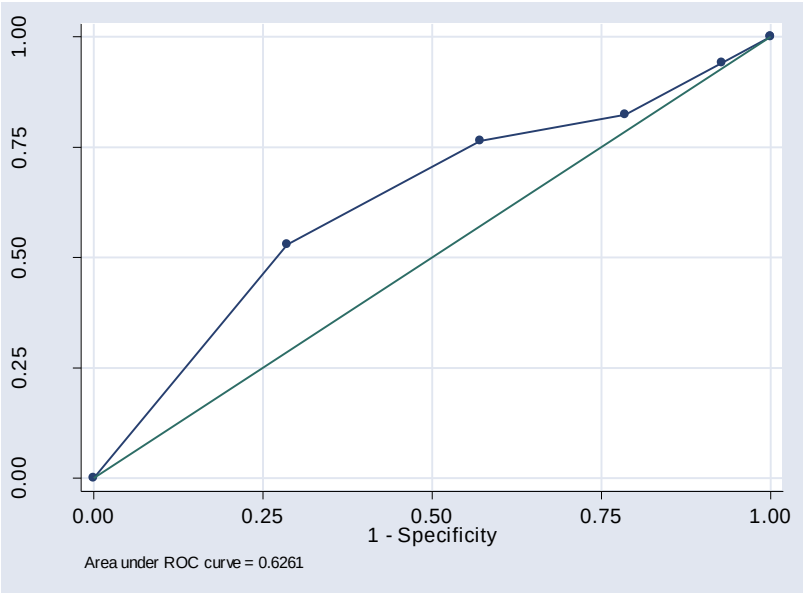
| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 100.00% | 0.00% | 75.76% | 1.0000 | |
| ( >= 1 ) | 92.00% | 12.50% | 72.73% | 1.0514 | 0.6400 |
| ( >= 2 ) | 76.00% | 25.00% | 63.64% | 1.0133 | 0.9600 |
| ( >= 3 ) | 68.00% | 50.00% | 63.64% | 1.3600 | 0.6400 |
| ( >= 4 ) | 48.00% | 87.50% | 57.58% | 3.8400 | 0.5943 |
| ( > 4 ) | 0.00% | 100.00% | 24.24% | | 1.0000 |

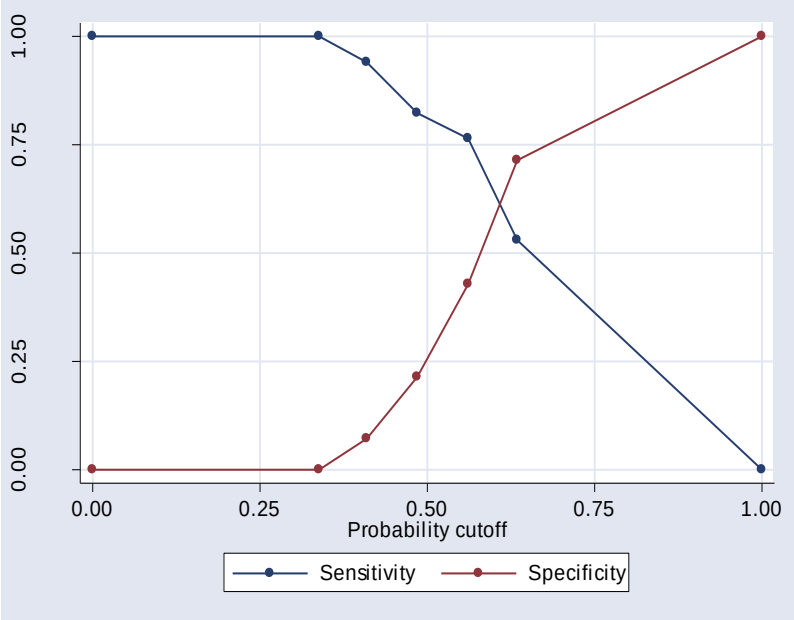


*Considerando progressão da doença*

| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 100.00% | 0.00% | 54.84% | 1.0000 | |
| ( >= 1 ) | 94.12% | 7.14% | 54.84% | 1.0136 | 0.8235 |
| ( >= 2 ) | 82.35% | 21.43% | 54.84% | 1.0481 | 0.8235 |
| ( >= 3 ) | 76.47% | 42.86% | 61.29% | 1.3382 | 0.5490 |
| ( >= 4 ) | 52.94% | 71.43% | 61.29% | 1.8529 | 0.6588 |
| ( > 4 ) | 0.00% | 100.00% | 45.16% | | 10 |

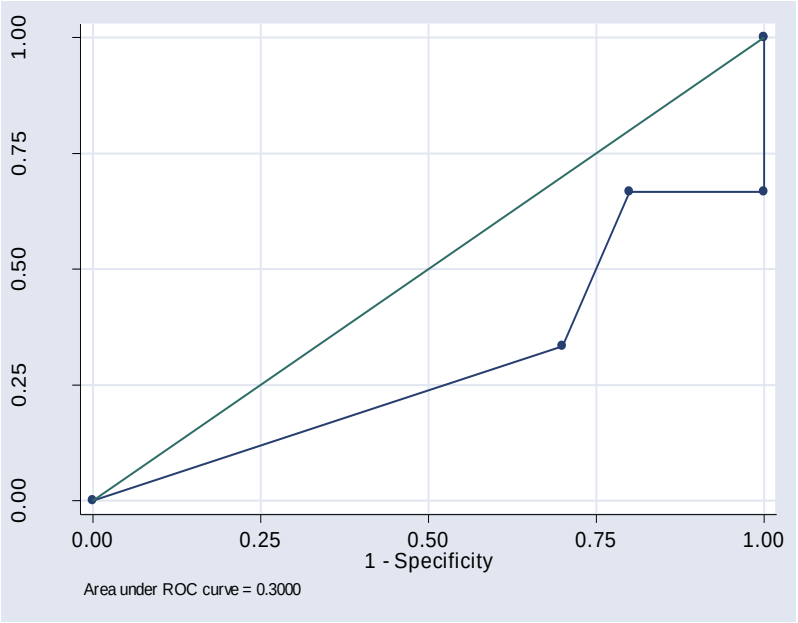


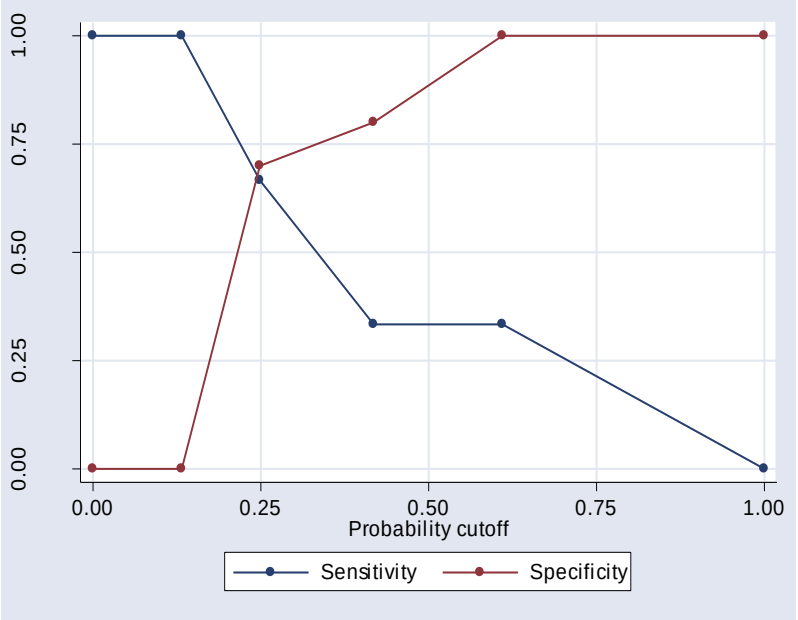



**ANEXO F -** Curva de ROC para expressão da proteína BCL2

*Considerando recaída*

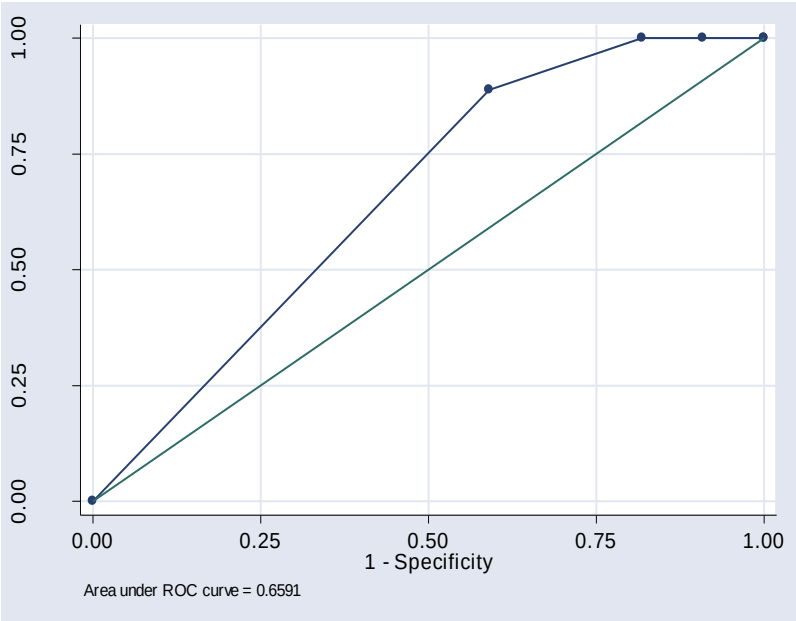
| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 1 ) | 0.00% | 100.00% | 76.92% | | 10 |
| ( >= 2 ) | 33.33% | 30.00% | 30.77% | 0.4762 | 22,222 |
| ( >= 3 ) | 66.67% | 20.00% | 30.77% | 0.8333 | 16,667 |
| ( >= 4 ) | 66.67% | 0.00% | 15.38% | 0.6667 | |
| ( > 4 ) | 100.00% | 0.00% | 23.08% | 1.0000 | |

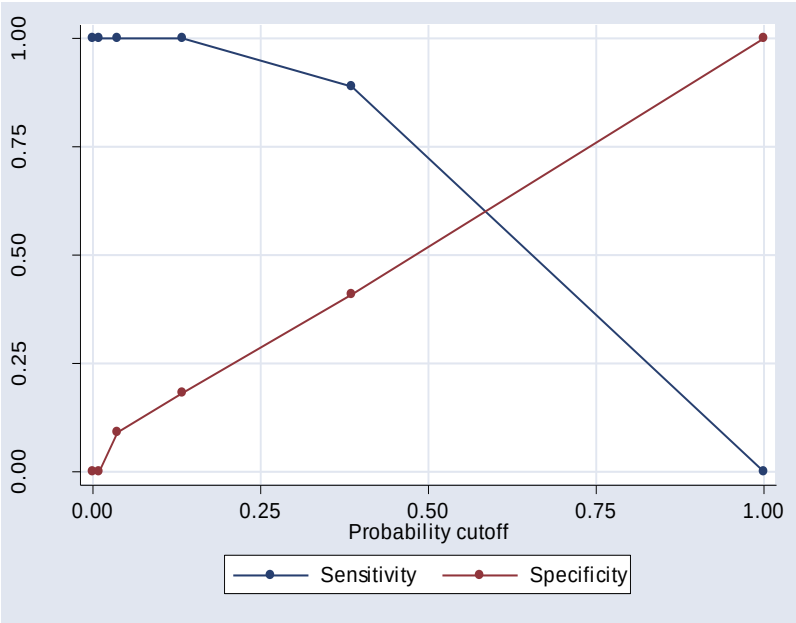


*Considerando refratariedade*

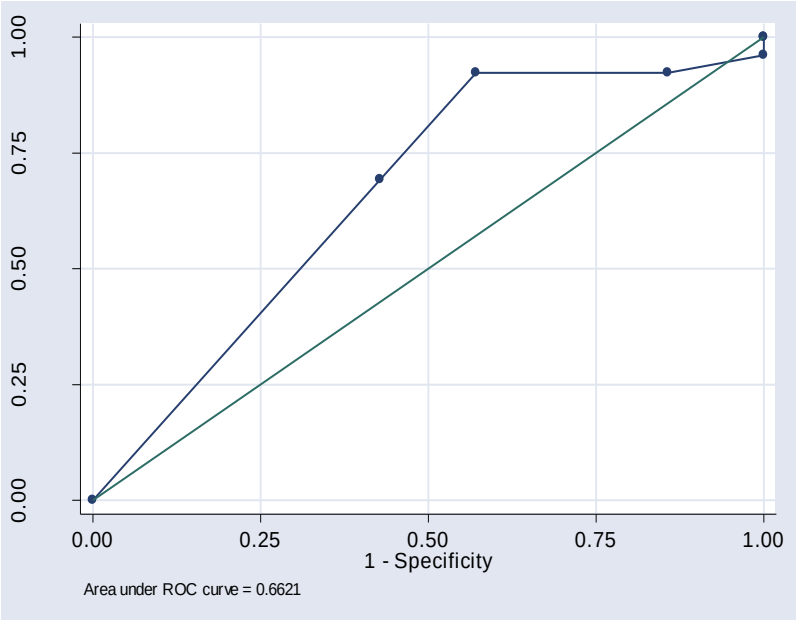
| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 1 ) | 100.00% | 0.00% | 29.03% | 1.0000 | |
| ( >= 2 ) | 100.00% | 9.09% | 35.48% | 1.1000 | 0.0000 |
| ( >= 3 ) | 100.00% | 18.18% | 41.94% | 1.2222 | 0.0000 |
| ( >= 4 ) | 88.89% | 40.91% | 54.84% | 1.5043 | 0.2716 |
| ( > 4 ) | 0.00% | 100.00% | 70.97% | 1.0000 | |

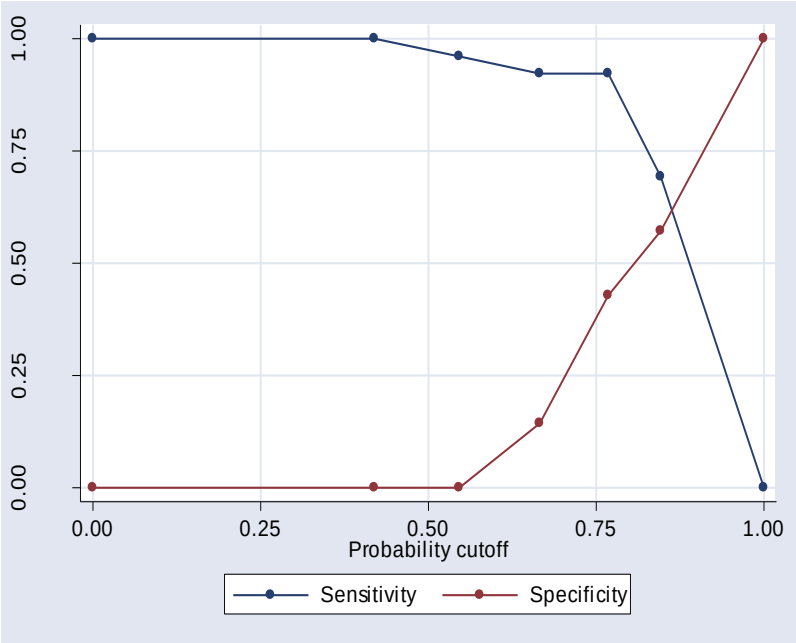


*Considerando óbito*

| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 100.00% | 0.00% | 78.79% | 1.0000 | |
| ( >= 1 ) | 96.15% | 0.00% | 75.76% | 0.9615 | |
| ( >= 2 ) | 92.31% | 14.29% | 75.76% | 1.0769 | 0.5385 |
| ( >= 3 ) | 92.31% | 42.86% | 81.82% | 1.6154 | 0.1795 |
| ( >= 4 ) | 69.23% | 57.14% | 66.67% | 1.6154 | 0.5385 |
| ( > 4 ) | 0.00% | 100.00% | 21.21% | | 10 |

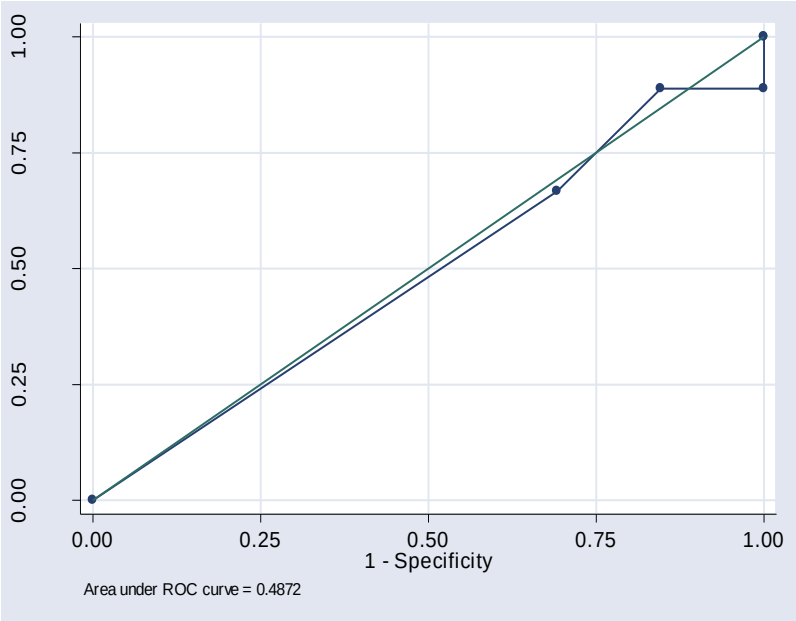


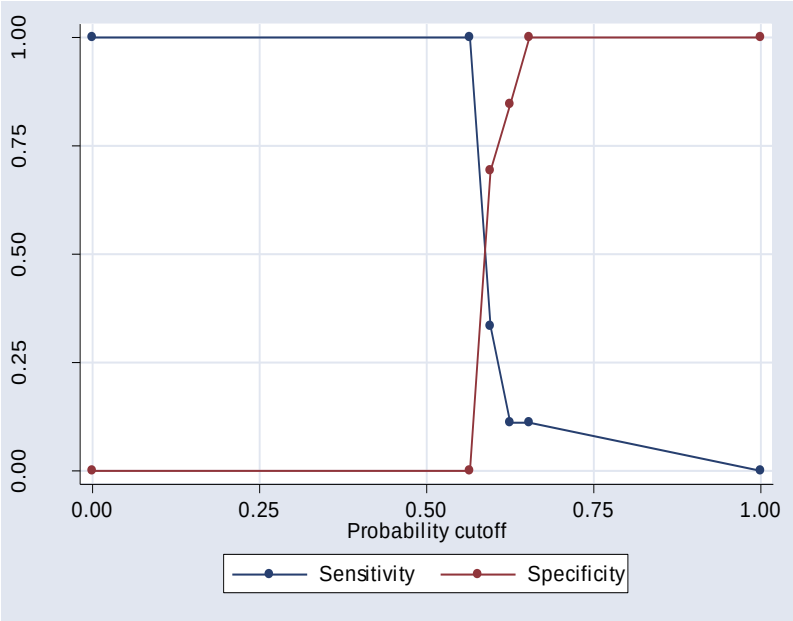




*Considerando progressão de doença*

| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 1 ) | 0.00% | 100.00% | 41.94% | | 10 |
| ( >= 2 ) | 66.67% | 30.77% | 51.61% | 0.9630 | 10.833 |
| ( >= 3 ) | 88.89% | 15.38% | 58.06% | 1.0505 | 0.7222 |
| ( >= 4 ) | 88.89% | 0.00% | 51.61% | 0.8889 | |
| ( > 4 ) | 100.00% | 0.00% | 58.06% | 1.0000 | |

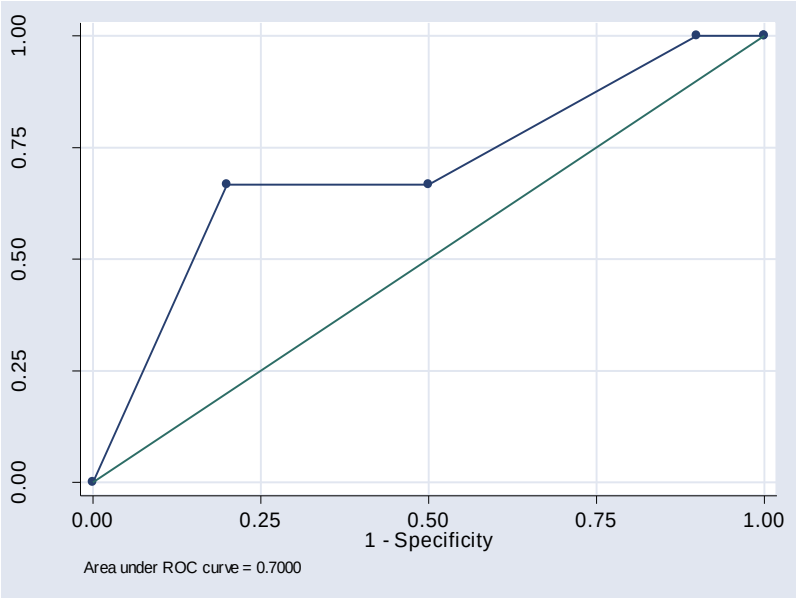


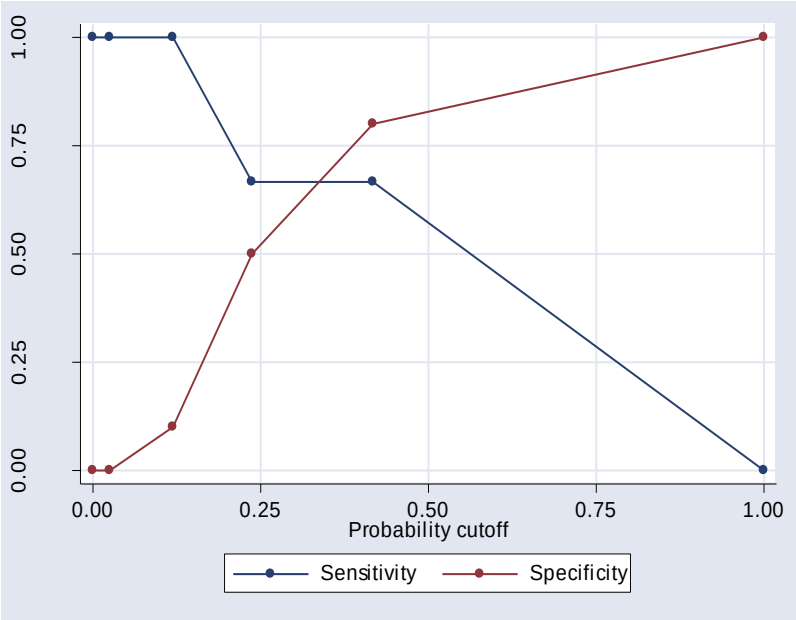



**ANEXO G -** Curva de ROC para expressão da proteína LMO2

*Considerando recaída*

| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 100.00% | 0.00% | 23.08% | 10.000 | |
| ( >= 2 ) | 100.00% | 10.00% | 30.77% | 11.111 | 0.0000 |
| ( >= 3 ) | 66.67% | 50.00% | 53.85% | 13.333 | 0.6667 |
| ( >= 4 ) | 66.67% | 80.00% | 76.92% | 33.333 | 0.4167 |
| ( >= 4 ) | 0.00% | 100.00% | 76.92% | | 10 |

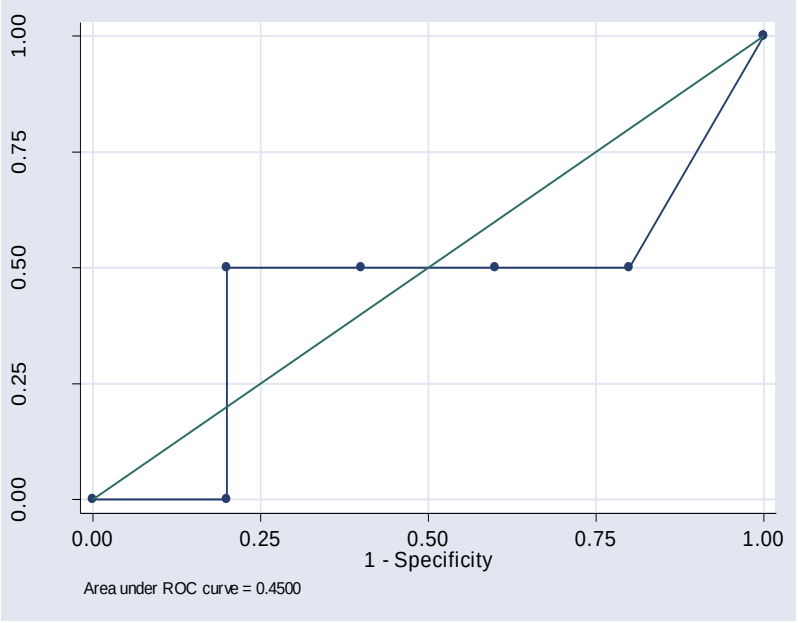


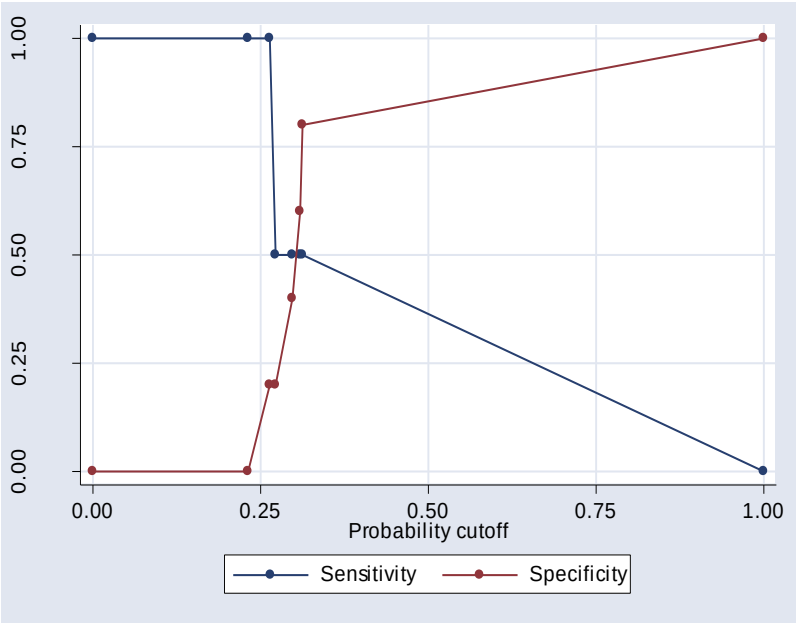



**ANEXO H -** Curvas de ROC para a expressão normatizada do gene MYC

Considerando recaída

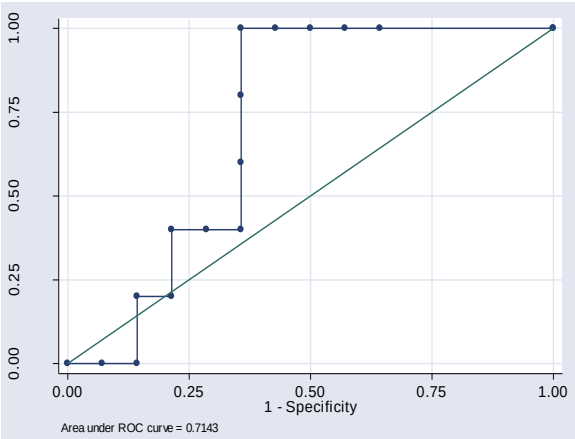
| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 0.00% | 100.00% | 71.43% | | 10.000 |
| ( >= .030197 ) | 0.00% | 80.00% | 57.14% | 0.0000 | 12.500 |
| ( >= .110383 ) | 50.00% | 80.00% | 71.43% | 2.5000 | 0.6250 |
| ( >= .304096 ) | 50.00% | 60.00% | 57.14% | 1.2500 | 0.8333 |
| ( >= .371486 ) | 50.00% | 40.00% | 42.86% | 0.8333 | 12.500 |
| ( >= .641388 ) | 50.00% | 20.00% | 28.57% | 0.6250 | 25.000 |
| ( > .641388 ) | 100.00% | 0.00% | 28.57% | 1.0000 | |

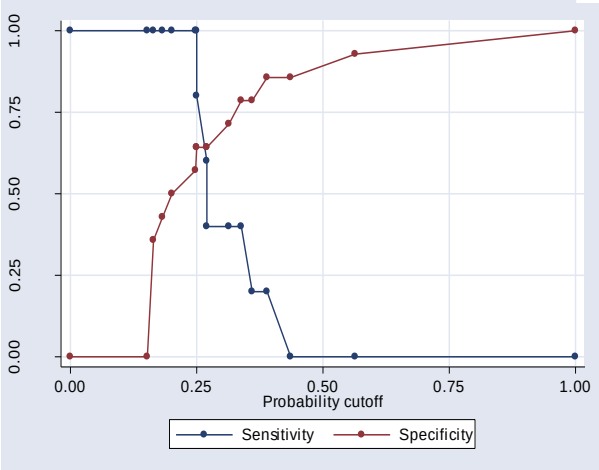


*Considerando refratariedade*

| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 100.00% | 0.00% | 26.32% | 1.0000 | |
| ( >= .030197 ) | 100.00% | 35.71% | 52.63% | 1.5556 | 0.0000 |
| ( >= .070163 ) | 100.00% | 42.86% | 57.89% | 1.7500 | 0.0000 |
| ( >= .110383 ) | 100.00% | 50.00% | 63.16% | 2.0000 | 0.0000 |
| ( >= .197762 ) | 100.00% | 57.14% | 68.42% | 2.3333 | 0.0000 |
| ( >= .201041 ) | 100.00% | 64.29% | 73.68% | 2.8000 | 0.0000 |
| ( >= .201797 ) | 80.00% | 64.29% | 68.42% | 2.2400 | 0.3111 |
| ( >= .235141 ) | 60.00% | 64.29% | 63.16% | 1.6800 | 0.6222 |
| ( >= .235179 ) | 40.00% | 64.29% | 57.89% | 1.1200 | 0.9333 |
| ( >= .304096 ) | 40.00% | 71.43% | 63.16% | 1.4000 | 0.8400 |
| ( >= .340511 ) | 40.00% | 78.57% | 68.42% | 1.8667 | 0.7636 |
| ( >= .371486 ) | 20.00% | 78.57% | 63.16% | 0.9333 | 10.182 |
| ( >= .412259 ) | 20.00% | 85.71% | 68.42% | 1.4000 | 0.9333 |
| ( >= .474579 ) | 0.00% | 85.71% | 63.16% | 0.0000 | 11.667 |
| ( >= .641388 ) | 0.00% | 92.86% | 68.42% | 0.0000 | 10.769 |
| ( > .641388 ) | 0.00% | 100.00% | 73.68% | | 10.000 |

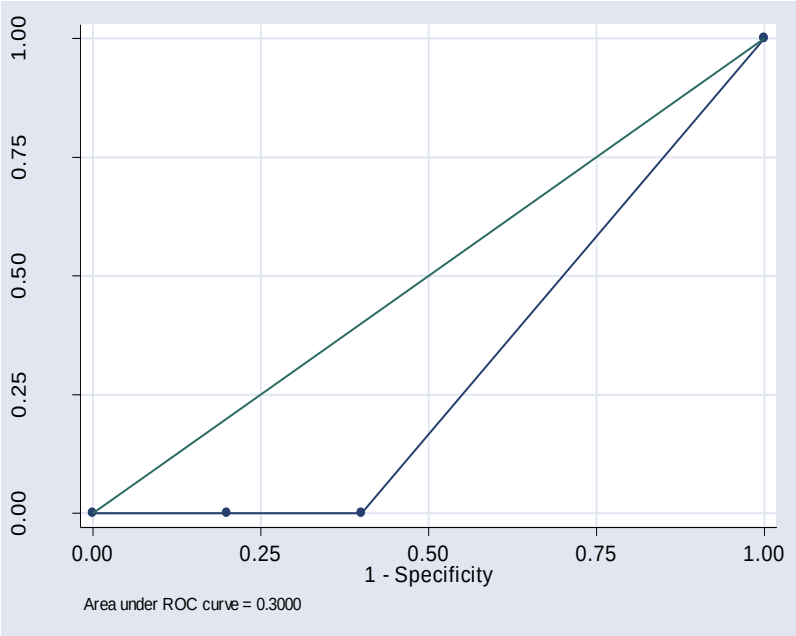


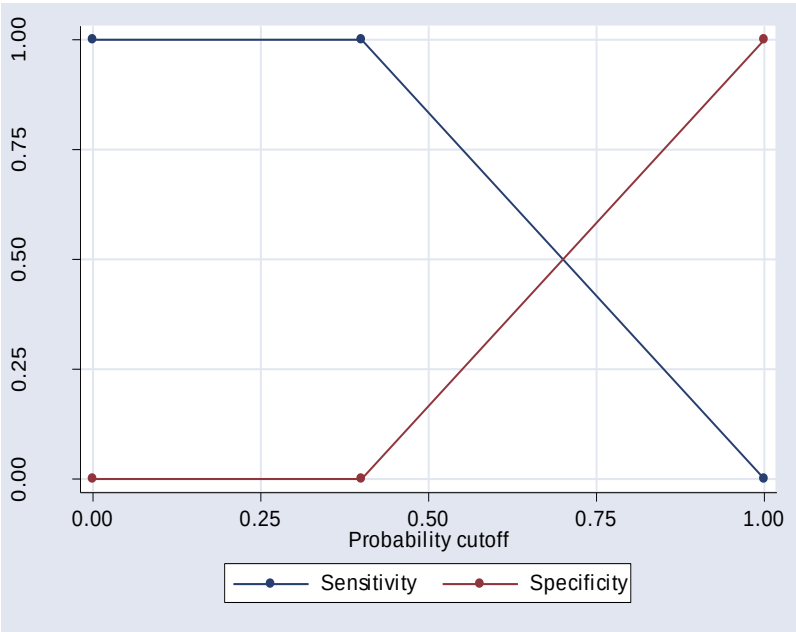



**ANEXO I -** Curvas de ROC para a expressão normatizada do gene MGMT

*Considerando recaída*

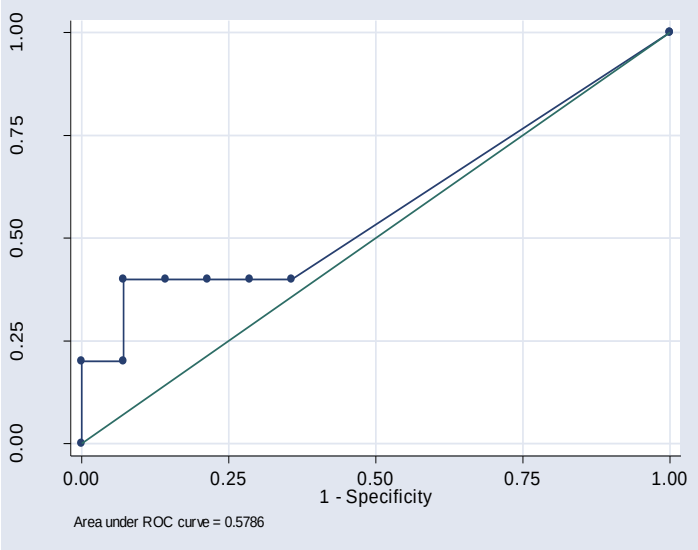
| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 0.00% | 100.00% | 71.43% | | 10.000 |
| ( >= .010951 ) | 0.00% | 80.00% | 57.14% | 0.0000 | 12.500 |
| ( >= .070006 ) | 0.00% | 60.00% | 42.86% | 0.0000 | 16.667 |
| ( > .070006 ) | 100.00% | 0.00% | 28.57% | 1.0000 | |

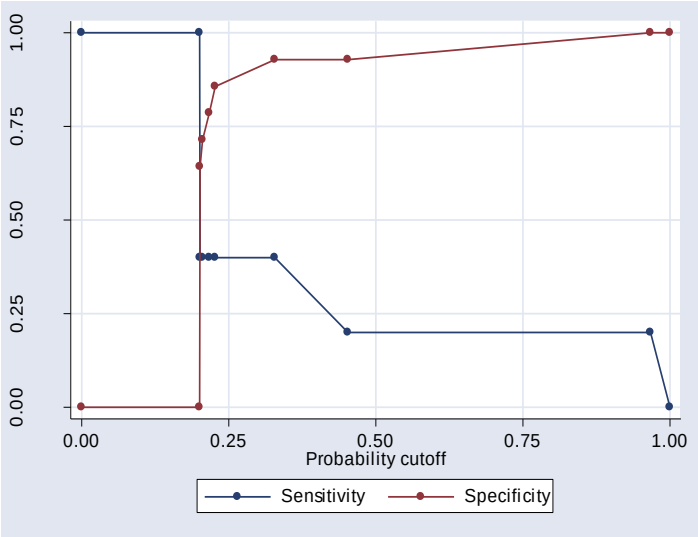


*Considerando refratariedade*

| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 100.00% | 0.00% | 26.32% | 1.0000 | |
| ( >= .010951 ) | 40.00% | 64.29% | 57.89% | 1.1200 | 0.9333 |
| ( >= .070006 ) | 40.00% | 71.43% | 63.16% | 1.4000 | 0.8400 |
| ( >= .218243 ) | 40.00% | 78.57% | 68.42% | 1.8667 | 0.7636 |
| ( >= .335666 ) | 40.00% | 85.71% | 73.68% | 2.8000 | 0.7000 |
| ( >= 1.41781 ) | 40.00% | 92.86% | 78.95% | 5.6000 | 0.6462 |
| ( >= 2.52437 ) | 20.00% | 92.86% | 73.68% | 2.8000 | 0.8615 |
| ( >= 10.0723 ) | 20.00% | 100.00% | 78.95% | | 0.8000 |
| ( > 10.0723 ) | 0.00% | 100.00% | 73.68% | | 10.000 |

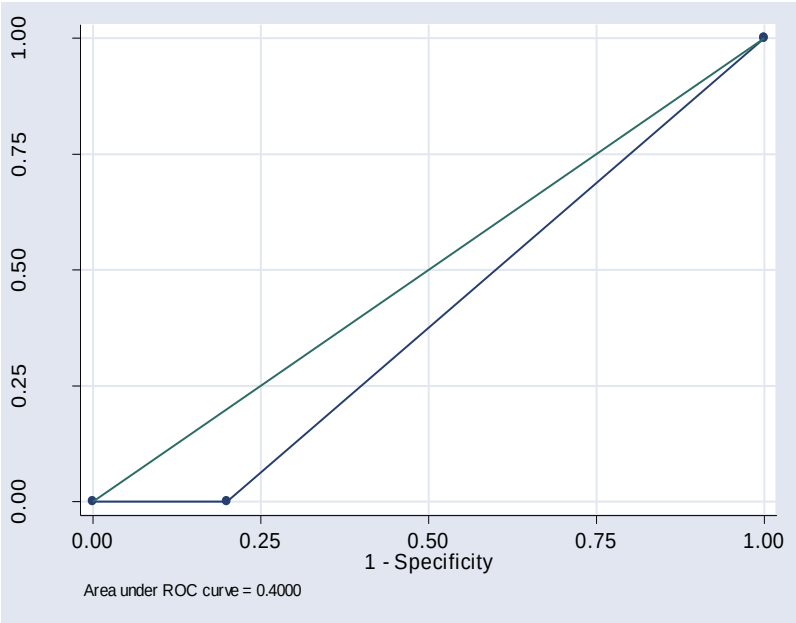


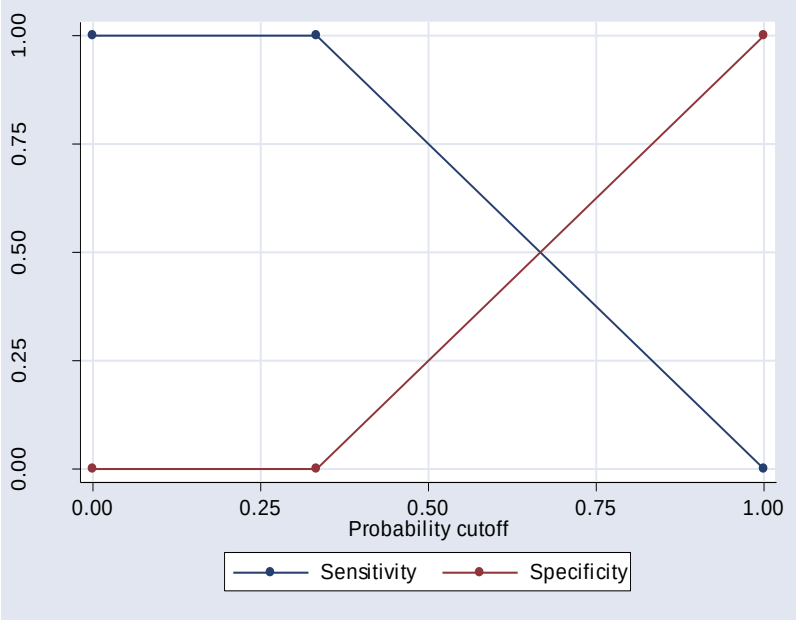



**ANEXO J -** Curvas de ROC para a expressão normatizada do gene PDCD1

*Considerando recaída*

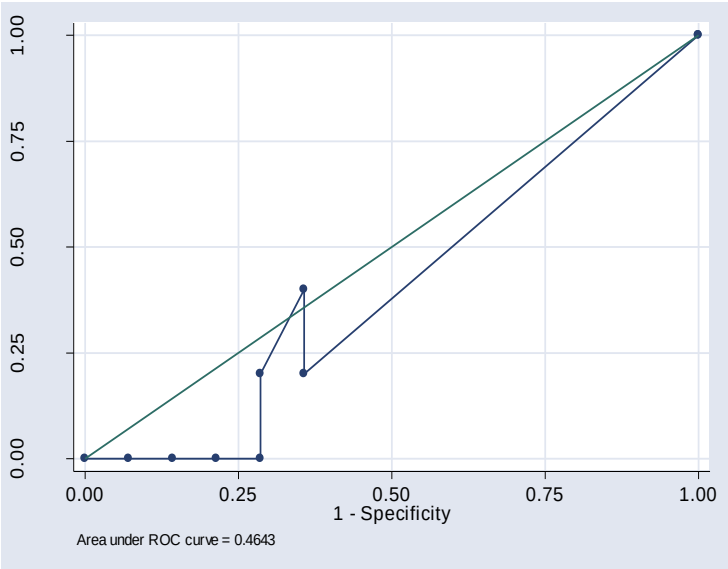
| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 0.00% | 100.00% | 71.43% | | 10.000 |
| ( >= 4.15881 ) | 0.00% | 80.00% | 57.14% | 0.0000 | 12.500 |
| ( > 4.15881 ) | 100.00% | 0.00% | 28.57% | 1.0000 | |

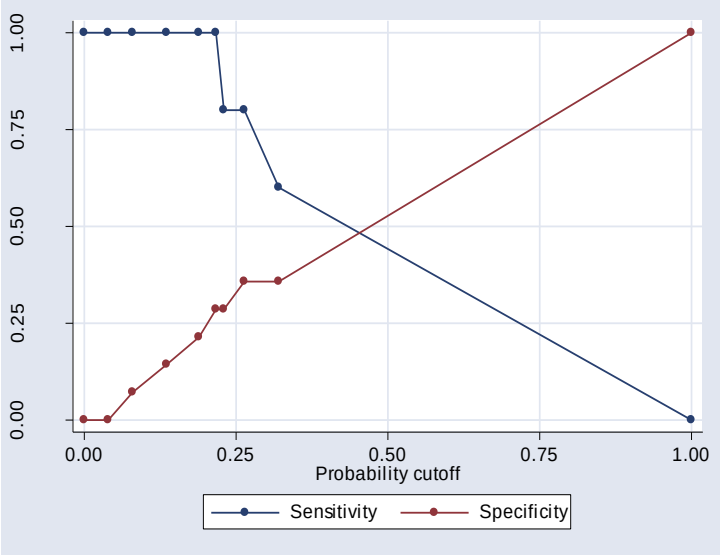



*Considerando refratariedade*

| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 0.00% | 100.00% | 73.68% | | 10.000 |
| ( >= 1.03519 ) | 0.00% | 92.86% | 68.42% | 0.0000 | 10.769 |
| ( >= 1.72968 ) | 0.00% | 85.71% | 63.16% | 0.0000 | 11.667 |
| ( >= 2.00938 ) | 0.00% | 78.57% | 57.89% | 0.0000 | 12.727 |
| ( >= 2.66263 ) | 0.00% | 71.43% | 52.63% | 0.0000 | 14.000 |
| ( >= 4.15881 ) | 20.00% | 71.43% | 57.89% | 0.7000 | 11.200 |
| ( >= 6.40481 ) | 20.00% | 64.29% | 52.63% | 0.5600 | 12.444 |
| ( >= 9.21463 ) | 40.00% | 64.29% | 57.89% | 1.1200 | 0.9333 |
| ( > 9.21463 ) | 100.00% | 0.00% | 26.32% | 1.0000 | |

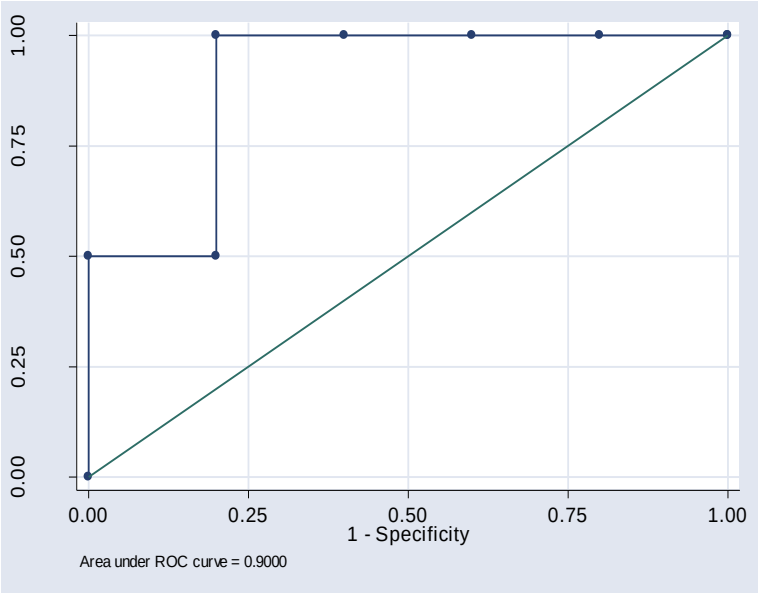


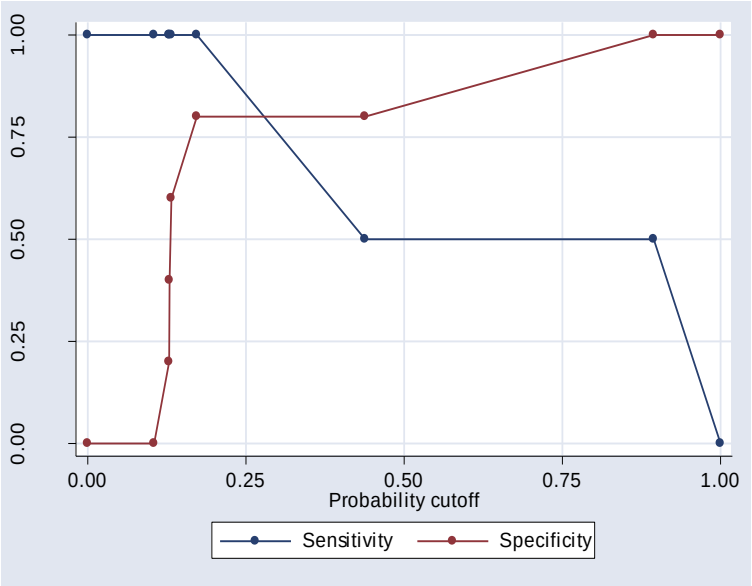




**ANEXO K -** Curvas de ROC para a expressão normatizada do gene BCL2

*Considerando recaída*

| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 100.00% | 0.00% | 28.57% | 1.0000 | |
| ( >= .078983 ) | 100.00% | 20.00% | 42.86% | 1.2500 | 0.0000 |
| ( >= .080915 ) | 100.00% | 40.00% | 57.14% | 1.6667 | 0.0000 |
| ( >= .090718 ) | 100.00% | 60.00% | 71.43% | 2.5000 | 0.0000 |
| ( >= .197275 ) | 100.00% | 80.00% | 85.71% | 5.0000 | 0.0000 |
| ( >= .651635 ) | 50.00% | 80.00% | 71.43% | 2.5000 | 0.6250 |
| ( >= 1.47173 ) | 50.00% | 100.00% | 85.71% | | 0.5000 |
| ( > 1.47173 ) | 0.00% | 100.00% | 71.43% | | 10.000 |

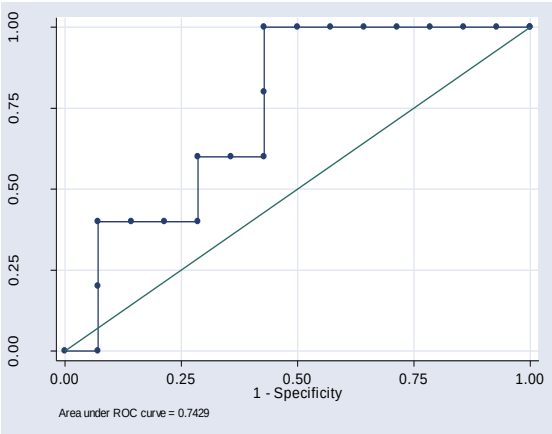


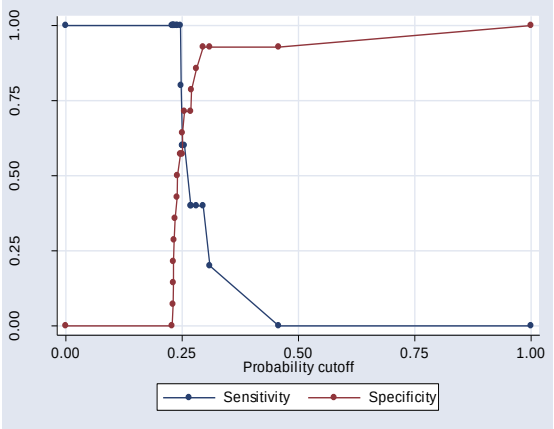




*Considerando refratariedade*

| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 100.00% | 0.00% | 26.32% | 1.0000 | |
| ( >= .078983 ) | 100.00% | 7.14% | 31.58% | 1.0769 | 0.0000 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= .080915 ) | 100.00% | 14.29% | 36.84% | 1.1667 | 0.0000 |
| ( >= .090718 ) | 100.00% | 21.43% | 42.11% | 1.2727 | 0.0000 |
| ( >= .130212 ) | 100.00% | 28.57% | 47.37% | 1.4000 | 0.0000 |
| ( >= .197275 ) | 100.00% | 35.71% | 52.63% | 1.5556 | 0.0000 |
| ( >= .32391 ) | 100.00% | 42.86% | 57.89% | 1.7500 | 0.0000 |
| ( >= .3516 ) | 100.00% | 50.00% | 63.16% | 2.0000 | 0.0000 |
| ( >= .527652 ) | 100.00% | 57.14% | 68.42% | 2.3333 | 0.0000 |
| ( >= .564317 ) | 80.00% | 57.14% | 63.16% | 1.8667 | 0.3500 |
| ( >= .64488 ) | 60.00% | 57.14% | 57.89% | 1.4000 | 0.7000 |
| ( >= .651635 ) | 60.00% | 64.29% | 63.16% | 1.6800 | 0.6222 |
| ( >= .7658 ) | 60.00% | 71.43% | 68.42% | 2.1000 | 0.5600 |
| ( >= 1.15876 ) | 40.00% | 71.43% | 63.16% | 1.4000 | 0.8400 |
| ( >= 1.18919 ) | 40.00% | 78.57% | 68.42% | 1.8667 | 0.7636 |
| ( >= 1.47173 ) | 40.00% | 85.71% | 73.68% | 2.8000 | 0.7000 |
| ( >= 1.84167 ) | 40.00% | 92.86% | 78.95% | 5.6000 | 0.6462 |
| ( >= 2.2052 ) | 20.00% | 92.86% | 73.68% | 2.8000 | 0.8615 |
| ( >= 5.56582 ) | 0.00% | 92.86% | 68.42% | 0.0000 | 10.769 |
| ( > 5.56582 ) | 0.00% | 100.00% | 73.68% | | 10.000 |

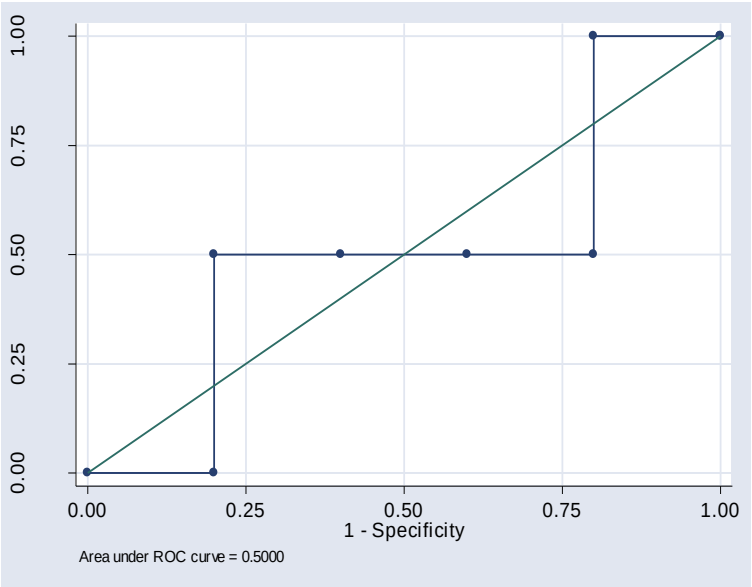


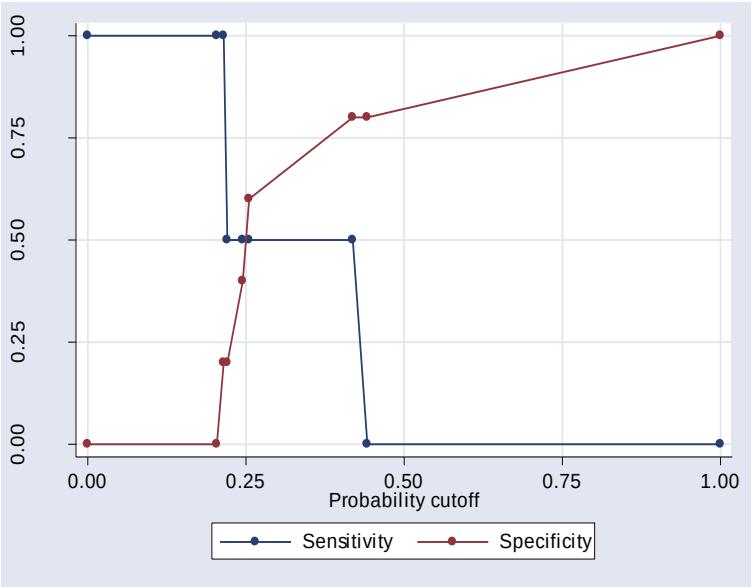



**ANEXO L -** Curvas de ROC para a expressão normatizada do gene LMO2

*Considerando recaída*

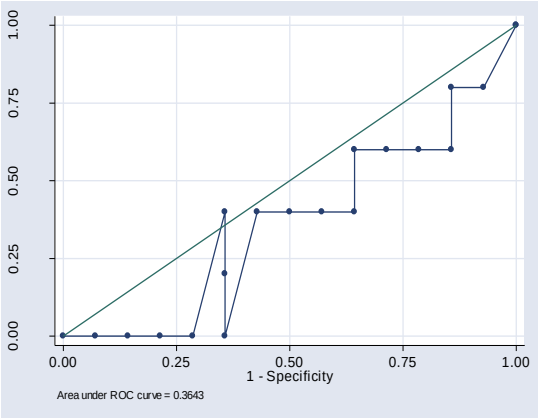
| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 100.00% | 0.00% | 28.57% | 1.0000 | |
| ( >= .451441 ) | 100.00% | 20.00% | 42.86% | 1.2500 | 0.0000 |
| ( >= .689232 ) | 50.00% | 20.00% | 28.57% | 0.6250 | 25.000 |
| ( >= 1.63584 ) | 50.00% | 40.00% | 42.86% | 0.8333 | 12.500 |
| ( >= 1.99125 ) | 50.00% | 60.00% | 57.14% | 1.2500 | 0.8333 |
| ( >= 7.14033 ) | 50.00% | 80.00% | 71.43% | 2.5000 | 0.6250 |
| ( >= 7.78468 ) | 0.00% | 80.00% | 57.14% | 0.0000 | 12.500 |
| ( > 7.78468 ) | 0.00% | 100.00% | 71.43% | | 10.000 |

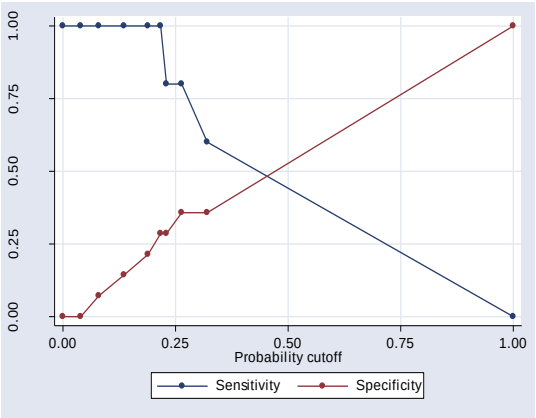


*Considerando refratariedade*

| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 0.00% | 100.00% | 73.68% | | 10.000 |
| ( >= .064892 ) | 0.00% | 92.86% | 68.42% | 0.0000 | 10.769 |
| ( >= .137646 ) | 0.00% | 85.71% | 63.16% | 0.0000 | 11.667 |
| ( >= .15704 ) | 0.00% | 78.57% | 57.89% | 0.0000 | 12.727 |
| ( >= .451441 ) | 0.00% | 71.43% | 52.63% | 0.0000 | 14.000 |
| ( >= .689232 ) | 0.00% | 64.29% | 47.37% | 0.0000 | 15.556 |
| ( >= .947131 ) | 20.00% | 64.29% | 52.63% | 0.5600 | 12.444 |
| ( >= 1.05113 ) | 40.00% | 64.29% | 57.89% | 1.1200 | 0.9333 |
| ( >= 1.63584 ) | 40.00% | 57.14% | 52.63% | 0.9333 | 10.500 |
| ( >= 1.99125 ) | 40.00% | 50.00% | 47.37% | 0.8000 | 12.000 |
| ( >= 2.57603 ) | 40.00% | 42.86% | 42.11% | 0.7000 | 14.000 |
| ( >= 4.07846 ) | 40.00% | 35.71% | 36.84% | 0.6222 | 16.800 |
| ( >= 6.5595 ) | 60.00% | 35.71% | 42.11% | 0.9333 | 11.200 |
| ( >= 7.14033 ) | 60.00% | 28.57% | 36.84% | 0.8400 | 14.000 |
| ( >= 7.78468 ) | 60.00% | 21.43% | 31.58% | 0.7636 | 18.667 |
| ( >= 10.9727 ) | 60.00% | 14.29% | 26.32% | 0.7000 | 28.000 |
| ( >= 13.7799 ) | 80.00% | 14.29% | 31.58% | 0.9333 | 14.000 |
| ( >= 17.506 ) | 80.00% | 7.14% | 26.32% | 0.8615 | 28.000 |
| ( > 17.506 ) | 100.00% | 0.00% | 26.32% | 1.0000 | |

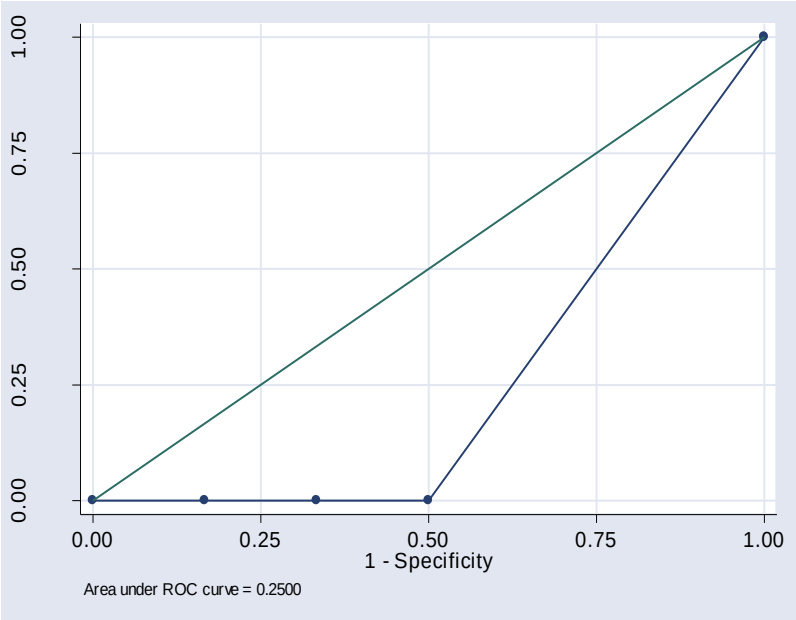


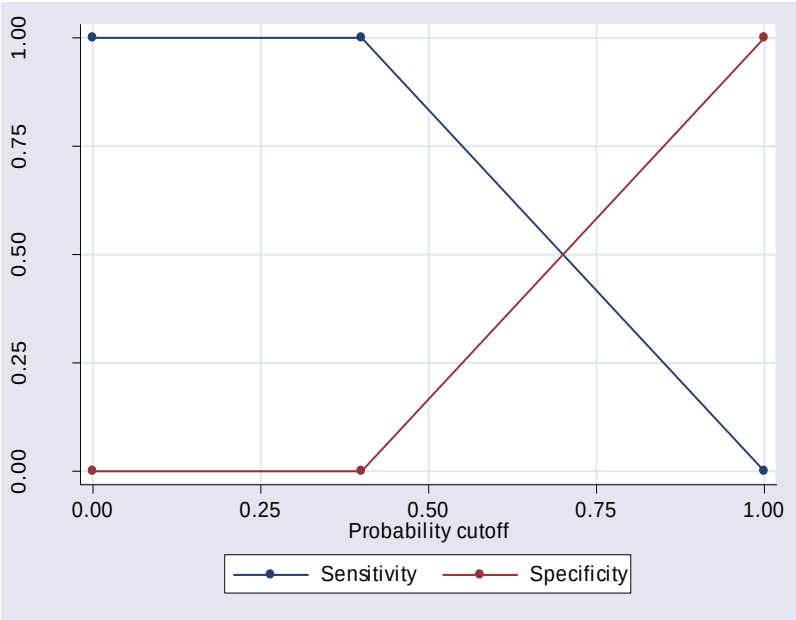



**ANEXO M -** Curvas de ROC para a expressão normatizada do gene POU2F1

*Considerando recaída*

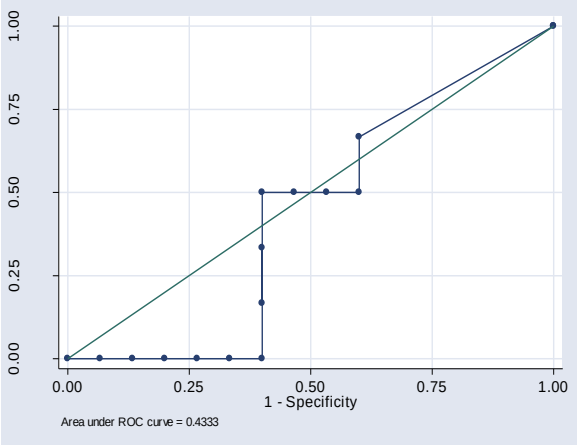
| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 0.00% | 100.00% | 75.00% | | 10.000 |
| ( >= 1.44819 ) | 0.00% | 83.33% | 62.50% | 0.0000 | 12.000 |
| ( >= 3.122 ) | 0.00% | 66.67% | 50.00% | 0.0000 | 15.000 |
| ( >= 6.14149 ) | 0.00% | 50.00% | 37.50% | 0.0000 | 20.000 |
| ( > 6.14149 ) | 100.00% | 0.00% | 25.00% | 1.0000 | |

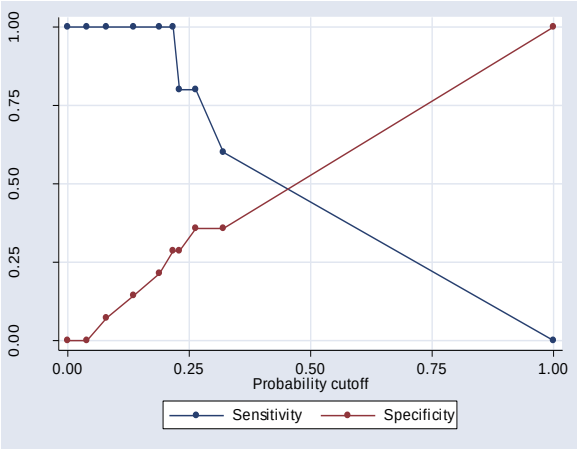


*Considerando refratariedade*

| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 0.00% | 100.00% | 71.43% | | 10.000 |
| ( >= 1.03322 ) | 0.00% | 93.33% | 66.67% | 0.0000 | 10.714 |
| ( >= 1.44819 ) | 0.00% | 86.67% | 61.90% | 0.0000 | 11.538 |
| ( >= 1.5677 ) | 0.00% | 80.00% | 57.14% | 0.0000 | 12.500 |
| ( >= 1.68257 ) | 0.00% | 73.33% | 52.38% | 0.0000 | 13.636 |
| ( >= 1.72209 ) | 0.00% | 66.67% | 47.62% | 0.0000 | 15.000 |
| ( >= 2.13402 ) | 0.00% | 60.00% | 42.86% | 0.0000 | 16.667 |
| ( >= 2.78342 ) | 16.67% | 60.00% | 47.62% | 0.4167 | 13.889 |
| ( >= 2.8278 ) | 33.33% | 60.00% | 52.38% | 0.8333 | 11.111 |
| ( >= 3.122 ) | 50.00% | 60.00% | 57.14% | 1.2500 | 0.8333 |
| ( >= 4.38556 ) | 50.00% | 53.33% | 52.38% | 1.0714 | 0.9375 |
| ( >= 4.48111 ) | 50.00% | 46.67% | 47.62% | 0.9375 | 10.714 |
| ( >= 6.14149 ) | 50.00% | 40.00% | 42.86% | 0.8333 | 12.500 |
| ( >= 6.30088 ) | 66.67% | 40.00% | 47.62% | 1.1111 | 0.8333 |
| ( > 6.30088 ) | 100.00% | 0.00% | 28.57% | 1.0000 | |

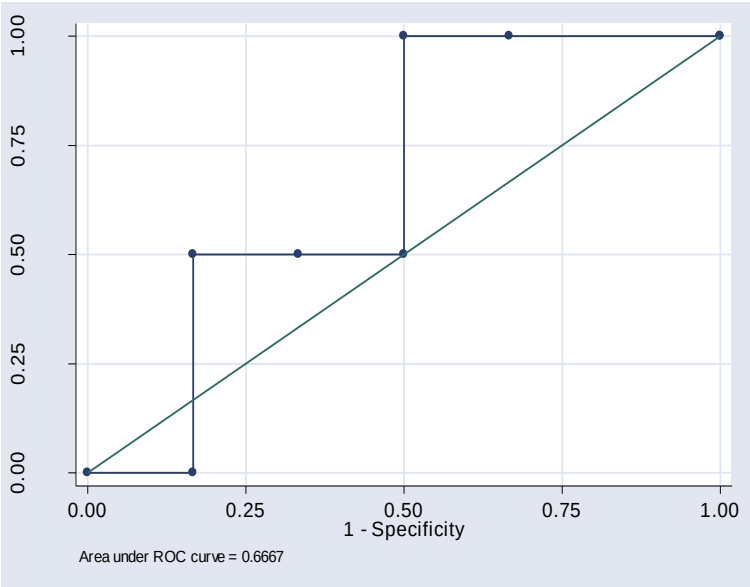


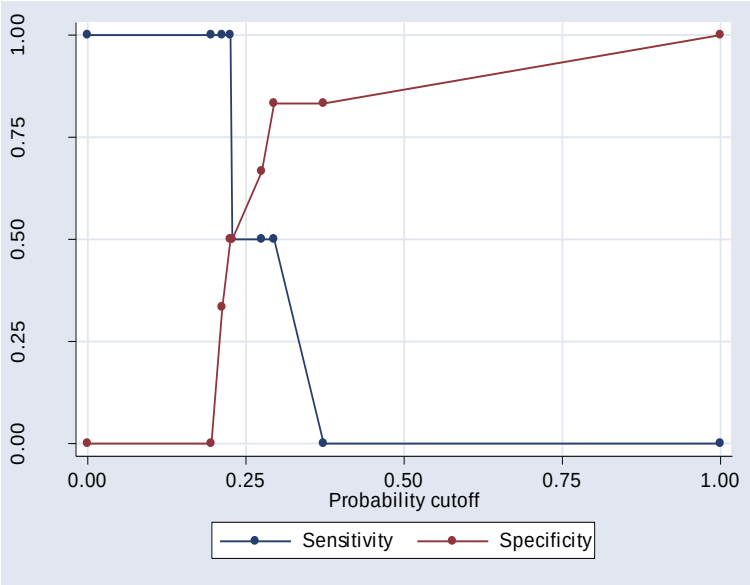



**ANEXO N -** Curvas de ROC para a expressão normatizada do gene BCL6

*Considerando recaída*

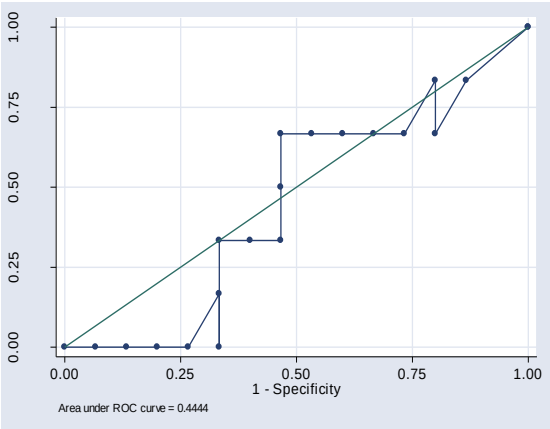
| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 100.00% | 0.00% | 25.00% | 1.0000 | |
| ( >= .638891 ) | 100.00% | 33.33% | 50.00% | 1.5000 | 0.0000 |
| ( >= 1.11303 ) | 100.00% | 50.00% | 62.50% | 2.0000 | 0.0000 |
| ( >= 1.20327 ) | 50.00% | 50.00% | 50.00% | 1.0000 | 10.000 |
| ( >= 2.7159 ) | 50.00% | 66.67% | 62.50% | 1.5000 | 0.7500 |
| ( >= 3.29719 ) | 50.00% | 83.33% | 75.00% | 3.0000 | 0.6000 |
| ( >= 5.44625 ) | 0.00% | 83.33% | 62.50% | 0.0000 | 12.000 |
| ( > 5.44625 ) | 0.00% | 100.00% | 75.00% | | 10.000 |

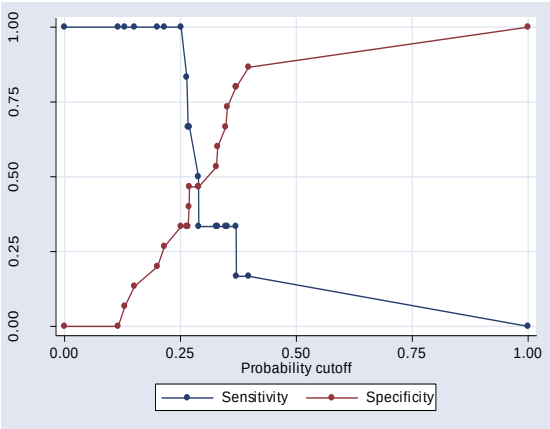


*Considerando refratariedade*

| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 0.00% | 100.00% | 71.43% | | 10.000 |
| ( >= .638891 ) | 0.00% | 93.33% | 66.67% | 0.0000 | 10.714 |
| ( >= .647623 ) | 0.00% | 86.67% | 61.90% | 0.0000 | 11.538 |
| ( >= 1.11303 ) | 0.00% | 80.00% | 57.14% | 0.0000 | 12.500 |
| ( >= 1.20327 ) | 0.00% | 73.33% | 52.38% | 0.0000 | 13.636 |
| ( >= 1.63957 ) | 0.00% | 66.67% | 47.62% | 0.0000 | 15.000 |
| ( >= 1.70344 ) | 16.67% | 66.67% | 52.38% | 0.5000 | 12.500 |
| ( >= 2.7159 ) | 33.33% | 66.67% | 57.14% | 1.0000 | 10.000 |
| ( >= 2.73477 ) | 33.33% | 60.00% | 52.38% | 0.8333 | 11.111 |
| ( >= 3.2766 ) | 33.33% | 53.33% | 47.62% | 0.7143 | 12.500 |
| ( >= 3.29719 ) | 50.00% | 53.33% | 52.38% | 1.0714 | 0.9375 |
| ( >= 3.34561 ) | 66.67% | 53.33% | 57.14% | 1.4286 | 0.6250 |
| ( >= 3.42655 ) | 66.67% | 46.67% | 52.38% | 1.2500 | 0.7143 |
| ( >= 3.78701 ) | 66.67% | 40.00% | 47.62% | 1.1111 | 0.8333 |
| ( >= 4.92334 ) | 66.67% | 33.33% | 42.86% | 1.0000 | 10.000 |
| ( >= 5.44625 ) | 66.67% | 26.67% | 38.10% | 0.9091 | 12.500 |
| ( >= 7.37557 ) | 66.67% | 20.00% | 33.33% | 0.8333 | 16.667 |
| ( >= 8.33685 ) | 83.33% | 20.00% | 38.10% | 1.0417 | 0.8333 |
| ( >= 9.09112 ) | 83.33% | 13.33% | 33.33% | 0.9615 | 12.500 |
| ( > 9.09112 ) | 100.00% | 0.00% | 28.57% | 1.0000 | |



**ANEXO O -** Construção das curvas de SG, SLP e SLD (método de Kaplan-Meier)

| Variável | SG (meses) | SLP (meses) | SLD (meses) |
|---|---|---|---|
| **Número de pacientes** | | | |
| n | 100% (35) | 100% (33) | 100% (15) |
| **Tempo de sobrevida depois diagnóstico *** | | | |
| média (ep) | 56,8 ( 10,34 ) | 53,8 ( 10,71 ) | 76,86 ( 16,58 ) |
| IC95% média | 36,5 ; 77,0 | 32,8 ; 74,8 | 44,36 ; 109,36 |
| mediana (ep) | **42,6 ( 8,18 )** | **41,0 ( 10,90 )** | **59,2 ( 13,93 )** |
| IC95% mediana | 26,6 ; 58,6 | 19,7 ; 62,4 | 31,94 ; 86,58 |
| limitado por | 171,8 | 171,8 | 163,4 |
| frequência | | | |
| **óbito** (n) | 74,3% ( 26 ) | 75,8% ( 25 ) | 53,3% ( 8 ) |
| **vivos** (n) | 25,7% ( 9 ) | 24,2% ( 8 ) | 46,6% ( 7 ) |
| **total** | 100,0% ( 35 ) | 100,0% ( 33 ) | 100,0% ( 15 ) |
| **Probabilidade de sobrevida** | | | |
| em 1 meses | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| em 2 meses | 0,971 | 0,970 | 1,000 |
| em 4 meses | 0,857 | 0,848 | 0,933 |
| em 6 meses | 0,829 | 0,818 | 0,933 |
| em 8 meses | 0,743 | 0,697 | 0,933 |
| em 12 meses | 0,734 | 0,697 | 0,933 |
| em 18 meses | 0,685 | 0,636 | 0,933 |
| em 24 meses | 0,655 | 0,636 | 0,933 |
| em 36 meses | 0,579 | 0,573 | 0,790 |
| em 48 meses | 0,438 | 0,371 | 0,565 |
| em 60 meses | 0,404 | 0,259 | 0,485 |
| em 90 meses | 0,215 | 0,162 | 0,258 |
| em150 meses | 0,144 | 0,162 | 0,258 |
| em 170 meses | 0,144 | 0,162 | |

**ANEXO P -** Expressão dos genes de interesse em relação à sua respectiva expressão proteica

(continua)

| Gene/Proteína de Interesse | IHQ 0% | IHQ 1%-25% | IHQ 26%-50% | IHQ 51%-75% | IHQ 76%-100% |
|---|---|---|---|---|---|
| **MYC** | | | | | |
| n | 3 | 2 | 4 | 5 | 6 |
| média (dp) | 0,205 ( 0,0087 ) | 0,089 ( 0,1255 ) | 0,053 ( 0,0480 ) | 0,291 ( 0,2865 ) | 0,293 ( 0,0844 ) |
| mediana | 0,202 | 0,089 | 0,050 | 0,341 | 0,270 |
| min ; max | 0,198 : 0,214 | 0,000 : 0,178 | 0,000 : 0,110 | 0,000 : 0,641 | 0,201 : 0,412 |
| **MGMT** | | | | | |
| n | 21 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| média (dp) | 0,760 ( 2,2315 ) | | | | |
| mediana | 0,000 | | | | |
| min ; max | 0,000 : 10,072 | | | | |
| **PDCD1** | | | | | |
| n | 18 | 2 | 0 | 0 | 1 |
| média (dp) | 1,545 ( 2,6101 ) | 0,000 ( 0,0000 ) | | | 0,000 ( . ) |
| mediana | 0,000 | 0,000 | | | |
| min ; max | 0,000 : 9,215 | 0,000 : 0,000 | | | |
| **BCL2** | | | | | |
| n | 1 | 1 | 1 | 4 | 14 |
| média (dp) | 0,000 ( . ) | 0,197 ( . ) | 0,079 ( . ) | 0,716 ( 0,5564 ) | 1,135 ( 1,4370 ) |
| mediana | | | | 0,770 | 0,648 |
| min ; max | | | | 0,130 : 1,194 | 0,000 : 5,566 |

**ANEXO P -** Expressão dos genes de interesse em relação à sua respectiva expressão proteica

(conclusão)

| Gene/Proteína de Interesse | IHQ 0% | IHQ 1%-25% | IHQ 26%-50% | IHQ 51%-75% | IHQ 76%-100% |
|---|---|---|---|---|---|
| **LMO2** | | | | | |
| n | 9 | 1 | 4 | 3 | 4 |
| média (dp) | 2,940 ( 4,6009 ) | 0,138 ( . ) | 0,783 ( 0,8547 ) | 5,062 ( 5,1408 ) | 9,127 ( 5,8151 ) |
| mediana | 0,947 | | 0,570 | 2,576 | 7,463 |
| min ; max | 0,000 : 13,780 | | 0,000 : 1,991 | 1,636 : 10,973 | 4,078 : 17,506 |
| **POU2F1** | | | | | |
| n | 0 | 1 | 0 | 0 | 22 |
| média (dp) | | 1,568 ( . ) | | | 1,756 ( 2,0497 ) |
| mediana | | | | | 1,241 |
| min ; max | | | | | 0,000 : 6,301 |

dp - desvio padrão

## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


1. Foon KA, Litchman MA. General considerations of lymphoma: epidemiology, etiology, heterogeneity and primary extranodal disease. Williams Hematology. 8th ed: McGraw Hill Medical; 2010. p. 1497-507.
2. Surveillance EaERP. Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) program. http://seer.cancer.gov/statfacts/html/nhl/html2015 [cited 2015 06/16].
3. Noone AM HN, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2015,. https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/: National Cancer Institute; 2018 [cited November 2017 10/27/2018]; Available from: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/.
4. Rizvi MA, Evens AM, Nelson BP. T-cell lymphoma. In: Marcus R, editor. Lymphoma: Pathology, Diagnosis and Treatment. 1st ed: Cambridge; 2007. p. 215-32.
5. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.
6. Swerdlow SH CE, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised Fourth Edition. WHO Classification of Tumours V, editor: IARC/WHO; 2017. 586 p.
7. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil Rio de Janeiro: Fox Print; 2018. 130 p.
8. Quintanilla-Martinez L. The 2016 updated WHO classification of lymphoid neoplasias. Hematol Oncol. 2017;35 Suppl 1:37-45.
9. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature. 2000;403(6769):503-11.
10. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. Blood. 2004;103(1):275-82.
11. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. N Engl J Med. 2002;346(25):1937-47.
12. Hattab EM, Martin SE, Al-Khatib SM, Kupsky WJ, Vance GH, Stohler RA, et al. Most primary central nervous system diffuse large B-cell lymphomas occurring in immunocompetent individuals belong to the nongerminal center subtype: a retrospective analysis of 31 cases. Mod Pathol. 2010;23(2):235-43.

13. Deckert M, Brunn A, Montesinos-Rongen M, Terreni MR, Ponzoni M. Primary lymphoma of the central nervous system--a diagnostic challenge. Hematol Oncol. 2014;32(2):57-67.
14. Mahadevan A, Rao CR, Shanmugham M, Shankar SK. Primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma in the immunocompetent: Immunophenotypic subtypes and Epstein-Barr virus association. J Neurosci Rural Pract. 2015;6(1):8-14.
15. Shan Y, Hu Y. Prognostic Factors and Survival in Primary Central Nervous System Lymphoma: A Population-Based Study. Dis Markers. 2018;2018:7860494.
16. Korfel A, Schlegel U. Diagnosis and treatment of primary CNS lymphoma. Nat Rev Neurol. 2013;9(6):317-27.
17. Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. Neuro Oncol. 2012;14 Suppl 5:v1-49.
18. O'Neill BP, Decker PA, Tieu C, Cerhan JR. The changing incidence of primary central nervous system lymphoma is driven primarily by the changing incidence in young and middle-aged men and differs from time trends in systemic diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma. Am J Hematol. 2013;88(12):997-1000.
19. Shiels MS, Pfeiffer RM, Besson C, Clarke CA, Morton LM, Nogueira L, et al. Trends in primary central nervous system lymphoma incidence and survival in the U.S. Br J Haematol. 2016;174(3):417-24.
20. Citterio G, Reni M, Gatta G, Ferreri AJM. Primary central nervous system lymphoma. Crit Rev Oncol Hematol. 2017;113:97-110.
21. Hoang-Xuan K, Bessell E, Bromberg J, Hottinger AF, Preusser M, Ruda R, et al. Diagnosis and treatment of primary CNS lymphoma in immunocompetent patients: guidelines from the European Association for Neuro-Oncology. Lancet Oncol. 2015;16(7):e322-32.
22. Thiel E, Korfel A, Martus P, Kanz L, Griesinger F, Rauch M, et al. High-dose methotrexate with or without whole brain radiotherapy for primary CNS lymphoma (G-PCNSL-SG-1): a phase 3, randomised, non-inferiority trial. Lancet Oncol. 2010;11(11):1036-47.
23. Rubenstein JL, Hsi ED, Johnson JL, Jung SH, Nakashima MO, Grant B, et al. Intensive chemotherapy and immunotherapy in patients with newly diagnosed primary CNS lymphoma: CALGB 50202 (Alliance 50202). J Clin Oncol. 2013;31(25):3061-8.
24. Rubenstein JL. Biology of CNS lymphoma and the potential of novel agents. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2017;2017(1):556-64.
25. Vaux DL. Immunology. Ways around rejection. Nature. 1998;394(6689):133.
26. Otake Y, Soundararajan S, Sengupta TK, Kio EA, Smith JC, Pineda-Roman M, et al. Overexpression of nucleolin in chronic lymphocytic leukemia cells induces stabilization of bcl2 mRNA. Blood. 2007;109(7):3069-75.

27. Stine ZE, Walton ZE, Altman BJ, Hsieh AL, Dang CV. MYC, Metabolism, and Cancer. Cancer Discov. 2015;5(10):1024-39.
28. Cubedo E, Gentles AJ, Huang C, Natkunam Y, Bhatt S, Lu X, et al. Identification of LMO2 transcriptome and interactome in diffuse large B-cell lymphoma. Blood. 2012;119(23):5478-91.
29. Toffolatti L, Scquizzato E, Cavallin S, Canal F, Scarpa M, Stefani PM, et al. MGMT promoter methylation and correlation with protein expression in primary central nervous system lymphoma. Virchows Arch. 2014;465(5):579-86.
30. Gupta S, Wulf G, Henjakovic M, Koepsell H, Burckhardt G, Hagos Y. Human organic cation transporter 1 is expressed in lymphoma cells and increases susceptibility to irinotecan and paclitaxel. J Pharmacol Exp Ther. 2012;341(1):16-23.
31. Andreev E, Brosseau N, Carmona E, Mes-Masson AM, Ramotar D. The human organic cation transporter OCT1 mediates high affinity uptake of the anticancer drug daunorubicin. Sci Rep. 2016;6:20508.
32. Vazquez-Arreguin K, Tantin D. The Oct1 transcription factor and epithelial malignancies: Old protein learns new tricks. Biochim Biophys Acta. 2016;1859(6):792-804.
33. Nayak L, Iwamoto FM, LaCasce A, Mukundan S, Roemer MGM, Chapuy B, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed/refractory primary central nervous system and testicular lymphoma. Blood. 2017;129(23):3071-3.
34. Chapuy B, Roemer MG, Stewart C, Tan Y, Abo RP, Zhang L, et al. Targetable genetic features of primary testicular and primary central nervous system lymphomas. Blood. 2016;127(7):869-81.
35. Pasqualucci L, Dalla-Favera R. Genetics of diffuse large B-cell lymphoma. Blood. 2018;131(21):2307-19.
36. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. Blood. 2016;127(20):2375-90.
37. Deckert M, Montesinos-Rongen M, Brunn A, Siebert R. Systems biology of primary CNS lymphoma: from genetic aberrations to modeling in mice. Acta Neuropathol. 2014;127(2):175-88.
38. Chan CC, Rubenstein JL, Coupland SE, Davis JL, Harbour JW, Johnston PB, et al. Primary vitreoretinal lymphoma: a report from an International Primary Central Nervous System Lymphoma Collaborative Group symposium. Oncologist. 2011;16(11):1589-99.
39. Phillips EH, Fox CP, Cwynarski K. Primary CNS lymphoma. Curr Hematol Malig Rep. 2014;9(3):243-53.
40. Grimm SA, Pulido JS, Jahnke K, Schiff D, Hall AJ, Shenkier TN, et al. Primary intraocular lymphoma: an International Primary Central Nervous System Lymphoma Collaborative Group Report. Ann Oncol. 2007;18(11):1851-5.

41. Braaten KM, Betensky RA, de Leval L, Okada Y, Hochberg FH, Louis DN, et al. BCL-6 expression predicts improved survival in patients with primary central nervous system lymphoma. Clin Cancer Res. 2003;9(3):1063-9.
42. Riemersma SA, Jordanova ES, Schop RF, Philippo K, Looijenga LH, Schuuring E, et al. Extensive genetic alterations of the HLA region, including homozygous deletions of HLA class II genes in B-cell lymphomas arising in immune-privileged sites. Blood. 2000;96(10):3569-77.
43. Wong SF, Gan HK, Cher L. A single centre study of the treatment of relapsed primary central nervous system lymphoma (PCNSL) with single agent temozolomide. J Clin Neurosci. 2012;19(11):1501-5.
44. Bromberg JE, Doorduijn JK, Illerhaus G, Jahnke K, Korfel A, Fischer L, et al. Central nervous system recurrence of systemic lymphoma in the era of stem cell transplantation--an International Primary Central Nervous System Lymphoma Study Group project. Haematologica. 2013;98(5):808-13.
45. Mappa S, Marturano E, Licata G, Frezzato M, Frungillo N, Ilariucci F, et al. Salvage chemoimmunotherapy with rituximab, ifosfamide and etoposide (R-IE regimen) in patients with primary CNS lymphoma relapsed or refractory to high-dose methotrexate-based chemotherapy. Hematol Oncol. 2013;31(3):143-50.
46. Mendez JS, Ostrom QT, Gittleman H, Kruchko C, DeAngelis LM, Barnholtz-Sloan JS, et al. The elderly left behind-changes in survival trends of primary central nervous system lymphoma over the past 4 decades. Neuro Oncol. 2018;20(5):687-94.
47. Batchelor T, Loeffler JS. Primary CNS lymphoma. J Clin Oncol. 2006;24(8):1281-8.
48. Villano JL, Koshy M, Shaikh H, Dolecek TA, McCarthy BJ. Age, gender, and racial differences in incidence and survival in primary CNS lymphoma. Br J Cancer. 2011;105(9):1414-8.
49. Abrey LE. Primary central nervous system lymphoma. Curr Opin Neurol. 2009;22(6):675-80.
50. Pitelle JEH. Stereotactic biopsy in the diagnosis of brain tumors and non-neoplastic lesions: prescription, accuracy and diagnostic difficulties. J Bras Patol Med Lab. 2008;44(5):11.
51. Abrey LE, Batchelor TT, Ferreri AJ, Gospodarowicz M, Pulczynski EJ, Zucca E, et al. Report of an international workshop to standardize baseline evaluation and response criteria for primary CNS lymphoma. J Clin Oncol. 2005;23(22):5034-43.
52. Sabattini E, Bacci F, Sagramoso C, Pileri SA. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview. Pathologica. 2010;102(3):83-7.
53. Camilleri-Broet S, Criniere E, Broet P, Delwail V, Mokhtari K, Moreau A, et al. A uniform activated B-cell-like immunophenotype might explain the poor prognosis of primary central nervous system lymphomas: analysis of 83 cases. Blood. 2006;107(1):190-6.

54. Ponzoni M, Issa S, Batchelor TT, Rubenstein JL. Beyond high-dose methotrexate and brain radiotherapy: novel targets and agents for primary CNS lymphoma. Ann Oncol. 2014;25(2):316-22.
55. Rubenstein JL, Wong VS, Kadoch C, Gao HX, Barajas R, Chen L, et al. CXCL13 plus interleukin 10 is highly specific for the diagnosis of CNS lymphoma. Blood. 2013;121(23):4740-8.
56. Ponzoni M, Berger F, Chassagne-Clement C, Tinguely M, Jouvet A, Ferreri AJ, et al. Reactive perivascular T-cell infiltrate predicts survival in primary central nervous system B-cell lymphomas. Br J Haematol. 2007;138(3):316-23.
57. Batchelor TT. Primary central nervous system lymphoma. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2016;2016(1):379-85.
58. Maza S, Buchert R, Brenner W, Munz DL, Thiel E, Korfel A, et al. Brain and whole-body FDG-PET in diagnosis, treatment monitoring and long-term follow-up of primary CNS lymphoma. Radiol Oncol. 2013;47(2):103-10.
59. Kuker W, Nagele T, Korfel A, Heckl S, Thiel E, Bamberg M, et al. Primary central nervous system lymphomas (PCNSL): MRI features at presentation in 100 patients. J Neurooncol. 2005;72(2):169-77.
60. Zou Y, Tong J, Leng H, Jiang J, Pan M, Chen Z. Diagnostic value of using 18F-FDG PET and PET/CT in immunocompetent patients with primary central nervous system lymphoma: A systematic review and meta-analysis. Oncotarget. 2017;8(25):41518-28.
61. Tabouret E, Houillier C, Martin-Duverneuil N, Blonski M, Soussain C, Ghesquieres H, et al. Patterns of response and relapse in primary CNS lymphomas after first-line chemotherapy: imaging analysis of the ANOCEF-GOELAMS prospective randomized trial. Neuro Oncol. 2017;19(3):422-9.
62. Wieduwilt MJ, Valles F, Issa S, Behler CM, Hwang J, McDermott M, et al. Immunochemotherapy with intensive consolidation for primary CNS lymphoma: a pilot study and prognostic assessment by diffusion-weighted MRI. Clin Cancer Res. 2012;18(4):1146-55.
63. Zhang Y, Zhang Q, Wang XX, Deng XF, Zhu YZ. Value of pretherapeutic DWI in evaluating prognosis and therapeutic effect in immunocompetent patients with primary central nervous system lymphoma given high-dose methotrexate-based chemotherapy: ADC-based assessment. Clin Radiol. 2016.
64. Isasi CR, Lu P, Blaufox MD. A metaanalysis of 18F-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose positron emission tomography in the staging and restaging of patients with lymphoma. Cancer. 2005;104(5):1066-74.
65. Soares Jr J, Fonseca RP, Cerci JJ, Buchpigue CA, Cunha MLd, Mamed M, et al. Recommendations on the use of 18F-FDG PET/CT in Oncology. Consensus between the Brazilian Society of Cancerology and the Brazilian Society of Biology, Nuclear Medicine and Molecular Imaging. Radiol Bras. 2010;43(4):255-9.
66. Kosaka N, Tsuchida T, Uematsu H, Kimura H, Okazawa H, Itoh H. 18F-FDG PET of common enhancing malignant brain tumors. AJR Am J Roentgenol. 2008;190(6):W365-9.

67. Fallah J, Qunaj L, Olszewski AJ. Therapy and outcomes of primary central nervous system lymphoma in the United States: analysis of the National Cancer Database. Blood Adv. 2016;1(2):112-21.
68. Ferreri AJ, Abrey LE, Blay JY, Borisch B, Hochman J, Neuwelt EA, et al. Summary statement on primary central nervous system lymphomas from the Eighth International Conference on Malignant Lymphoma, Lugano, Switzerland, June 12 to 15, 2002. J Clin Oncol. 2003;21(12):2407-14.
69. Cady FM, O'Neill BP, Law ME, Decker PA, Kurtz DM, Giannini C, et al. Del(6)(q22) and BCL6 rearrangements in primary CNS lymphoma are indicators of an aggressive clinical course. J Clin Oncol. 2008;26(29):4814-9.
70. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Oncol. 1982;5(6):649-55.
71. Kasenda B, Ferreri AJ, Marturano E, Forst D, Bromberg J, Ghesquieres H, et al. First-line treatment and outcome of elderly patients with primary central nervous system lymphoma (PCNSL)--a systematic review and individual patient data meta-analysis. Ann Oncol. 2015;26(7):1305-13.
72. Nayak L, Batchelor TT. Recent advances in treatment of primary central nervous system lymphoma. Curr Treat Options Oncol. 2013;14(4):539-52.
73. Ferreri AJ, Cwynarski K, Pulczynski E, Ponzoni M, Deckert M, Politi LS, et al. Chemoimmunotherapy with methotrexate, cytarabine, thiotepa, and rituximab (MATRix regimen) in patients with primary CNS lymphoma: results of the first randomisation of the International Extranodal Lymphoma Study Group-32 (IELSG32) phase 2 trial. Lancet Haematol. 2016;3(5):e217-27.
74. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. J Clin Oncol. 2012;30(28):3452-9.
75. Four M, Cacheux V, Tempier A, Platero D, Fabbro M, Marin G, et al. PD1 and PDL1 expression in primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma are frequent and expression of PD1 predicts poor survival. Hematol Oncol. 2017;35(4):487-96.
76. Scott DW, Wright GW, Williams PM, Lih CJ, Walsh W, Jaffe ES, et al. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. Blood. 2014;123(8):1214-7.
77. Bodor C, Alpár D, Marosvári D, Rajnai H, Dudela B, Kajtár B, et al. Cell of origin and genomic profile of primary central nervous system lymphoma determined using the nanostring lst assay and ultra deep targeted next generation sequencing. Blood. 2017;130(Suppl 1):4009-.
78. Wilson WH, Young RM, Schmitz R, Yang Y, Pittaluga S, Wright G, et al. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. Nat Med. 2015;21(8):922-6.

79. Villa D, Slack GW, Al-Moosawi M, Ben-Neriah S, Shenkier T, Connors JM, et al. Molecular Features of Primary Central Nervous System Lymphoma in a Large Tissue Microarray. Blood. 2018;132(Suppl 1):348.
80. Maguire A, Hilal T, Chen X, Rosenthal AC, Rimsza LM. Enhanced Expression of FGF Signaling in Primary Central Nervous System Lymphoma. Blood. 2018;132(suppl 1):2847.
81. Kreher S, Johrens K, Strehlow F, Martus P, Borowiec K, Radke J, et al. Prognostic impact of B-cell lymphoma 6 in primary CNS lymphoma. Neuro Oncol. 2015;17(7):1016-21.
82. Oliveira JL, Grogg KL, Macon WR, Dogan A, Feldman AL. Clinicopathologic features of B-Cell lineage neoplasms with aberrant expression of CD3: a study of 21 cases. Am J Surg Pathol. 2012;36(9):1364-70.
83. Wang J, Chen C, Lau S, Raghavan RI, Rowsell EH, Said J, et al. CD3-positive large B-cell lymphoma. Am J Surg Pathol. 2009;33(4):505-12.
84. Lazzi S, Bellan C, Onnis A, De Falco G, Sayed S, Kostopoulos I, et al. Rare lymphoid neoplasms coexpressing B- and T-cell antigens. The role of PAX-5 gene methylation in their pathogenesis. Hum Pathol. 2009;40(9):1252-61.
85. Campana D, Thompson JS, Amlot P, Brown S, Janossy G. The cytoplasmic expression of CD3 antigens in normal and malignant cells of the T lymphoid lineage. J Immunol. 1987;138(2):648-55.
86. Chetty R, Gatter K. CD3: structure, function, and role of immunostaining in clinical practice. J Pathol. 1994;173(4):303-7.
87. Rathore AS, Kumar S, Konwar R, Makker A, Negi MP, Goel MM. CD3+, CD4+ & CD8+ tumour infiltrating lymphocytes (TILs) are predictors of favourable survival outcome in infiltrating ductal carcinoma of breast. Indian J Med Res. 2014;140(3):361-9.
88. Tomsova M, Melichar B, Sedlakova I, Steiner I. Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma. Gynecol Oncol. 2008;108(2):415-20.
89. Cermakova P, Melichar B, Tomsova M, Zoul Z, Kalabova H, Spacek J, et al. Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in patients with endometrial carcinoma. Anticancer Res. 2014;34(10):5555-61.
90. He M, Zuo C, Wang J, Liu J, Jiao B, Zheng J, et al. Prognostic significance of the aggregative perivascular growth pattern of tumor cells in primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma. Neuro Oncol. 2013;15(6):727-34.
91. Kumari N, Krishnani N, Rawat A, Agarwal V, Lal P. Primary central nervous system lymphoma: prognostication as per international extranodal lymphoma study group score and reactive CD3 collar. J Postgrad Med. 2009;55(4):247-51.
92. Ferreri AJM. Therapy of primary CNS lymphoma: role of intensity, radiation, and novel agents. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2017;2017(1):565-77.

93. Langner-Lemercier S, Houillier C, Soussain C, Ghesquieres H, Chinot O, Taillandier L, et al. Primary CNS lymphoma at first relapse/progression: characteristics, management, and outcome of 256 patients from the French LOC network. Neuro Oncol. 2016;18(9):1297-303.
94. Correa DD, Maron L, Harder H, Klein M, Armstrong CL, Calabrese P, et al. Cognitive functions in primary central nervous system lymphoma: literature review and assessment guidelines. Ann Oncol. 2007;18(7):1145-51.
95. Nelson DF, Martz KL, Bonner H, Nelson JS, Newall J, Kerman HD, et al. Non-Hodgkin's lymphoma of the brain: can high dose, large volume radiation therapy improve survival? Report on a prospective trial by the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG): RTOG 8315. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1992;23(1):9-17.
96. Alvarez-Pinzon AM, Wolf AL, Swedberg H, Coy SR, Valerio JE. Primary Central Nervous System Lymphoma (PCNSL): Analysis of Treatment by Gamma Knife Radiosurgery and Chemotherapy in a Prospective, Observational Study. Cureus. 2016;8(7):e697.
97. Morris PG, Correa DD, Yahalom J, Raizer JJ, Schiff D, Grant B, et al. Rituximab, methotrexate, procarbazine, and vincristine followed by consolidation reduced-dose whole-brain radiotherapy and cytarabine in newly diagnosed primary CNS lymphoma: final results and long-term outcome. J Clin Oncol. 2013;31(31):3971-9.
98. Doolittle ND, Korfel A, Lubow MA, Schorb E, Schlegel U, Rogowski S, et al. Long-term cognitive function, neuroimaging, and quality of life in primary CNS lymphoma. Neurology. 2013;81(1):84-92.
99. Lai R, Abrey LE, Rosenblum MK, DeAngelis LM. Treatment-induced leukoencephalopathy in primary CNS lymphoma: a clinical and autopsy study. Neurology. 2004;62(3):451-6.
100. Correa DD, DeAngelis LM, Shi W, Thaler HT, Lin M, Abrey LE. Cognitive functions in low-grade gliomas: disease and treatment effects. J Neurooncol. 2007;81(2):175-84.
101. Ferreri AJ. How I treat primary CNS lymphoma. Blood. 2011;118(3):510-22.
102. Batchelor T, Carson K, O'Neill A, Grossman SA, Alavi J, New P, et al. Treatment of primary CNS lymphoma with methotrexate and deferred radiotherapy: a report of NABTT 96-07. J Clin Oncol. 2003;21(6):1044-9.
103. Zhu JJ, Gerstner ER, Engler DA, Mrugala MM, Nugent W, Nierenberg K, et al. High-dose methotrexate for elderly patients with primary CNS lymphoma. Neuro Oncol. 2009;11(2):211-5.
104. Ferreri AJ, Reni M, Foppoli M, Martelli M, Pangalis GA, Frezzato M, et al. High-dose cytarabine plus high-dose methotrexate versus high-dose methotrexate alone in patients with primary CNS lymphoma: a randomised phase 2 trial. Lancet. 2009;374(9700):1512-20.
105. Batchelor TT, Grossman SA, Mikkelsen T, Ye X, Desideri S, Lesser GJ. Rituximab monotherapy for patients with recurrent primary CNS lymphoma. Neurology. 2011;76(10):929-30.

106. Song Y, Wen Y, Xue W, Zhang Y, Zhang M. Effect of rituximab on primary central nervous system lymphoma: a meta-analysis. Int J Hematol. 2017;106(5):612-21.
107. Omuro A, Correa DD, DeAngelis LM, Moskowitz CH, Matasar MJ, Kaley TJ, et al. R-MPV followed by high-dose chemotherapy with TBC and autologous stem-cell transplant for newly diagnosed primary CNS lymphoma. Blood. 2015;125(9):1403-10.
108. Glass J, Won M, Schultz CJ, Brat D, Bartlett NL, Suh JH, et al. Phase I and II Study of Induction Chemotherapy With Methotrexate, Rituximab, and Temozolomide, Followed By Whole-Brain Radiotherapy and Postirradiation Temozolomide for Primary CNS Lymphoma: NRG Oncology RTOG 0227. J Clin Oncol. 2016;34(14):1620-5.
109. Omuro A, Chinot O, Taillandier L, Ghesquieres H, Soussain C, Delwail V, et al. Methotrexate and temozolomide versus methotrexate, procarbazine, vincristine, and cytarabine for primary CNS lymphoma in an elderly population: an intergroup ANOCEF-GOELAMS randomised phase 2 trial. Lancet Haematol. 2015;2(6):e251-9.
110. Rubenstein JL, Li J, Chen L, Advani R, Drappatz J, Gerstner E, et al. Multicenter phase 1 trial of intraventricular immunochemotherapy in recurrent CNS lymphoma. Blood. 2013;121(5):745-51.
111. Khan RB, Shi W, Thaler HT, DeAngelis LM, Abrey LE. Is intrathecal methotrexate necessary in the treatment of primary CNS lymphoma? J Neurooncol. 2002;58(2):175-8.
112. Rubenstein JL, Fridlyand J, Abrey L, Shen A, Karch J, Wang E, et al. Phase I study of intraventricular administration of rituximab in patients with recurrent CNS and intraocular lymphoma. J Clin Oncol. 2007;25(11):1350-6.
113. Sierra Del Rio M, Ricard D, Houillier C, Navarro S, Gonzalez-Aguilar A, Idbaih A, et al. Prophylactic intrathecal chemotherapy in primary CNS lymphoma. J Neurooncol. 2012;106(1):143-6.
114. Ferreri AJ, Sassone M, Zaja F, Re A, Spina M, Rocco AD, et al. Lenalidomide maintenance in patients with relapsed diffuse large B-cell lymphoma who are not eligible for autologous stem cell transplantation: an open label, single-arm, multicentre phase 2 trial. Lancet Haematol. 2017;4(3):e137-e46.
115. Houillier C, Taillandier L, Lamy T, Chinot O, Molucon-Chabrot C, Soubeyran P, et al. Whole Brain Radiotherapy (WBRT) Versus Intensive Chemotherapy with Haematopoietic Stem Cell Rescue (IC + HCR) for Primary Central Nervous System Lymphoma (PCNSL) in Young Patients: An Intergroup Anocef-Goelams Randomized Phase II Trial (PRECIS). Blood. 2016;128(22):782.
116. Ferreri AJ, Illerhaus G. The role of autologous stem cell transplantation in primary central nervous system lymphoma. Blood. 2016;127(13):1642-9.
117. Kasenda B, Ihorst G, Schroers R, Korfel A, Schmidt-Wolf I, Egerer G, et al. High-dose chemotherapy with autologous haematopoietic stem cell support for relapsed or refractory primary CNS lymphoma: a prospective

multicentre trial by the German Cooperative PCNSL study group. Leukemia. 2017;31(12):2623-9.

118. Illerhaus G, Kasenda B, Ihorst G, Egerer G, Lamprecht M, Keller U, et al. High-dose chemotherapy with autologous haemopoietic stem cell transplantation for newly diagnosed primary CNS lymphoma: a prospective, single-arm, phase 2 trial. Lancet Haematol. 2016;3(8):e388-97.
119. Plotkin SR, Betensky RA, Hochberg FH, Grossman SA, Lesser GJ, Nabors LB, et al. Treatment of relapsed central nervous system lymphoma with high-dose methotrexate. Clin Cancer Res. 2004;10(17):5643-6.
120. Soussain C, Hoang-Xuan K, Taillandier L, Fourme E, Choquet S, Witz F, et al. Intensive chemotherapy followed by hematopoietic stem-cell rescue for refractory and recurrent primary CNS and intraocular lymphoma: Societe Francaise de Greffe de Moelle Osseuse-Therapie Cellulaire. J Clin Oncol. 2008;26(15):2512-8.
121. Nguyen PL, Chakravarti A, Finkelstein DM, Hochberg FH, Batchelor TT, Loeffler JS. Results of whole-brain radiation as salvage of methotrexate failure for immunocompetent patients with primary CNS lymphoma. J Clin Oncol. 2005;23(7):1507-13.
122. Sagiv-Barfi I, Kohrt HE, Czerwinski DK, Ng PP, Chang BY, Levy R. Therapeutic antitumor immunity by checkpoint blockade is enhanced by ibrutinib, an inhibitor of both BTK and ITK. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(9):E966-72.
123. Grommes C, Pastore A, Palaskas N, Tang SS, Campos C, Schartz D, et al. Ibrutinib Unmasks Critical Role of Bruton Tyrosine Kinase in Primary CNS Lymphoma. Cancer Discov. 2017;7(9):1018-29.
124. Grommes C, Younes A. Ibrutinib in PCNSL: The Curious Cases of Clinical Responses and Aspergillosis. Cancer Cell. 2017;31(6):731-3.
125. Lionakis MS, Dunleavy K, Roschewski M, Widemann BC, Butman JA, Schmitz R, et al. Inhibition of B Cell Receptor Signaling by Ibrutinib in Primary CNS Lymphoma. Cancer Cell. 2017;31(6):833-43 e5.
126. Hendriks RW, Yuvaraj S, Kil LP. Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. Nat Rev Cancer. 2014;14(4):219-32.
127. Korfel A, Schlegel U, Herrlinger U, Dreyling M, Schmidt C, von Baumgarten L, et al. Phase II Trial of Temsirolimus for Relapsed/Refractory Primary CNS Lymphoma. J Clin Oncol. 2016;34(15):1757-63.
128. Lopez-Girona A, Mendy D, Ito T, Miller K, Gandhi AK, Kang J, et al. Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide. Leukemia. 2012;26(11):2326-35.
129. Kronke J, Udeshi ND, Narla A, Grauman P, Hurst SN, McConkey M, et al. Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells. Science. 2014;343(6168):301-5.
130. Rubenstein JL, Fraser E, Formaker P, Lee JC-C, Chen N, Kock M, et al. Phase I investigation of lenalidomide plus rituximab and outcomes of lenalidomide

maintenance in recurrent CNS lymphoma. In: American Society of Clinical O, editor. ASCO 2016; Chicago, IL2016.

131. Braggio E, Van Wier S, Ojha J, McPhail E, Asmann YW, Egan J, et al. Genome-Wide Analysis Uncovers Novel Recurrent Alterations in Primary Central Nervous System Lymphomas. Clin Cancer Res. 2015;21(17):3986-94.
132. Rubenstein JL, Fridlyand J, Shen A, Aldape K, Ginzinger D, Batchelor T, et al. Gene expression and angiotropism in primary CNS lymphoma. Blood. 2006;107(9):3716-23.
133. Barakat M, Albitar M, Whitney RL, Chen C, Kuo Y-H, Silveira W, et al. Diversity of genetic alterations of primary central nervous system lymphoma in Hispanic versus non-Hispanic population. J Clin Oncol. 2019;37(15_suppl):7535-.
134. Knittel G, Liedgens P, Korovkina D, Seeger JM, Al-Baldawi Y, Al-Maarri M, et al. B-cell-specific conditional expression of Myd88p.L252P leads to the development of diffuse large B-cell lymphoma in mice. Blood. 2016;127(22):2732-41.
135. Bonzheim I, Giese S, Deuter C, Susskind D, Zierhut M, Waizel M, et al. High frequency of MYD88 mutations in vitreoretinal B-cell lymphoma: a valuable tool to improve diagnostic yield of vitreous aspirates. Blood. 2015;126(1):76-9.
136. Kersten MJ, Kraan W, Doorduijn J, Bromberg J, Lam K, Kluin PM, et al. Diffuse large B cell lymphomas relapsing in the CNS lack oncogenic MYD88 and CD79B mutations. Blood Cancer J. 2014;4:e266.
137. Montesinos-Rongen M, Schmitz R, Brunn A, Gesk S, Richter J, Hong K, et al. Mutations of CARD11 but not TNFAIP3 may activate the NF-kappaB pathway in primary CNS lymphoma. Acta Neuropathol. 2010;120(4):529-35.
138. Schwindt H, Vater I, Kreuz M, Montesinos-Rongen M, Brunn A, Richter J, et al. Chromosomal imbalances and partial uniparental disomies in primary central nervous system lymphoma. Leukemia. 2009;23(10):1875-84.
139. Grommes C, DeAngelis LM. Primary CNS Lymphoma. J Clin Oncol. 2017;35(21):2410-8.
140. (NCBI) BdDdNCfBI. MYC MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor. 2018 [cited 2018 02/10/2018]; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4609.
141. Knoepfler PS. Myc goes global: new tricks for an old oncogene. Cancer Res. 2007;67(11):5061-3.
142. Pfreundschuh M. Growing importance of MYC/BCL2 immunohistochemistry in diffuse large B-cell lymphomas. J Clin Oncol. 2012;30(28):3433-5.
143. Brunn A, Nagel I, Montesinos-Rongen M, Klapper W, Vater I, Paulus W, et al. Frequent triple-hit expression of MYC, BCL2, and BCL6 in primary lymphoma of the central nervous system and absence of a favorable MYC(low)BCL2 (low) subgroup may underlie the inferior prognosis as

compared to systemic diffuse large B cell lymphomas. Acta Neuropathol. 2013;126(4):603-5.

144. Gill KZ, Iwamoto F, Allen A, Hoehn D, Murty VV, Alobeid B, et al. MYC protein expression in primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system. PLoS One. 2014;9(12):e114398.
145. Vater I, Montesinos-Rongen M, Schlesner M, Haake A, Purschke F, Sprute R, et al. The mutational pattern of primary lymphoma of the central nervous system determined by whole-exome sequencing. Leukemia. 2015;29(3):677-85.
146. Gonzalez-Aguilar A, Idbaih A, Boisselier B, Habbita N, Rossetto M, Laurenge A, et al. Recurrent mutations of MYD88 and TBL1XR1 in primary central nervous system lymphomas. Clin Cancer Res. 2012;18(19):5203-11.
147. Bruno A, Boisselier B, Labreche K, Marie Y, Polivka M, Jouvet A, et al. Mutational analysis of primary central nervous system lymphoma. Oncotarget. 2014;5(13):5065-75.
148. National Institute of Health. 2019 [cited 2019 06/24/2019]; Available from: https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MYC#normalfunction
149. Bhatia K, Huppi K, Spangler G, Siwarski D, Iyer R, Magrath I. Point mutations in the c-Myc transactivation domain are common in Burkitt's lymphoma and mouse plasmacytomas. Nat Genet. 1993;5(1):56-61.
150. Nguyen L, Papenhausen P, Shao H. The Role of c-MYC in B-Cell Lymphomas: Diagnostic and Molecular Aspects. Genes (Basel). 2017;8(4).
151. Fischer L, Hummel M, Korfel A, Lenze D, Joehrens K, Thiel E. Differential micro-RNA expression in primary CNS and nodal diffuse large B-cell lymphomas. Neuro Oncol. 2011;13(10):1090-8.
152. (NCBI) BdDdNCfBI. BCL2 BCL2, apoptosis regulator [ Homo sapiens (human) ]. 2018 [cited 2018 02/10/2018]; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/596.
153. Hill ME, MacLennan KA, Cunningham DC, Vaughan Hudson B, Burke M, Clarke P, et al. Prognostic significance of BCL-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. Blood. 1996;88(3):1046-51.
154. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, Krajewska M, Horsman DE, Tolcher AW, et al. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Blood. 1997;90(1):244-51.
155. Alizadeh AA, Staudt LM. Genomic-scale gene expression profiling of normal and malignant immune cells. Curr Opin Immunol. 2000;12(2):219-25.
156. Yang Y, Shaffer AL, 3rd, Emre NC, Ceribelli M, Zhang M, Wright G, et al. Exploiting synthetic lethality for the therapy of ABC diffuse large B cell lymphoma. Cancer Cell. 2012;21(6):723-37.

157. Wang JQ, Jeelall YS, Beutler B, Horikawa K, Goodnow CC. Consequences of the recurrent MYD88(L265P) somatic mutation for B cell tolerance. J Exp Med. 2014;211(3):413-26.
158. Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, Rives S, Martinez A, Bosch F, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. Blood. 2003;101(1):78-84.
159. Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, Reyes F, Gaulard P, Coiffier B, et al. Estimating the impact of rituximab on bcl-2-associated resistance to CHOP in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma. Haematologica. 2006;91(5):715-6.
160. Fu K, Weisenburger DD, Choi WW, Perry KD, Smith LM, Shi X, et al. Addition of rituximab to standard chemotherapy improves the survival of both the germinal center B-cell-like and non-germinal center B-cell-like subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. J Clin Oncol. 2008;26(28):4587-94.
161. Wilson WH, Dunleavy K, Pittaluga S, Hegde U, Grant N, Steinberg SM, et al. Phase II study of dose-adjusted EPOCH and rituximab in untreated diffuse large B-cell lymphoma with analysis of germinal center and post-germinal center biomarkers. J Clin Oncol. 2008;26(16):2717-24.
162. Amoroso A, Hafsi S, Militello L, Russo AE, Soua Z, Mazzarino MC, et al. Understanding rituximab function and resistance: implications for tailored therapy. Front Biosci (Landmark Ed). 2011;16:770-82.
163. (NCBI) BdDdNCfBI. LMO2 LIM domain only 2 [ Homo sapiens (human) ]. [02/10/2017]; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4005.
164. Natkunam Y, Zhao S, Mason DY, Chen J, Taidi B, Jones M, et al. The oncoprotein LMO2 is expressed in normal germinal-center B cells and in human B-cell lymphomas. Blood. 2007;109(4):1636-42.
165. Nam CH, Rabbitts TH. The role of LMO2 in development and in T cell leukemia after chromosomal translocation or retroviral insertion. Mol Ther. 2006;13(1):15-25.
166. Younes SF, Beck AH, Lossos IS, Levy R, Warnke RA, Natkunam Y. Immunoarchitectural patterns in follicular lymphoma: efficacy of HGAL and LMO2 in the detection of the interfollicular and diffuse components. Am J Surg Pathol. 2010;34(9):1266-76.
167. Jiang CY, Yu JJ, Ruan Y, Wang XH, Zhao W, Wang XJ, et al. LIM domain only 2 over-expression in prostate stromal cells facilitates prostate cancer progression through paracrine of Interleukin-11. Oncotarget. 2016;7(18):26247-58.
168. Colomo L, Vazquez I, Papaleo N, Espinet B, Ferrer A, Franco C, et al. LMO2-negative Expression Predicts the Presence of MYC Translocations in Aggressive B-Cell Lymphomas. Am J Surg Pathol. 2017;41(7):877-86.
169. Alizadeh AA, Gentles AJ, Alencar AJ, Liu CL, Kohrt HE, Houot R, et al. Prediction of survival in diffuse large B-cell lymphoma based on the expression of 2 genes reflecting tumor and microenvironment. Blood. 2011;118(5):1350-8.

170. Lossos C, Bayraktar S, Weinzierl E, Younes SF, Hosein PJ, Tibshirani RJ, et al. LMO2 and BCL6 are associated with improved survival in primary central nervous system lymphoma. Br J Haematol. 2014;165(5):640-8.
171. (NCBI) BdDdNCfBI. MGMT O-6-methylguanine-DNA methyltransferase [ Homo sapiens (human) ]. 2018 [cited 2018 02/10/2018]; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4255.
172. Brady CA, Jiang D, Mello SS, Johnson TM, Jarvis LA, Kozak MM, et al. Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA-damage responses and tumor suppression. Cell. 2011;145(4):571-83.
173. Isono S, Fujishima M, Azumi T, Hashimoto Y, Komoike Y, Yukawa M, et al. O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase as a prognostic and predictive marker for basal-like breast cancer treated with cyclophosphamide-based chemotherapy. Oncol Lett. 2014;7(6):1778-84.
174. Brell M, Ibanez J, Tortosa A. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase protein expression by immunohistochemistry in brain and non-brain systemic tumours: systematic review and meta-analysis of correlation with methylation-specific polymerase chain reaction. BMC Cancer. 2011;11:35.
175. Preusser M. MGMT analysis at DNA, RNA and protein levels in glioblastoma tissue. Histol Histopathol. 2009;24(4):511-8.
176. Ohno T, Hiraga J, Ohashi H, Sugisaki C, Li E, Asano H, et al. Loss of O6-methylguanine-DNA methyltransferase protein expression is a favorable prognostic marker in diffuse large B-cell lymphoma. Int J Hematol. 2006;83(4):341-7.
177. Sturm RA, Cassady JL, Das G, Romo A, Evans GA. Chromosomal structure and expression of the human OTF1 locus encoding the Oct-1 protein. Genomics. 1993;16(2):333-41.
178. (NCBI) BdDdNCfBI. POU2F1 POU class 2 homeobox 1. 2018 [cited 2018 02/10/2018]; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5451.
179. Vazquez-Arreguin K, Maddox J, Kang J, Park D, Cano RR, Factor RE, et al. BRCA1 through Its E3 Ligase Activity Regulates the Transcription Factor Oct1 and Carbohydrate Metabolism. Mol Cancer Res. 2018;16(3):439-52.
180. Shakya A, Cooksey R, Cox JE, Wang V, McClain DA, Tantin D. Oct1 loss of function induces a coordinate metabolic shift that opposes tumorigenicity. Nat Cell Biol. 2009;11(3):320-7.
181. (NCBI) BdDdNCfBI. PDCD1 programmed cell death 1. 2018 [cited 2018 02/10/2018]; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5133.
182. Smeltzer JP, Jones JM, Ziesmer SC, Grote DM, Xiu B, Ristow KM, et al. Pattern of CD14+ follicular dendritic cells and PD1+ T cells independently predicts time to transformation in follicular lymphoma. Clin Cancer Res. 2014;20(11):2862-72.
183. Waki K, Yamada T, Yoshiyama K, Terazaki Y, Sakamoto S, Matsueda S, et al. PD-1 expression on peripheral blood T-cell subsets correlates with prognosis in non-small cell lung cancer. Cancer Sci. 2014;105(10):1229-35.

184. Muenst S, Hoeller S, Willi N, Dirnhofera S, Tzankov A. Diagnostic and prognostic utility of PD-1 in B cell lymphomas. Dis Markers. 2010;29(1):47-53.
185. Pauken KE, Wherry EJ. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. Trends Immunol. 2015;36(4):265-76.
186. Taube JM, Klein A, Brahmer JR, Xu H, Pan X, Kim JH, et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. Clin Cancer Res. 2014;20(19):5064-74.
187. Bertucci F, Finetti P, Colpaert C, Mamessier E, Parizel M, Dirix L, et al. PDL1 expression in inflammatory breast cancer is frequent and predicts for the pathological response to chemotherapy. Oncotarget. 2015;6(15):13506-19.
188. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. N Engl J Med. 2012;366(26):2443-54.
189. Robert C, Ribas A, Wolchok JD, Hodi FS, Hamid O, Kefford R, et al. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. Lancet. 2014;384(9948):1109-17.
190. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. N Engl J Med. 2015;372(4):320-30.
191. (NCBI) bdddNCfBI. BCL6 B cell CLL/lymphoma 6 [ Homo sapiens (human) ]. 2018 [cited 2018 02/10/2018]; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/604.
192. Barakat M, Albitar M, Xu-Monette Z, Young KH, Abdulhaq H. Molecular profiling of primary central nervous system lymphoma as compared to activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma. J Clin Oncol. 2019;37(15 suppl):7549-.
193. Cattoretti G, Chang CC, Cechova K, Zhang J, Ye BH, Falini B, et al. BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. Blood. 1995;86(1):45-53.
194. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. Nat Rev Immunol. 2008;8(1):22-33.
195. Park HY, Go H, Song HR, Kim S, Ha GH, Jeon YK, et al. Pellino 1 promotes lymphomagenesis by deregulating BCL6 polyubiquitination. J Clin Invest. 2014;124(11):4976-88.
196. Lossos IS, Jones CD, Warnke R, Natkunam Y, Kaizer H, Zehnder JL, et al. Expression of a single gene, BCL-6, strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. Blood. 2001;98(4):945-51.
197. Winter JN, Weller EA, Horning SJ, Krajewska M, Variakojis D, Habermann TM, et al. Prognostic significance of Bcl-6 protein expression in DLBCL treated with CHOP or R-CHOP: a prospective correlative study. Blood. 2006;107(11):4207-13.

198. Bellesso M, Bizzetto R, Pereira J, Beitler B, Pracchia LF, Chamone DAS. Linfoma primário do sistema nervoso central. Rev Bras Hematol Hemoter. 2008;30(1):6.
199. Kehdy FS, Gouveia MH, Machado M, Magalhaes WC, Horimoto AR, Horta BL, et al. Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(28):8696-701.
200. Bellomo R, Warrillow SJ, Reade MC. Why we should be wary of single-center trials. Crit Care Med. 2009;37(12):3114-9.
201. Mariani AW, Pego-Fernandes PM. Observational studies: why are they so important? Sao Paulo Medical Journal. 2014;132:01-2.
202. Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, et al. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. J Clin Oncol. 1989;7(11):1630-6.
203. Abrey LE, Yahalom J, DeAngelis LM. Treatment for primary CNS lymphoma: the next step. J Clin Oncol. 2000;18(17):3144-50.
204. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 2009;55(4):611-22.
205. Mitas M, Mikhitarian K, Walters C, Baron PL, Elliott BM, Brothers TE, et al. Quantitative real-time RT-PCR detection of breast cancer micrometastasis using a multigene marker panel. Int J Cancer. 2001;93(2):162-71.
206. Hulley SB, Cummings SR, Newman TB. Delineando a pesquisa clínica. Uma abordagem epidemiológica. Artmed, editor: Artmed; 2008.
207. Fischer RA. On the interpretation of χ2 from contingency tables, and the calculation of P. Journal of the Royal Statistical Society. 1922;85(1):8.
208. Fischer RA. Statistical Methods for Research Workers.: Oliver and Boyd; 1954.
209. Kaplan EM, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. Journal of American Statistical Association. 1958;53:467-81.
210. Schoenfeld D. The asymptotic properties of nonparametric tests for comparing survival distributions. Biometrika. 1981;68(1):316-9.
211. Cox DR. Regression Models and Life-Tables. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological). 1972;34(2):187-220.
212. Ulm K. Primary endpoints in cancer trials. J Thorac Dis. 2011;3(2):82-3.
213. National Cancer Institute at the National Institutes of Health. NCI Dictionary of Cancer Terms. 2019 [cited 2019]; Available from: https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms.
214. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. Biometrics. 1988;44(3):837-45.
215. Park SH, Goo JM, Jo CH. Receiver operating characteristic (ROC) curve: practical review for radiologists. Korean J Radiol. 2004;5(1):11-8.
216. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. Cancer. 1950;3(1):32-5.

217. Chen F, Xue Y, Tan MT, Chen P. Efficient statistical tests to compare Youden index: accounting for contingency correlation. Stat Med. 2015;34(9):1560-76.
218. Cohen J. A coefficient of Agreement for Nominal Scales. Educ Psychol Meas. 1960;20(1):37-46.
219. Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Green T, Wu L, Balasubramanyam A, et al. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. Blood. 2013;121(20):4021-31; quiz 250.
220. Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, Emile JF, Lederlin P, Sebban C, et al. Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2--associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). Blood. 2003;101(11):4279-84.
221. Uccella S, Cerutti R, Placidi C, Marchet S, Carnevali I, Bernasconi B, et al. MGMT methylation in diffuse large B-cell lymphoma: validation of quantitative methylation-specific PCR and comparison with MGMT protein expression. J Clin Pathol. 2009;62(8):715-23.
222. Geier A, Macias RI, Bettinger D, Weiss J, Bantel H, Jahn D, et al. The lack of the organic cation transporter OCT1 at the plasma membrane of tumor cells precludes a positive response to sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma. Oncotarget. 2017;8(9):15846-57.
223. Cogbill CH, Swerdlow SH, Gibson SE. Utility of CD279/PD-1 immunohistochemistry in the evaluation of benign and neoplastic T-cell-rich bone marrow infiltrates. Am J Clin Pathol. 2014;142(1):88-98.
224. Mrugala MM, Rubenstein JL, Ponzoni M, Batchelor TT. Insights into the biology of primary central nervous system lymphoma. Curr Oncol Rep. 2009;11(1):73-80.
225. Rubenstein JL, Gupta NK, Mannis GN, Lamarre AK, Treseler P. How I treat CNS lymphomas. Blood. 2013;122(14):2318-30.
226. Hackshaw A. Small studies: strengths and limitations. Eur Respir J. 2008;32(5):1141-3.
227. Altman DG, Bland JM. Absence of evidence is not evidence of absence. BMJ. 1995;311(7003):485.
228. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Vecchione-Koval T, Wolinsky Y, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. Neuro Oncol. 2017;19(suppl_5):v1-v88.
229. Siegal T, Bairey O. Primary CNS Lymphoma in the Elderly: The Challenge. Acta Haematol. 2019;141(3):138-45.
230. Ferreri AJ, Blay JY, Reni M, Pasini F, Spina M, Ambrosetti A, et al. Prognostic scoring system for primary CNS lymphomas: the International Extranodal Lymphoma Study Group experience. J Clin Oncol. 2003;21(2):266-72.

231. Corry J, Smith JG, Wirth A, Quong G, Liew KH. Primary central nervous system lymphoma: age and performance status are more important than treatment modality. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1998;41(3):615-20.
232. Schultz C, Scott C, Sherman W, Donahue B, Fields J, Murray K, et al. Preirradiation chemotherapy with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and dexamethasone for primary CNS lymphomas: initial report of radiation therapy oncology group protocol 88-06. J Clin Oncol. 1996;14(2):556-64.
233. Bessell EM, Lopez-Guillermo A, Villa S, Verger E, Nomdedeu B, Petit J, et al. Importance of radiotherapy in the outcome of patients with primary CNS lymphoma: an analysis of the CHOD/BVAM regimen followed by two different radiotherapy treatments. J Clin Oncol. 2002;20(1):231-6.
234. Zhao H, Ma M, Zhang L, Zheng G, Lv H, Liu J, et al. Diagnosis of central nervous system lymphoma via cerebrospinal fluid cytology: a case report. BMC Neurol. 2019;19(1):90.
235. Chiavazza C, Pellerino A, Ferrio F, Cistaro A, Soffietti R, Ruda R. Primary CNS Lymphomas: Challenges in Diagnosis and Monitoring. Biomed Res Int. 2018;2018:3606970.
236. Ferreri AJ, Reni M, Villa E. Primary central nervous system lymphoma in immunocompetent patients. Cancer Treat Rev. 1995;21(5):415-46.
237. Xavier FD, Levy D, Pereira J. Time-to-treatment of diffuse large B-cell lymphoma in Sao Paulo. Clinics (Sao Paulo). 2014;69(5):367-71.
238. Ferreri AJ. Primary central nervous system lymphoma: three linked questions in the situation puzzle of radiotherapy. Leuk Lymphoma. 2015;56(5):1185-7.
239. Juergens A, Pels H, Rogowski S, Fliessbach K, Glasmacher A, Engert A, et al. Long-term survival with favorable cognitive outcome after chemotherapy in primary central nervous system lymphoma. Ann Neurol. 2010;67(2):182-9.
240. Song J. Age as an independent predictive factor in survival outcomes of multimodality treatments for primary central nervous system lymphoma: A review from tertiary institution. In: EHA, editor. European Hematology Association; 05/16/2019; Amsterdam2019.
241. Bellinzona M, Roser F, Ostertag H, Gaab RM, Saini M. Surgical removal of primary central nervous system lymphomas (PCNSL) presenting as space occupying lesions: a series of 33 cases. Eur J Surg Oncol. 2005;31(1):100-5.
242. Bessell EM, Graus F, Lopez-Guillermo A, Lewis SA, Villa S, Verger E, et al. Primary non-Hodgkin's lymphoma of the CNS treated with CHOD/BVAM or BVAM chemotherapy before radiotherapy: long-term survival and prognostic factors. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2004;59(2):501-8.
243. DeAngelis LM, Seiferheld W, Schold SC, Fisher B, Schultz CJ, Radiation Therapy Oncology Group S. Combination chemotherapy and radiotherapy for primary central nervous system lymphoma: Radiation Therapy Oncology Group Study 93-10. J Clin Oncol. 2002;20(24):4643-8.

244. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med. 2006;27(2-3):95-125.
245. von Smolinski D, Leverkoehne I, von Samson-Himmelstjerna G, Gruber AD. Impact of formalin-fixation and paraffin-embedding on the ratio between mRNA copy numbers of differently expressed genes. Histochem Cell Biol. 2005;124(2):177-88.
246. Abrahamsen HN, Steiniche T, Nexo E, Hamilton-Dutoit SJ, Sorensen BS. Towards quantitative mRNA analysis in paraffin-embedded tissues using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction: a methodological study on lymph nodes from melanoma patients. J Mol Diagn. 2003;5(1):34-41.
247. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol. 2002;3(7):RESEARCH0034.
248. McCall MN, McMurray HR, Land H, Almudevar A. On non-detects in qPCR data. Bioinformatics. 2014;30(16):2310-6.
249. Chang CC, Kampalath B, Schultz C, Bunyi-Teopengco E, Logan B, Eshoa C, et al. Expression of p53, c-Myc, or Bcl-6 suggests a poor prognosis in primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma among immunocompetent individuals. Arch Pathol Lab Med. 2003;127(2):208-12.
250. Reed JC. Bcl-2 family proteins: regulators of chemoresistance in cancer. Toxicol Lett. 1995;82-83:155-8.
251. Visco C, Tzankov A, Xu-Monette ZY, Miranda RN, d'Amore ESG, Montes-Moreno S, et al. The t(14;18)(q32;q21) Characterizes a Subset of Patients with Diffuse Large-B Cell Lymphoma of Germinal Center Origin with Poor Outcome: Report From the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. Blood. 2011;21.
252. Cai Q, Fang Y, Young KH. Primary Central Nervous System Lymphoma: Molecular Pathogenesis and Advances in Treatment. Transl Oncol. 2019;12(3):523-38.
253. Montesinos-Rongen M, Brunn A, Bentink S, Basso K, Lim WK, Klapper W, et al. Gene expression profiling suggests primary central nervous system lymphomas to be derived from a late germinal center B cell. Leukemia. 2008;22(2):400-5.
254. Niparuck P, Boonsakan P, Sutthippingkiat T, Pukiat S, Chantrathammachart P, Phusanti S, et al. Treatment outcome and prognostic factors in PCNSL. Diagn Pathol. 2019;14(1):56.
255. Hermine O, Haioun C, Lepage E, d'Agay MF, Briere J, Lavignac C, et al. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). Blood. 1996;87(1):265-72.
256. Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. Nat Rev Genet. 2012;13(4):227-32.

257. Liu Y, Beyer A, Aebersold R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. Cell. 2016;165(3):535-50.
258. Nagaraj N, Wisniewski JR, Geiger T, Cox J, Kircher M, Kelso J, et al. Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. Mol Syst Biol. 2011;7:548.
259. Bujak M, Ratkaj I, Markova-Car E, Jurisic D, Horvatic A, Vucinic S, et al. Inflammatory Gene Expression Upon TGF-beta1-Induced p38 Activation in Primary Dupuytren's Disease Fibroblasts. Front Mol Biosci. 2015;2:68.
260. Maddox J, Shakya A, South S, Shelton D, Andersen JN, Chidester S, et al. Transcription factor Oct1 is a somatic and cancer stem cell determinant. PLoS Genet. 2012;8(11):e1003048.
261. Nakata K, Ohuchida K, Nagai E, Hayashi A, Miyasaka Y, Kayashima T, et al. LMO2 is a novel predictive marker for a better prognosis in pancreatic cancer. Neoplasia. 2009;11(7):712-9.
262. Aly RM, Taalab MM, Abdsalam EM, Elyamany OH, Hasan OE. High expression of LMO2 predicts a favorable outcome in adult patients with BCR/ABL negative B-cell acute lymphoblastic leukemia. Oncol Lett. 2016;11(3):1917-22.
263. Bertucci F, Finetti P, Mamessier E, Pantaleo MA, Astolfi A, Ostrowski J, et al. PDL1 expression is an independent prognostic factor in localized GIST. Oncoimmunology. 2015;4(5):e1002729.
264. Menter T, Bodmer-Haecki A, Dirnhofer S, Tzankov A. Evaluation of the diagnostic and prognostic value of PDL1 expression in Hodgkin and B-cell lymphomas. Hum Pathol. 2016;54:17-24.
265. Berghoff AS, Ricken G, Widhalm G, Rajky O, Hainfellner JA, Birner P, et al. PD1 (CD279) and PD-L1 (CD274, B7H1) expression in primary central nervous system lymphomas (PCNSL). Clin Neuropathol. 2014;33(1):42-9.
266. Cho H, Kim SH, Kim SJ, Chang JH, Yang WI, Suh CO, et al. Programmed cell death 1 expression is associated with inferior survival in patients with primary central nervous system lymphoma. Oncotarget. 2017;8(50):87317-28.
267. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. Annu Rev Immunol. 2009;27:591-619.
268. Sung CO, Kim SC, Karnan S, Karube K, Shin HJ, Nam DH, et al. Genomic profiling combined with gene expression profiling in primary central nervous system lymphoma. Blood. 2011;117(4):1291-300.
269. Basso K, Dalla-Favera R. Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells. Immunol Rev. 2012;247(1):172-83.
270. Niu H. The proto-oncogene BCL-6 in normal and malignant B cell development. Hematol Oncol. 2002;20(4):155-66.

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Reis, Diego Gomes Candido
Análise do perfil de expressão dos genes MYC, BCL2, LMO2, MGMT, OCT1, PD1 e BCL6 e suas respectivas proteínas em linfoma primário de sistema nervoso central / Diego Gomes Candido Reis. -- São Paulo, 2019.
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.

Descritores: 1.Linfoma não Hodgkin 2.Neoplasias encefálicas 3.Expressão gênica 4.Biomarcadores 5.Estudos retrospectivos 6.Estudos de coortes 7.Imuno-histoquímica 8.Análise de sobrevida

USP/FM/DBD-113/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

**Diego Gomes Candido Reis**

# Análise do perfil de expressão dos genes MYC, BCL2, LMO2, MGMT, POU2F1, PDCD1 e BCL6 e suas respectivas proteínas em linfoma primário de sistema nervoso central

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

Programa de Ciências Médicas
Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia
Orientadora: Profª. Drª Juliana Pereira

**São Paulo**
**2019**

Diego Gomes Candido Reis

# Análise do perfil de expressão dos genes MYC, BCL2, LMO2, MGMT, POU2F1, PDCD1 e BCL6 e suas respectivas proteínas em linfoma primário de sistema nervoso central

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

Programa de Ciências Médicas
Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia
Orientadora: Profª. Drª Juliana Pereira

São Paulo
2019

**Dados internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**
Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

© reprodução autorizada pelo autor

Reis, Diego Gomes Candido
Análise do perfil de expressão dos genes MYC,BCL2, LMO2, MGMT, POU2F1, PDCD1 e BCL6 e suas respectivas proteínas em linfoma primário de sistema nervoso central / Diego Gomes Candido Reis. – São Paulo, 2019.
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.

Descritores: 1.Linfoma não Hodgkin 2.Neoplasias encefálicas 3.Expressão gênica 4.Biomarcadores 5.Estudos retrospectivos 6.Estudos de coortes 7.Imuno-histoquímica 8.Análise de sobrevida

USP/FM/DBD-113/19

## DEDICATÓRIA

Aos amores (vividos, passados, presentes e futuros)

Aos meus pacientes,

Às amizades,

Aos meus avós,

Aos meus pais, Sérgio Eduardo e Maura Gomes, pelo árduo trabalho de educar, ensinar, amar e compreender aquilo que fui, sou e serei.

A Sander Palte, *liefde van mijn leven*.

## AGRADECIMENTOS

Sou imensamente grato por ter tido a professora Juliana Pereira como minha orientadora! O conhecimento que eu adquiri com ela vai muito além desta tese: seu profissionalismo, competência, ética, leveza e confiança foram fundamentais para conduzirmos este projeto em harmonia, de forma agradável e com grande troca de conhecimento. Uma pessoa forte, determinada e extremamente construtiva, ciente de sua função social como professora, educadora, médica e cidadã!

Nosso país, nossas universidades precisam de jovens cientistas críticos, contestadores e motivados! Dentre tantos que conheci, a Dra Débora Levy se destaca de maneira excepcional, tornando-se um exemplo para mim, reafirmando a importância de um trabalho em equipe, alinhado e íntegro. Sorte imensa tê-la tido como coorientadora, e sorte maior ainda tê-la agora como amiga!

Dr Hebert Culler foi fundamental neste projeto. Sua precisão em técnicas moleculares, seu olhar crítico e sua perspectiva do projeto muito me ajudaram. Muito obrigado, Hebert!

Graças ao LIM-31 (Laboratório de Genética e Hematologia Molecular), coordenado pelo Prof. Sérgio Bydlowski, este projeto pôde ser concluído. Ele não apenas me proporcionou as condições técnicas para realizarmos a pesquisa, mas também me motivou pelas conversas com os colegas, pela visão da importância da universidade e suas pesquisas em prol da ciência, da busca de respostas.

Se eu já amava hematologia, oncologia e pesquisa translacional, hoje posso afirmar minha paixão pela patologia, adquirida pelo contato com a Profa Maria Cláudia Zerbini. Um dos maiores exemplos de dedicação à vida acadêmica que eu já conheci, de uma gentileza ímpar e uma educação ímpar. Seus olhos, através das análises histopatológicas, iluminaram em muito este projeto. O meu “muitíssimo obrigado”!

Um projeto de doutorado é um pouco como uma orquestra: tantos instrumentos utilizados, tanto material humano, cada qual no seu tempo, porem num ritmo comum. A Universidade de São Paulo foi minha orquestra neste período, e serviços como o Departamento de Anatomia Patologica, Laboratório de Imunohistoquímica (Ângela Batista Gomes dos Santos), Blocário do HC-FMUSP, ICESP, CAPPesq, Arquivo Médico, Departamento de Hematologia, entre tantos outros, muito me ajudaram. Mais ainda: me fizeram perceber a grandeza da instituição, o compromisso de cada serviço, departamento, recursos humanos na pesquisa, na extensão acadêmica! Ter estudado aqui foi um privilégio!

Aos meus colegas da Hematologia e ao corpo de enfermagem que, de alguma forma, contribuíram com esse projeto e cuidaram dos pacientes que estudamos. Lendo os prontuários, os relatórios, tive a certeza da qualidade do atendimento que estes pacientes receberam dos profissionais de saúde, o que apenas aumentou minha admiração.

Aos pacientes e seus familiares, sem os quais essa pesquisa não seria possível. Vocês são nossa principal motivação para qualquer pesquisa médica, para os plantões extenuantes, ambulatórios lotados e todas dificuldades que encontramos nas nossas profissões.

É preciso agradecer aos meus colegas da UFRJ, da UFPR, da UNIFESP, do INCa, e de tantos outros centros acadêmicos pelos quais passei. Ambientes repletos de mentes brilhantes, que são contagiantes. Levo todos no coração e no cérebro!

Aos colegas que conheci na Bayer- em especial à Dra Paula Tanaka, uma amiga vibrante, enérgica, focada. Além disto tudo, ela me apresentou a Dra Juliana Pereira onde a história começou... Espero tê-la honrado pela confiança em mim depositada!

Tantas pessoas, lugares, professores, escolas, músicas, livros passaram em minha vida para que eu chegasse até aqui, me ajudando a tornar aquilo que sou. De tudo fica um pouco- como diria o poeta Carlos Drummond... E, a este pouco (que é o meu tudo), eu finalizo meu agradecimento, o meu muito obrigado. De toda minh´alma!

“Amar o perdido,
deixa confundido
este coração

Nada pode o olvido
contra o sentido
apelo do Não

As coisas tangíveis
tornam-se insensíveis
à palma da mão

Mas as coisas findas,
muito mais que lindas,
estas sim ficarão”

**Carlos Drummond de Andrade**

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

**SUMÁRIO**

**LISTA DE SÍMBOLOS**

**LISTA DE SIGLAS**

**LISTA DE FIGURAS**

**LISTA DE GRÁFICOS**

**LISTA DE QUADROS**

**LISTA DE TABELAS**

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**1 INTRODUÇÃO ..... 1**

**2 REVISÃO DE LITERATURA ..... 5**
**2.1 Epidemiologia ..... 5**
**2.2 Diagnóstico ..... 6**
*2.2.1 Biópsia/Líquor ..... 6*
*2.2.2 Imagem ..... 8*
**2.3 Prognóstico ..... 11**
*2.3.1 Fatores clínicos de prognóstico ..... 11*
*2.3.2 Fatores histopatológicos de prognóstico ..... 13*
**2.4 Tratamento ..... 16**
*2.4.1 Radioterapia ..... 17*
*2.4.2 Monoterapia ou Poliquimioterapia baseado em MTX ..... 18*
*2.4.3 Imunoterapia e Imunoquimioterapia com Rituximabe ..... 19*
*2.4.4 Quimioterapia intraventricular ..... 20*
*2.4.5 Terapia de manutenção com agente quimioterápico ..... 21*
*2.4.6 Transplante de Medula Óssea Autólogo (ASCT) ..... 21*
*2.4.7 Tratamento de resgate ..... 22*
*2.4.8 Estudos de Pesquisa Clínica Fase 1/2 em pacientes com LPSNC recidivadas ..... 22*
**2.5 Fisiopatologia molecular do LPSNC ..... 27**
*2.5.1 Genes selecionados para o estudo ..... 30*
**2.6 Justificativa ..... 37**

**3 OBJETIVOS ..... 39**
**3.1 Objetivo primário ..... 39**
**3.2 Objetivos secundários ..... 39**

**4 CASUÍSTICAS E METODOS ..... 40**
**4.1 Pacientes selecionados ..... 41**
*4.1.1 Critérios de inclusão ..... 41*
*4.1.2 Critérios de exclusão ..... 42*
**4.2 Diagnóstico anatomopatológico ..... 43**
**4.3 Estadiamento ..... 44**

**4.4 Tratamento** ..... **44**
**4.5 Avaliação de resposta** ..... **45**
**4.6 Seguimento dos pacientes** ..... **45**
**4.7 Reações de IHQ** ..... **46**
*4.7.1 Obtenção das amostras* ..... *46*
*4.7.2 Técnica da reação de IHQ* ..... *47*
**4.8 Método molecular** ..... **49**
*4.8.1 Obtenção das amostras* ..... *49*
*4.8.2 Extração de RNA de amostras fixadas em formol e incluídas em parafina* ..... *49*
*4.8.3 Preparação do cDNA* ..... *50*
*4.8.4 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real* ..... *51*
*4.8.5 Eficiência gênica avaliada* ..... *52*
**4.9 Análise estatística** ..... **52**

**5 RESULTADOS** ..... **56**
**5.1 Casuística** ..... **56**
**5.2 Características clínico-laboratoriais ao diagnóstico** ..... **57**
**5.3 Tratamentos oncológicos e resposta clínica** ..... **59**
*5.3.1 Primeira Linha de Tratamento Oncológico com Intuito Curativo* ..... *61*
*5.3.2 Segunda Linha de Tratamento Oncológico com Intuito Curativo* ..... *62*
**5.4 Expressão Proteica** ..... **63**
**5.5 Expressão Gênica** ..... **65**
**5.6 Construção de Curvas de ROC *(receiver operator characteristic curve*, em inglês)** ..... **67**
*5.6.1 Curvas de ROC para expressão proteica* ..... *67*
*5.6.2 Curvas de ROC para expressão gênica normatizada* ..... *68*
**5.7 Curvas de Sobrevida** ..... **69**
*5.7.1 Sobrevida Global* ..... *69*
*5.7.2 Sobrevida Livre de Doença (1ª linha de tratamento)* ..... *71*
*5.7.3 Sobrevida Livre de Progressão (1ª linha de tratamento)* ..... *72*
**5.8 Fatores de Prognóstico para SG, SG 2 anos, SLD e SLP** ..... **73**
*5.8.1 Análise Univariada para SG e SG em 24 meses* ..... *73*
*5.8.2 Análise Univariada para SLD* ..... *76*
*5.8.3 Análise Univariada para SLP* ..... *77*
*5.8.4 Testes de Log-Rank: gráficos por variáveis analisadas* ..... *79*
**5.9 Fatores de Prognóstico para Mortalidade até a data de censura e Mortalidade em 2 anos após o diagnóstico** ..... **86**
*5.9.1 Análise Univariada* ..... *86*
**5.10 Fatores de Prognóstico para Risco de Recaída e Refratariedade na primeira linha de tratamento** ..... **88**
*5.10.1 Análise Univariada* ..... *88*
**5.11 Correlação entre expressão gênica e expressão proteica** ..... **90**

**6 DISCUSSÃO** ..... **92**

**7 CONCLUSÕES** ..... **105**

**8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS ..... 106**

**9 ANEXOS ..... 107**
**ANEXO A -** Características clínico-laboratoriais por paciente ..... **108**
**ANEXO B -** Informações sobre a primeira linha de tratamento oncológico ..... **114**
**ANEXO C -** Valores da expressão normatizada dos genes MYC, BCL2, POU2F1, MGMT, LMO2 e PDCD1 por paciente ..... **115**
**ANEXO D -** Comparação entre amostra total e a subamostra..... **117**
**ANEXO E -** Curvas de ROC para expressão da proteína MYC ..... **123**
**ANEXO F -** Curva de ROC para expressão da proteína BCL2 ..... **127**
**ANEXO G -** Curva de ROC para expressão da proteína LMO2..... **131**
**ANEXO H -** Curvas de ROC para a expressão normatizada do gene MYC ..... **132**
**ANEXO I -** Curvas de ROC para a expressão normatizada do gene MGMT ..... **134**
**ANEXO J -** Curvas de ROC para a expressão normatizada do gene PDCD1 ..... **136**
**ANEXO K -** Curvas de ROC para a expressão normatizada do gene BCL2 ..... **137**
**ANEXO L -** Curvas de ROC para a expressão normatizada do gene LMO2..... **140**
**ANEXO M -** Curvas de ROC para a expressão normatizada do gene POU2F1 ..... **142**
**ANEXO N -** Curvas de ROC para a expressão normatizada do gene BCL6 ..... **144**
**ANEXO O -** Construção das curvas de SG, SLP e SLD (método de Kaplan-Meier)..... **146**
**ANEXO P -** Expressão dos genes de interesse em relação à sua respectiva expressão proteica..... **147**

**10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 149**

**LISTA DE SÍMBOLOS**

αβ .....Alfa/beta
γδ .....Gama/delta
cm .....Centímetro
dL .....Decilitro
g .....Grama
ºC .....Graus Celsius
xg .....Gravidade
Gy.....Gray
K.....Kappa
λ .....Lambda
L .....Litro
≥ .....Maior ou igual a
> .....Maior que
+/- .....Mais ou menos
+ .....Mais ou positivo
≤ .....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
™.....*Trademark* ou marca registrada
log .....Unidade de escala logarítmica
U.....Unidades
x .....Vezes

## LISTA DE SIGLAS

| SIGLA | ABREVIACAO |
|---|---|
| 1ºq | Primeiro quartil |
| 3ºq | Terceiro quartil |
| A20 | *Tumor Necrosis Factor, Alpha-Induced Protein 3 (em inglês)* |
| ABC | *Activated B-Cell Like (em inglês)* |
| Ac | Anticorpos |
| AKT | Proteína Quinase B |
| ALK | Quinase do Linfoma Anaplásico |
| ARP | *Actin-related protein (em inglês)* |
| ASCT | Transplate Autólogo de Células Tronco |
| AUC | Área sob a Curva |
| BCAP | *B cell adaptor for PI3k (em inglês)* |
| BCL6 – | *B-cell CLL/Lymphoma 6 (em inglês)* |
| BCL2 | *B-cell Lymphoma 2 (em inglês)* |
| BCNU | Carmustina |
| BCR | Receptor de Células B |
| BHE | Barreira Hematoencefálica |
| BIM | *BCL-2 interacting mediator of cell death (em inglês)* |
| BTK | *Bruton's Tyrosine Kinase (em inglês)* |
| CAAE | Certificado de Apresentação para Apreciação Ética |
| CAPPesq | Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa |
| CAR-T | *Chimeric Artificial T-cell Receptor (em inglês)* |
| CARD11 | *Caspase Recruitment Domain Family Member 11 (em inglês)* |
| CD | *Cluster of differentiation (em inglês)* |
| CD10 | *Common acute lymphocytic leukemia agent (em inglês)* |
| CD20 | Antígeno de Linfócito B CD20 |
| CDC2 ou CDK1 | Quinase dependente de ciclina 1 |
| cDNA | Ácido desoxirribonucleico complementar |
| CG | Centro germinativo |
| CN | *Calcineurin (em inglês)* |
| CNS | *Central Nervous System (em inglês)* |
| COO | Célula de Origem |
| Ct | *Cycle threshold* ou ciclo limiar |

| | |
|---|---|
| CXCL13 | *B lymphocyte chemoattractant (em inglês)* |
| DAG | diacilglicerol |
| D11 | Décimo Primeiro Dia |
| D7 | Sétimo Dia |
| DE | Doença Estável |
| Del | Deleção |
| *DFS* | *Disease-free survival (em inglês)* |
| DHL | Desidrogenase Lática |
| dNTP | Desoxirribonucleotídeos Fosfatados |
| Dp | Desvio Padrão |
| EBV | *Epstein Barr Virus* (em inglês) |
| ECOG | *Eastern Cooperative Oncology Group (status performance) (em inglês)* |
| EV | Via Endovenosa |
| FDG | Fluorodeoxiglicose |
| FFPE | Fixado em Formalina e Incluído em Parafina |
| FLAIR | *Fluid Attenuated Inversion Recovery (em inglês)* |
| G | Gravidade |
| GADPH | *Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (em inglês)* |
| GCB | célula de origem centro germinativo |
| | Receptor 2 do fator de Crescimento Derivado de Proteínas |
| GSK | *Glycogen synthase kinase (em inglês)* |
| GUSB | Glucoronidase Beta |
| Gy | Gray |
| H&E | Hematoxilina & Eosina |
| HC-FMUSP | Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo |
| HD | Alta dose |
| HD-MTX | Metotrexate em Altas Doses |
| HGAL | *Germinal Center Specific Gene (em inglês)* |
| HIC | Hipertensão Intracraniana |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Adquirida Humana |
| HR | *Hazard Ratio (em inglês)* |
| IC | Intervalo de Confiança |
| ICESP | Instituto do Câncer do Estado de São Paulo |
| Ig | Imunoglobulina |
| IgG4 | Imunoglobulina G |
| IGH | Cadeia Pesada da Imunoglobulina |
| IHQ | Imuno-histoquímica |
| IKB | *Inhibitor of kB (em inglês)* |

| | |
|---|---|
| IKK | *Inhibitor of NF-kB kinase (em inglês)* |
| IL | Interleucina |
| IPI | Índice Prognóstico Internacional |
| IP3 | Inositol trifosfato |
| IP3R | Receptor de IP3 |
| IRAK | Receptor Associado à Kinase IL1 |
| ITAM | Imunorreceptor do Motivo Ativador Baseado em Tirosina |
| IV | Intraventricular |
| JAK/STAT | *Tirosina Kinase Janu/signal Transducer and Activator of Transcription (em inglês)* |
| Ki67 | Proteína Ki67 |
| KPS | *Karnofsky Performance Status (em inglês)* |
| LCR | Líquor Cefalorraquidiano |
| LDGCB | Linfoma Difuso de Grandes Células B |
| LF | Linfoma Folicular |
| LIM | Laboratório de Investigação Médica |
| LLA | Leucemia Linfocítica Aguda |
| LMO2 | LIM Domínio Único 2 |
| LNH | Linfoma não Hodgkin |
| LPSNC | Linfoma Primário de Sistema Nervoso Central |
| MALT1 | *Mucosa-associated lymphoid tissue (em inglês)* |
| Max | Máximo |
| MBVP | Methotrexate, VP16, BCNU, Prednisone |
| MEK1/2 | Proteína Quinase Ativada por Mitogeno/Quinase Reguladora do Sinal Extracelular |
| MGMT | *O-6-methilguanine-DNA-methyltransferase (em inglês)* |
| Min | Mínimo |
| miR | microRNA |
| MRI | *Magnetic Resonance Imaging (em inglês)* |
| mTOR | *Mammalian Target of Rapamycin (em inglês)* |
| MTX | Metotrexate |
| MUM1 | *Multiple Myeloma oncogene 1 /* Oncogene Mieloma Múltiplo 1*(em inglês)* |
| MYC | Fator de Transcrição bHNH |
| MYD88 | *Myeloid Differentiation Primary Response 88 (em inglês)* |
| N | Número |
| NA | Não Avaliável |
| NCG | Não Centro Germinativo |
| NFkB | Fator Nuclear kappa B |
| NK | *Natural Killer (em inglês)* |
| NPD | Ausência de Progressão de Doença documentada |

| | |
|---|---|
| núm | Número |
| POU2F1 | *POU Class 2 Homeobox 1 (em inglês)* |
| OMS | OMS – Organização Mundial de Saúde |
| OR | *Odd Ratio (em inglês)* |
| OS | *Overall survival (em inglês)* |
| p21 | *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1 (em inglês)* |
| p53 | Proteína tumoral p53 |
| Pac | Paciente |
| PCR | Reação em Cadeia de Polimerase |
| PD | Progressão de Doença |
| PDK1 | *3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1* |
| PD-L1 | *Programmed Cell Death Ligand 1 (em inglês)* |
| PD-L2 | *Programmed Cell Death Ligand 2 (em inglês)* |
| PDCD1 | *Programmed Cell Death 1 (em inglês)* |
| PEG | Perfil de Expressão Gênica |
| PET | Tomografia por Emissão de Pósitrons |
| PET-TC | Tomografia Computadorizada com Emissão de Pósitrons |
| PFS | *Progression-free survival (em inglês)* |
| pH | Potencial de Ânion Hidrogênio |
| PI3k | *Phosphatidylionusitol-4,5-Biphosphate 3-Kinase (em inglês)* |
| PIC | Pressão Intracranina |
| PIM | Proto-Oncogene Serina/Treonina Proteína Kinase |
| PKC | Proteína Kinase C |
| POZ | *Poxvirus and Zinc Finger Domain (em inglês)* |
| PRDM1 | *PR Domain-Containing Protein 11 (em inglês)* |
| PS | *Performance Status (em inglês)* |
| PTPRK | *Receptor-type Tyrosine-Protein Phosphatase kappa (em inglês)* |
| R/R | Recaída/Refratário |
| RASGRP3 | *RAS guanyl-relaseing protein 3 (em inglês)* |
| RC | Resposta Completa ou Remissão Completa |
| RGS | *Regulator of G-Protein Signaling (em inglês)* |
| RT | Radioterapia |
| RG | Resposta Global |
| RL | Regressão Logística |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| RNA | Ácido Ribonucleico |
| ROC | Característica de Operação do Receptor |
| RP | Resposta Parcial |
| RPLPO | *Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0 (em inglês)* |

| | |
|---|---|
| RT-qPCR | Reação em Cadeia da Polimerase da Transcrição Reversa em Tempo Real quantitativo |
| RV- | Razão de verossimilhança negativa |
| RV+ | Razão de verossimilhança positiva |
| SD | Doença Estável |
| SG | Sobrevida Global |
| SLD | Sobrevida Livre de Doença |
| SLP | Sobrevida Livre de Progressão |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| STAT3 | Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3 |
| SYK | *Spleen tyrosine kinase (em inglês)* |
| TC | Tomografia Computadorizada |
| TEDDi-R | Temozolamida, Etoposídeo, Doxorubicina Lipossomal, Dexametasona, Ibrutinibe, Rituximabe |
| ThBuCTX | Thiotepa, Busulfan, e Ciclofosfamida -3 and -2 |
| TIL | *Tumour Infiltrating Lymphocyte (em inglês)* |
| TMO | Transplante de Medula Óssea |
| TNF | Fator de Necrose Tumoral |
| TR | Taxa de Resposta |
| TTO1 | Primeira Linha de Tratamento |
| TTO2 | Segunda Linha de Tratamento |
| VO | Via Oral |
| WBRT | Radioterapia de Todo o Crânio |
| XBP1 | *X-box binding protein 1( em inglês)* |
| $^{18}$F-FDG | $^{18}$F-fluorodeoxyglucose |

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1 -** Tipo de Célula de Origem conforme Critérios de Hans para IHQ. ..... 14
**Figura 2 -** Sinalização celular via BTK ..... 24
**Figura 3 -** Via do NFkB- ..... 28
**Figura 4 -** Fluxograma da exclusão ..... 56
**Figura 5 -** Número de linhas de tratamento oncológico ..... 60

## LISTA DE GRÁFICO

**Gráfico 1 -** Taxas de Resposta à Primeira Linha de Tratamento Oncológico ..... 62
**Gráfico 2 -** Curva de Sobrevida Global nos pacientes com LPSNC..... 70
**Gráfico 3 -** Curva de Sobrevida livre de doença nos pacientes com LPSNC ..... 71
**Gráfico 4 -** Curva de Sobrevida livre de progressão nos pacientes com LPSNC ..... 72
**Gráfico 5 -** Teste de Log-rank – Variável: Idade (> 60 anos vs ≤ 60 anos) ..... 79
**Gráfico 6 -** Teste de Log-rank – Variável: IPI modificado (2+3+4+5 vs 0+1) ..... 80
**Gráfico 7 -** Teste de Log-rank – Variável: Performance Status (3+4 vs 0+1+2) ..... 81
**Gráfico 8 -** Teste de Log-rank – Variável: Radioterapia (Não realizada vs Realizada) ..... 82
**Gráfico 9 -** Teste de Log-rank – Variável: Anti-BCL2 (51-100% vs 0-50%)..... 83
**Gráfico 10 -** Teste de Log-rank – Variável: anti-LMO2 (0-25% vs ≥26%)..... 83
**Gráfico 11 -** Teste de Log-rank – Variável: Gene *MYC* (≥0,201041 vs <0,201041) ..... 84
**Gráfico 12 -** Teste de Log-rank – Variável: Gene *LMO2* (<0,689232 vs ≥0,689232) ..... 85
**Gráfico 13 -** Teste de Log-rank – Variável: Gene *MGMT* (≥0,335666 vs <0,335666) ..... 85

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1 -** Avaliação de resposta clínica ..... 10
**Quadro 2 -** Estudos de fase 1 e fase 2 em andamento ..... 26
**Quadro 3 -** Padronização dos marcadores de IHQ utilizados ..... 48
**Quadro 4 -** Definições das Curvas de Sobrevida, Refratariedade e Recidiva ..... 54

## LISTA DE TABELAS


**Tabela 1 -** Sensibilidade e especificidade de biomarcadores CXCl13 e IL-10 (LCR) e aplicação diagnóstica de LPSNC ..... 8

**Tabela 2 -** Sobrevida Global (SG 2 anos) de acordo com o escore de prognóstico IPI modificado para LPSNC ..... 12

**Tabela 3 -** Orçamento detalhado..... 40

**Tabela 4 -** Eficiências gênicas avaliadas..... 52

**Tabela 5 -** Classificação Subjetiva por Kappa..... 55

**Tabela 6 -** Tempos de seguimento..... 57

**Tabela 7 -** Características clínico-laboratoriais dos pacientes selecionados ..... 58

**Tabela 8 -** Taxas de resposta global, parcial, completa e refratariedade à primeira linha de tratamento oncológico ..... 61

**Tabela 9 -** Taxas de resposta global, parcial, completa e refratariedade à segunda linha de tratamento oncológico..... 62

**Tabela 10 -** Descrição das revisões das reações de imuno-histoquímica disponíveis ..... 63

**Tabela 11 -** Resultados das reações de imuno-histoquímica das proteínas de interesse..... 64

**Tabela 12 -** Amplificação normatizada dos genes de interesse ..... 65

**Tabela 13 -** Revisão bibliográfica dos pontos de corte da reação de imuno-histoquímica das proteínas de interesse e pontos de corte selecionados neste estudo..... 68

**Tabela 14 -** Pontos de corte da expressão normatizada dos genes de interesse..... 69

**Tabela 15 -** Análise univariada de Cox para SG ..... 74

**Tabela 16 -** Análise univariada de Cox para SG em 2 anos..... 75

**Tabela 17 -** Análise univariada de Cox para SLD..... 76

**Tabela 18 -** Análise univariada de Cox para SLP..... 78

**Tabela 19 -** Análise univariada para Mortalidade Global e Mortalidade em 2 Anos ..... 87

**Tabela 20 -** Análise univariada para Refratariedade e Recaída..... 89

**Tabela 21 -** Correlação entre IHQ proteína MYC e expressão gênica *MYC* ..... 90

**Tabela 22 -** Correlação entre IHQ proteína BCL2 e expressão gênica *BCL2* ..... 91

**Tabela 23 -** Correlação entre IHQ proteína LMO2 e expressão gênica *LMO2* ..... 91

# RESUMO

Reis DGC. *Análise do perfil da expressão dos genes MYC, BCL2, LMO2, MGMT, POU2F1, PDCD1 e BCL6 e suas respectivas proteínas em linfoma primário de sistema nervoso central* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

**Introdução:** Linfoma primário de sistema nervoso central (LPSNC) é um linfoma não-Hodgkin (LNH) extranodal com origem no SNC e a ele restrito, incidência de 0,7/100.000 pessoas-ano e mediana de idade de 65 anos. Apresenta comportamento biológico agressivo, alta morbimortalidade, sobrevida global em 5 anos de 30% e pior prognóstico em relação ao linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) sistêmico. O tratamento consiste em quimioterapia de indução com altas doses de metotrexate, seguido de consolidação, porém com alta taxa de recorrência (50%) e refratariedade (30%). Estudos genéticos têm permitido melhor compreensão de sua patogênese, como a hiperativação da via do NFkB e da via da sinalização do BCR; o papel do microambiente tumoral, entre outros. Estudos preliminares com LPSNC e LDGCB indicam valor prognóstico favorável da hiperexpressão dos genes BCL6 e LMO2 e desfavoráveis nos casos de suprarregulação dos genes *BCL2, MYC, MGMT, POU2F1* e *PDCD1*. **Objetivo:** Avaliar o impacto da expressão dos genes *MYC, BCL2, LMO2, MGMT, POU2F1, PDCD1* e *BCL6* e suas respectivas proteínas em pacientes com LPSNC e suas correlações com os desfechos clínicos de sobrevida global (SG) e sobrevida livre de progressão (SLP). **Métodos:** Estudo de coorte retrospectiva, unicêntrico, não intervencionista. Pacientes imunocompetentes com LPSNC histopatologia LDGCB CD20+ foram incluídos, dados clínicos coletados e material histopatológico obtido. A expressão gênica foi analisada por RT-qPCR de amostras fixadas e emblocadas em parafina; seus valores foram normatizados pelo controle endógeno *GUSB* e transformados em variáveis categóricas para posterior correlação com variáveis clínicas e de desfecho. Devido ao pequeno tamanho amostral, apenas análises univariadas foram realizadas. Análise da expressão proteica dos genes selecionados também foi realizada. **Resultados:** Trinta e cinco pacientes foram incluídos; a expressão gênica foi avaliável em 21 pacientes (60%). A mediana de tempo de seguimento foi de 41 meses. As medianas de SG, SLD e SLP foram de 42,6 meses, 59,2 meses e 41 meses, respectivamente. Mediana de expressão dos genes *MYC, BCL2, LMO2, MGMT, POU2F1, PDCD1* e *BCL6* foram respectivamente 0,201; 0,564; 1,636; 0,000; 1,448; 0,000 e 2,716. Idade >60 anos, índice prognóstico International (IPI) modificado ≥2, performance status (PS) ≥3, expressão de *MYC* ≥0,201041, anti-BCL2 ≥51%, ausência de tratamento radioterápico, refratariedade ao tratamento e progressão de doença (PD) após a primeira linha de tratamento foram associados à pior SG (p ≤0,1). Idade >60 anos, IPI modificado ≥2, PS ≥3 e ausência de tratamento radioterápico estiveram associados à pior SLD (p ≤0,1). Idade >60 anos, IPI modificado ≥2, P.S. ≥3, ausência de tratamento com radioterapia, expressão de *MYC* ≥0,201041, anti-

BCL2 ≥51%, expressão gênica de *LMO2* <0,689232, expressão gênica de *MGMT* ≥0,335666, refratariedade à primeira linha de tratamento e PD após a primeira linha de tratamento estiveram associados à pior SLP (p ≤0,1). Expressão gênica de *MYC* ≥0,201041, expressão gênica de *PDCD1* ≥2,00938 estiveram associados a maior risco de recaída após a primeira linha de tratamento (p ≤0,1). Houve correlação moderada entre a expressão gênica do *MYC* (<0,201041 x ≥0,201041) e sua respectiva proteína (≤50% x ≥51%), (Kappa=0,596 e valor p=0,022) e entre a expressão gênica do *BCL2* (<0,3516 x ≥0,3516) e sua respectiva proteína (≤50% x ≥51%), (Kappa=0,426 e valor p=0,042). **Conclusão:** Em análise univariada, expressão de *MYC* ≥0,201041, anti-BCL2 ≥51%, expressão gênica de *LMO2* <0,689232, expressão gênica de *MGMT* ≥0,335666 e expressão gênica de *PDCD1* ≥2,00938 estiveram associados a prognósticos desfavoráveis.

**Descritores:** Linfoma não Hodgkin; Neoplasias Encefálicas; Expressão Gênica; Biomarcadores; Estudos Retrospectivos; Estudos de Coortes; Imuno-Histoquímica; Análise de Sobrevida.

**ABSTRACT**

Reis DGC. *Gene expression and protein profiles of MYC, BCL2, LMO2, MGMT, POU2F1, PDCD1, BCL6 in primary central nervous system lymphoma* [tese]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

**Introduction:** Primary central nervous system lymphoma (PCNSL) is a rare extranodal NHL restricted to the CNS, with annual incidence of 0.7 per 100,000 people and mean age at diagnosis of 65 years old. It has an aggressive biological behavior, with poor prognosis (overall survival at 5 years of 30%). Treatment consists of induction immunochemotherapy with high-dose methotrexate followed by consolidation regimen, with a high rate of relapsed and refractory disease (50% and 30%, respectively). Tumorigenesis has been associated with hyperactivation of NFkB pathway and BCR downstream pathway; tumoral microenvironment, among others. Recent studies suggest that hyperexpression of the genes *BCL6* and *LMO2* may be associated with better prognosis and hyperexpression of the genes *BCL2, MYC, MGMT, POU2F1* and *PDCD1* may be associated with worse prognosis in patients with PCNSL. **Objective:** To measure the normalized gene expression of *MYC, BCL2, LMO2, MGMT, POU2F1, PDCD1* and *BCL6* and its respective proteins in patients with PCNSL and its correlation with clinical outcomes of overall survival (OS) and progression-free survival (PFS). **Methods:** Retrospective cohort study. Immunocompetent patients from a Brazilian single center with PCNSL and confirmed histopathology DLBCL CD20+ were included, their clinical data and archival histopathological material were retrieved. Gene expression (RT-qPCR) was performed and its values were normalized to internal control gene *GUSB*, then categorized and correlated with clinical outcomes. Only univariate analysis was performed due to small sample size. **Results:** Thirty-five patients were included, gene expression was evaluable in 21 patients (60%). Median duration of follow-up was 41 months. Median OS, DFS, PFS were, respectively, 42.6 months, 59.2 months and 41 months. Median expression of genes *MYC, BCL2, LMO2, MGMT, POU2F1, PDCD1* and *BCL6* were, respectively, 0.201; 0.564; 1.636; 0.000; 1.448; 0.000 and 2.716. Age at diagnosis >60 years, modified international prognosis index (IPI) ≥2, *performance status* (PS) ≥3, *MYC* expression ≥0,201041, anti-BCL2 ≥51%, absence of radiotherapical treatment, refractoriness to treatment and disease progression after 1st line of treatment were associated with worse OS (p ≤0,1). Age at diagnosis >60 years, modified IPI ≥2, PS ≥3 and absence of radiotherapical treatment were associated with worse DFS (p ≤0,1). Age >60 years, modified IPI ≥2, P.S. ≥3, absence of radiotherapical treatment, *MYC* gene expression ≥0,201041, anti-BCL2 ≥51%, *LMO2* gene expression <0,689232, *MGMT* gene expression ≥0,335666, refractoriness to treatment and progressive disease were associated with a worse PFS (p ≤0,1). *MYC* gene expression ≥0,201041, *PDCD1* gene expression ≥2,00938 were associated with risk of disease relapse (p ≤0,1). A moderate correlation was found between *MYC* gene expression (<0,201041 x ≥0,201041) and its protein (≤50% x ≥51%), (Kappa=0,596, p=0,022); and also

between *BCL2* gene expression (<0,3516 x ≥0,3516) and its protein (≤50% x ≥51%), (Kappa=0,426, p=0,042). **Conclusion:** In a univariate analysis, *MYC* gene expression ≥0,201041, anti-BCL2 ≥51%, *LMO2* gene expression <0,689232*, MGMT* gene expression ≥0,335666 and *PDCD1* gene expression ≥2,00938 were prognostic markers associated with unfavorable clinical outcomes.

**Descriptors:** Lymphoma, Non-Hodgkin; Brain Neoplasms; Gene Expression; Biomarkers; Retrospective Studies; Cohort Studies; Immunohistochemistry; Survival Analysis.

# 1 INTRODUÇÃO

Os Linfomas não-Hodgkin (LNH) compreendem um grupo heterogêneo de neoplasias de origem linfoide cuja etiologia é multifatorial [1]. Correspondem a 4,3% de todos os cânceres nos EUA, com aumento de incidência entre 1975 e 2015 (de 12 para 19,91/100.000 pessoas/ano) e Sobrevida Global (SG) estimada em 5 anos de 74,1% [2,3]. Os LNH podem ser de origem linfoide B, T e *natural killer* (NK) [4-6]. Para o Brasil, estimam-se 5.370 casos novos de LNH em homens e 4.810 em mulheres para cada ano do biênio 2018-2019, com risco estimado de óbito de 2,8 a cada 100 mil habitantes [7].

Linfoma não-Hodgkin difuso de grandes células B (LDGCB) sistêmico é o subtipo de LNH mais frequente, o qual representa 40% de todos os LNH de origem linfoide B e apresenta comportamento clínico agressivo bem como incidência de mais de 25.000 casos/ano nos EUA. É uma doença heterogênea dos pontos de vista genético, morfológico e imunofenotípico. Pode ser classificado de acordo com a célula de origem e as características moleculares determinadas por técnicas de Perfil de Expressão Gênica (PEG) em Células B do Centro Germinativo (GCB) ou células B ativadas (ABC). Esta classificação reflete o estágio de desenvolvimento da Célula B originalmente comprometida[8,9]. A célula de origem também pode ser classificada de acordo com suas características de expressão proteica por IHQ em GCB ou de não-GCB, em concordância com o GEP em 86% [10]. Pacientes com LDGCB GCB e ABC apresentam prognósticos distintos, com SG em 5 anos de 76% e 34% respectivamente. No entanto, 50% dos pacientes não conseguem atingir remissão duradoura [9,11-14].

Linfoma primário de SNC é um LNH extranodal com origem no SNC e restrito a este órgão. O subtipo LDGCB é o mais frequente, entre 75% a 90% dos casos [5,15]. Outros subtipos incluem o linfoma de célula T, linfoma de Burkitt, linfoma linfoplasmocítico e linfoma da zona marginal. Neste texto, ao descrevermos LPSNC, consideraremos apenas os linfomas de histopatologia LDGCB CD20+ de indivíduos imunocompetentes. Trata-se de doença rara,

agressiva e de mau prognóstico [16]. Diferente do LDGCB sistêmico, o LPSNC tem origem em uma célula B em fase terminal de diferenciação, com características de ambas GCB e pós-CG [6].

LPSNC corresponde a 2% dos tumores primários do SNC, com mediana de idade de 65 anos ao diagnóstico. Anatomicamente se encontra limitado ao encéfalo, olhos, medula espinhal e leptomeninges. Possui comportamento biológico mais agressivo e menor SG quando comparado ao LDGCB sistêmico[17]. Sua incidência é de 0,7 caso por 100.000 pessoas/ano nos EUA [18], porém nas últimas décadas tem aumentado a uma taxa de 1,6% ao ano [19].

Tratamento com intuito curativo ou paliativo é indicado de acordo com as condições clínicas do paciente. Podem ser usados agentes isolados ou combinados, associados ou não à radioterapia, assim como radioterapia isolada e transplante de células tronco hematopoiéticas autólogo (ASCT). Devido à alta morbidade e pouco benefício clínico, procedimentos cirúrgicos estão limitados à biópsia diagnóstica, geralmente estereotáxica. O tratamento com quimioterapia é dificultado pela presença da barreira hematoencefálica, o que limita a penetração dos fármacos. O fato de a maioria dos pacientes ser idosa, com maior prevalência de comorbidades, reduz a tolerância ao tratamento.

Tratamento de indução seguido de consolidação apresenta melhores taxas de resposta global (TRG). A maior parte dos esquemas terapêuticos para o LPSNC tem como base altas doses de metotrexato (HD-MTX), variando de 1g/m2 a 8 g/$m^2$ . O MTX pode ser associado ou não a outros fármacos, como agentes alquilantes ou à radioterapia de crânio total. A resposta global (RG) ao tratamento inicial é usualmente alta, porém as taxas de recidiva após 2 anos são muito altas. Cerca de 15% das recidivas ocorrem no mesmo local anatômico da lesão inicial primária e 85% ocorrem distantes do sítio primário, mas dentro do SNC [20-22].

Com melhores técnicas diagnósticas e novas opções terapêuticas, houve aumento da SG em 5 anos de 19,1% (1992-1994) para 30,1% (2004-2006) nas últimas décadas [19]. Entretanto, as taxas de recidiva precoce ainda são elevadas (20% a 30%) [23].

Estudos genéticos têm evidenciado o papel da hiperativação da via do

NFkB na tumorigênese em decorrência de mutações de genes da via de sinalização do receptor de células B (BCR). O microambiente por ação imunossupressora local pode interferir na progressão e no crescimento tumoral[24].

Há carência de dados clínicos e moleculares na literatura médica referente a esta doença devido à sua raridade e à dificuldade de obtenção de material representativo. Estudos genéticos e moleculares podem auxiliar no entendimento da tumorigênese, por meio da identificação de fatores de prognóstico, preditores de resposta, além de novos alvos terapêuticos.

Estudos preliminares com LPSNC e LDGCB descreveram prognóstico favorável da hiperexpressão dos genes *BCL6* e *LMO2*, e desfavoráveis relacionados à suprarregulação dos genes *BCL2, MYC, MGMT, POU2F1* e *PDCD1*.

O gene *BCL2* é um proto-oncogene com papel na regulação da apoptose, e sua hiperexpressão está associada à tumorigênese de linfomas[25,26].

O gene *MYC* é um proto-oncogene associado à expressão de vários outros genes envolvidos no controle do crescimento e da proliferação celular. Está associado à tumorigênese de certos tumores, incluindo o LDGCB. Sua assinatura genética está associada a genes envolvidos no metabolismo e resistência aos agentes antifolatos, incluindo o metotrexate [27].

O gene *LMO2* atua na regulação de expressão de outros genes, pode estar hiperregulado em LNH derivados do Centro Germinativo e é considerado um indicador prognóstico favorável de LDGCB [28].

O gene *MGMT* codifica uma enzima reparadora de DNA silenciada por meio da metilação da sua região promotora. Sua hiperexpressão de MGMT parece estar associada a um pior prognóstico, e a metilação de sua região promotora é um biomarcador de bom prognóstico em pacientes portadores de glioma tratados com agentes alquilantes e um fator preditor de resposta ao tratamento com temozolamida, a qual vem sendo estudada como opção terapêutica no LPSNC [29].

O gene POU2F1 (OCT1) pode estar hiperexpresso em linfoma. Sua presença aumenta a suscetibilidade tumoral a irinotecano, paclitaxel, assim

como o transporte intracelular de antraciclícos. Desta forma, sugere-se que alterações de *POU2F1* possam causar resistência das células tumorais aos quimioterápicos [30,31]. No entanto, a hipexpressão de POU2F1 está elevada em carcinomas epiteliais de estômago, cólon, pulmão, mas, nestes caso, está associado a um pior prognóstico [32].

O gene *PDCD1 (PD1)* pode estar hiperexpresso em 65% dos LPSNC, juntamente com o *PD-L1* e *PD-L2* e possui papel na evasão imune tumoral. Estudos recentes têm demonstrado atividade do bloqueio de PD-1 com nivolumbe em pacientes com LPSNC refratário ou com recaída [33,34].

O gene *BCL6* é considerado um gene supressor tumoral, que atua como um repressor e um modulador transcricional. Quando hipermutado, translocado e, consequentemente, inativado, pode associar-se à tumorigênese, inclusive no LDGCB [35].

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

LPSNC é um subtipo de LNH extranodal que acomete o encéfalo, leptomeninge, olho ou medula espinhal sem evidência de envolvimento sistêmico. Ao contrário do LDGCB sistêmico, o LPSNC se desenvolve em órgão desprovido de tecido linfoide [14]. Pela classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) [6,36], critérios de exclusão para definição de LPSNC incluem envolvimento de dura-máter, linfoma intravascular de grandes células B e linfoma secundário [13,37]. Podem-se apresentar como lesão intracraniana solitária ou múltipla, periventricular e leptomeníngea difusa, de medula ou neurolinfomatose [6,38,39]. Os sítios primários mais acometidos são o cérebro (79,5%), medula espinhal (6,7%), meninges e nervos cranianos (2%) e outros (11,8%) [15]. No linfoma primário ocular, os achados mais frequentes incluem infiltração vítrea e sub-retinianas, sendo o diagnóstico estabelecido por vitrectomia ou biópsia coriorretiniana [40].

Os principais fatores de risco para desenvolvimento de LPSNC incluem imunodeficiência primária ou adquirida, sendo esta iatrogênica ou pela infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) [39,41]. Os sintomas incluem déficit neurológico focal (70%), alterações neuropsiquiátricas (43%) e aumento de pressão intracraniana (PIC) (33%). Sintomas B são raros, e pacientes com acometimento ocular podem apresentar dor ocular, visão turva e escotomas visuais. Acometimento secundário do líquido cefalorraquidiano (LCR) e ocular ocorrem em 15-20% e 5-20% dos pacientes, respectivamente [38,39].

### 2.1 Epidemiologia

LPSNC tem incidência entre 0,47 a 0,7 caso por 100.000 pessoas/ano, corresponde a 2,2% de todos os tumores do SNC, 1% dos LNH, e a maioria dos casos (90%) apresenta histopatologia LDGCB [16,17,42-45]. No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer disponibiliza incidência de LNH e neoplasias primárias de SNC (5,2/100.000 pessoas/ano e 5,6/100.000 pessoas/ano,

respectivamente), porém não há dados sobre incidência anual de LPSNC [7].

A maioria dos casos é esporádica, e sua incidência aumenta com a idade, com mediana de idade ao diagnóstico de 65 anos e razão homem/mulher de 1,2/1 a 1,7/1 [15]. A incidência anual em população entre 30-69 anos e >70 anos é de 0,08/100.000 e 4,32/100.000, respectivamente [46]. Usualmente, os pacientes apresentam índice de comorbidade de Charlson-Deyo de 0 (65,9%) e ausência de sintomas B (79,6%) [17,22,47].

Apesar da baixa incidência de LPSNC em pacientes imunocompetentes, dados do SEER demonstram aumento de sua incidência (1,6% ao ano) em população > 65 anos entre 1992 e 2011 [19]. A realização mais frequente de exames imagenológicos de SNC e o aumento de uso de medicamentos imunossupressores em população idosa poderiam justificar o aumento da incidência observado nas últimas décadas [48,49].

## 2.2 Diagnóstico

### 2.2.1 Biópsia/Líquor

O diagnóstico geralmente é estabelecido por análise histopatológica e IHQ de biópsia estereotáxica. Biópsia esterotáxica permite diagnóstico histopatológico entre 80% e 99% dos pacientes, porém a quantidade de material obtido, de três a dez fragmentos medindo entre 5 e 10 mm de comprimento por 1 mm de espessura, muitas vezes é insuficiente para realizar todos os procedimentos anátomo-patológicos e moleculares [50].

O diagnóstico também pode ser realizado por análise de LCR ou aspirado vítreo em pacientes com acometimento ocular quando há restrição de acesso ao tumor [22]. A análise liquórica deve ser preferencialmente realizada por citometria de fluxo e citologia oncótica. A presença de acometimento extraneural exclui o diagnóstico de LPSNC, sendo recomendada investigação ativa por meio de exames de imagem por tomografia com emissão de pósitron com 18-fluorodeoxiglicose (18-FDG-PETC/CT) de corpo inteiro ou tomografia computadorizada (TC) de pescoço, tórax, abdômen e pélvis. A biópsia de medula óssea unilateral é recomendada para os casos que não são estadiados

com 18-FDG-PETC/CT. Para o estadiamento, recomendam-se também hemograma completo, perfil metabólico, dosagem de DHL e sorologia para HIV[51].

À histologia, o LPSNC é caracterizado por agrupamentos de centroblastos ou imunoblastos no espaço perivascular, com linfócitos reacionais, macrófagos e células microgliais entre as células tumorais [5,6,52]. Na maioria dos casos, as células malignas expressam antígenos de células B, como CD79b, CD19, CD20 e CD22. A ausência de imunoexpressão para CD138 corrobora os achados morfológicos centroblásticos sem características plasmocíticas [53].

Há dois padrões de disseminação tumoral: o primeiro corresponde ao padrão de crescimento angiotrópico, com células neoplásicas que aparentemente migram pelo espaço perivascular ou espaço de Virchow-Robin. Nestes casos, interfere na barreira hematoencefálica e eventualmente permite a captação de contraste na RNM. O segundo padrão é o de invasão ao longo das raízes nervosas através da substância branca do corpo caloso ou do espaço meníngeo. O crescimento e a proliferação tumoral em direção ao espaço subependimal podem levar à invasão do espaço periventricular e à disseminação pelo SNC. [5,54]. Geralmente observa-se padrão de atividade proliferativa, com expressão de BCL6 em 60-80%, MUM1+ em 90% e CD10 em 10% dos casos [42]. Resposta inflamatória secundária pode estar presente no LPSNC, com macrófagos ativados e células T reativas, o que pode estar associado a melhor prognóstico [55].

O antígeno quimiotáxico para linfócitos B CXCL13 está associado ao tropismo das células neoplásicas para SNC, incluindo neoplasias linfoides. Os biomarcadores CXCL13 e IL-10 podem estar elevados no LCR de pacientes com LPSNC. CXCL13 (AUC 0,841) tem sensibilidade e especificidade para diagnóstico de LPSNC de 71% e 95%, e IL-10 (AUC 0,851) tem sensibilidade e especificidade de 64% e 93,4%, respectivamente. Tal sensibilidade é duas vezes maior do que citologia de LCR ou de citometria de fluxo para diagnóstico de LPSNC (Tabela 1). Altas concentrações de CXCL13 no LCR estão associadas a pior prognóstico [55].

**Tabela 1 -** Sensibilidade e especificidade de biomarcadores CXCl13 e IL-10 (LCR) e aplicação diagnóstica de LPSNC [55]

| Biomarcador | Sensibilidade | Especifidade | AUC | IC95% |
|---|---|---|---|---|
| CXCL13 | 71% | 95% | 0,841 | 0,779-0,892 |
| IL-10 | 64% | 94,10% | 0,851 | 0,789-0,901 |
| CXCL13 ou IL-10 | 84,20% | 90,50% | 0,974 | 0,815-0,919 |
| CXCL13 e IL-10 | 50% | 99,30% | 0,746 | 0,675-0,809 |
| Citologia | 14% | - | - | - |
| Citometria de fluxo | 20% | - | - | - |

Com relação ao microambiente tumoral, pode se observar resposta inflamatória local com infiltrado de macrófagos e células T reativas. Infiltração de células T perivasculares podem estar associadas a melhor prognóstico, além de ser um alvo para terapias que potencializam resposta imune mediada por células T [56].

### 2.2.2 Imagem

No Serviço de Neurocirurgia, comumente os pacientes eram submetidos à RNM com injeção de contraste gadolíneo por ser o método radiológico mais sensível para diagnóstico de tumores em SNC, assim como de avaliação de resposta clínica [57,58]. A maioria dos pacientes apresenta massa cerebral isolada, isointensa ou hiperintensa em T1-*weighted* (RMN) com hipercaptação homogênea nas sequências pós-contraste, pouco edema e sem necrose. Na maioria dos casos, há lesão única (70%), sendo o hemisfério cerebral (66%), gânglio basal (27%) e o corpo caloso (24%) os sítios anatômicos mais acometidos [59]. A TC com contraste apresenta achados equivalentes, porém nenhum método de imagem é patognomônico do LPSNC. O principais diagnósticos diferenciais incluem glioblastoma multiforme, metástases cerebrais entre outras [60].

Aproximadamente 25% dos tumores têm outras lesões multicêntricas, não captantes de contraste, hiperintensas em T2-FLAIR (*fluid attenuated inversion recovery*), sendo estes achados consistentes com a disseminação

linfomatosa no cérebro que pode ocorrer na ausência de captação de contraste na RNM. T2-FLAIR tem maior sensibilidade para diagnóstico de lesões subclínicas, porém com menor especificidade. Alterações em T2-FLAIR podem ser secundárias à quimioterapia, à radioterapia de crânio total ou ao envelhecimento. Numa série analisada, porém, foi demonstrado que 88% das lesões em T2-FLAIR em LPSNC foram resolvidas após tratamento com HD-MTX, o que sugere tratar-se de lesões neoplásicas [61].

A *Diffusion-weighted imaging* analisa o coeficiente de difusão aparente de água em tumores hipercelulares como o LPSNC, com maior diferenciação entre tumores hipercelulares que se apresentam hiperintensos (LPSNC ou doença residual) e lesões com menor celularidade (gliomas malignos), o que aumenta a especificidade do método. Coeficientes de difusão muito baixos estão associados ao LPSNC [62,63].

O *International PCNSL Collaborative Group* (IPCG) desenvolveu um sistema para avaliar a extensão da doença e a resposta clínica ao tratamento oncológico a fim de se obter uma padronização [51], conforme demonstrado no Quadro 1.

O exame de $^{18}$F-FDG PET apresenta maior sensibilidade e especidade na detecção de acometimento nodal e extranodal de linfomas de alto grau, incluindo o LPSNC, além de avaliação de massas residuais no reestadiamento[58,64,65]. O LPSNC apresenta celularidade densa com alto metabolismo e consumo de glicose. No achado do PET, encontra-se alta concentração do FDG, o que pode auxiliar no diagnóstico diferencial entre LPSNC e outros tumores. Numa meta-análise incluindo 129 pacientes imunocompetentes com LPSNC, tal exame teve sensibilidade de 0,88 (IC95% 0,8- 0,94), especificidade de 0,86 (IC95% 0,73- 0,94), quando comparados à RNM e à biópsia estereotáxica (IC95% 0,04- 0,32) [60]. Num estudo retrospectivo com 34 pacientes, a mediana de SUV (*standardized uptake value*) máxima foi de 22,17 (±5,03), geralmente com valores superiores aos encontrados no glioblastoma multiforme [66].

| Resposta | Imagem encefálica | Dose corticoide | Avaliação oftalmológica | Citologia LCR |
|---|---|---|---|---|
| Resposta completa | Sem lesão com captação de contraste | Nenhuma | Normal | Negativo |
| Resposta Completa Não Confirmada | Sem lesão com captação de contraste | Qualquer | Normal | Negativo |
| | Lesão com pequena captação de contraste | | Pequena alteração no epitélio retiniano pigmentar | Negativo |
| Resposta Parcial | Diminuição de 50% na captação de contraste | Não disponível | Normal ou pequena alteração no epitélio retiniano pigmentar | Negativo |
| | Lesão sem captação de contraste | | Diminuição de células vítreas ou infiltrado retiniano | Persistente ou Suspeito |
| PD | Aumento em 25% da captação de contraste | Não disponível | Recorrente ou novo acometimento | Recorrente ou positivo |
| | Surgimento de qualquer outra lesão | | | |
| Doença Estável | Qualquer outra situação não descrita acima | | | |

**Quadro 1 -** Avaliação de resposta clínica [51]

## 2.3 Prognóstico

LPSNC tem pior prognóstico em relação ao LDGCB sistêmico [14,39]. A SG mediana é inferior a 12 meses em pacientes tratados apenas com WBRT e de 30 a 40 meses em pacientes tratados com quimioterapia à base de HD-MTX[12,41].

Em dados do *National Cancer Data Base,* 9.165 casos de LPSNC tratados entre 2004 e 2013 demonstraram SG em 3 anos de 37,7% (IC95% 36,6-38,8) para todos os pacientes; 51,8% para aqueles tratados com poliquimioterapia; 37,7% com monoquimioterapia e 14,1% para os casos tratados somente com radioterapia. Após análise dos fatores confundidores, tratamento com monoterapia e radioterapia isolada estiveram associados à pior SG em relação à poliquimioterapia, com HR de 1,32 (IC95% 1,22- 1,44) e HR= 2,32 (IC 2,07- 2,59), respectivamente [67]. Em análise do banco de dados do *SEER* (*Surveillance, Epidemiology, and End Results*), 4.142 casos com LPSNC evidenciaram SG em 1 ano de 47,8% (IC 46,2- 49,3) e SG em 3 anos de 38,2% (IC 37,8-38,6) [17]. Estudo CALGB 50202 demonstrou SG mediana de 4 anos, porém novas linhas terapêuticas foram necessárias para 50% dos pacientes devido à alta taxa de recaída [23].

### 2.3.1 Fatores clínicos de prognóstico

O Índice Prognóstico Internacional (IPI) é utilizado em outros tipos de linfoma por avaliação de SG e com algumas modificações para LPSNC. Em análise retrospectiva de 378 pacientes, foram identificados cinco fatores associados a pior prognóstico [68,69] (IPI modificado), conforme demonstrado a seguir:

- Idade > 60 anos;
- DHL elevada;
- Alta concentração de proteína no LCR (acima do limite da normalidade);
- Acometimento de regiões profundas do cérebro (periventriculares, gânglio basal, tronco cerebral e cerebelo) e

- Performance Status 2, 3 ou 4 *

  (* PS 0= paciente ativo, sem restrições; PS 1 = paciente com restrição a atividades físicas extenuantes, porém paciente ambulatorial capaz de realizar atividades físicas leves/moderadas e autocuidado); PS 2= paciente sintomático, acamado <50% do dia, auto-cuidados preservados; PS 3= paciente sintomático, restrito ao leito >50% do dia, carente de cuidados mais intensivos; PS 4= paciente completamente dependente e restrito ao leito[70])

Considerando 1 ponto para cada um dos fatores descritos acima, a SG em 2 anos pode ser estimada conforme demonstrado na Tabela 2.

**Tabela 2 -** Sobrevida Global (SG 2 anos) de acordo com o escore de prognóstico IPI modificado para LPSNC [68]

| Pontos | SG (±SD) |
|---|---|
| 0 ou 1 | 80% (±8%) |
| 2 ou 3 | 48% (±7%) |
| 4 ou 5 | 15% (±7%) |

Uma meta-análise com 783 pacientes avaliou o prognóstico e os efeitos do tratamento em primeira linha em pacientes com LPSNC maiores que 60 anos. Nesta população, KPS≥70% foi fator prognóstico para mortalidade (HR=0,5; IC95% 0,41-0,62) [71]. A maioria dos pacientes com LPSNC foram idosos e, consequentemente, com maior risco de neurotoxicidade à WBRT e com maior morbimortalidade. Por este motivo, muitas vezes é utilizada apenas quimioterapia isolada nesta população [72]. O estudo prospectivo MATRix com 227 pacientes demonstrou SLP e SG inferiores em pacientes acima de 65 anos em comparação aos indivíduos com idade inferior a 65 anos tratados com metotrexato, citarabina, tiotepa e rituximab [73]. Tais dados são endossados por uma análise retrospectiva de dados do SEER com 5138 pacientes entre 1973 e 2014, cuja análise multivariada para SG demonstrou que idade >60 anos (HR= 1,834; IC95% 1,692- 2,004; p<0,001) foi associada à pior sobrevida. Tratamento com quimioterapia (HR=0,442; IC95% 0,407-0,480; p<0,001) foi associado à maior sobrevida [15].

Início de tratamento precoce também tem impacto no prognóstico. Num

estudo de fase 2 com 44 pacientes com LPSNC virgens de tratamento submetidos à imunoquimioterapia, indivíduos com início de tratamento acima de um mês do diagnóstico tiveram pior SLP em relação aos que iniciaram tratamento mais precoce (SLP 3 anos 20% x 59%, p=0,05) [23].

### 2.3.2 Fatores histopatológicos de prognóstico

No LDGCB sistêmico, biomarcadores para recaída incluem *double hit* MYC+BCL2+. Duplo expressor (DE) MYC+BCL2+ e célula de origem ABC parecem também estar correlacionados com prognóstico. Com o critério de positividade a IHQ para MYC+ ≥ 40% / BCL2+ ≥50%, é possível identificar o subtipo DE em 30% dos LDGCB, dos quais > 50% são do subtipo ABC. Estes pacientes apresentam SLP 5 anos de 44% e SG 5 anos de 39%. No entanto, dados no LPSNC ainda são inconclusivos [74]. No LDGCB sistêmico, imunoexpressão de BCL2, MYC, LMO2 e p53 são considerados de valor prognóstico [75].

O tipo de célula de origem pelos critérios de Hans é estudado como fator de prognóstico, porém com resultados inconclusivos. A presença CD10+ e/ou BCL6+ e a negatividade para MUM1 por IHQ caracterizam o subtipo GCB e o oposto o subtipo não-GCB [10], conforme Figura 1. O ponto de corte para as reações de IHQ é de ≥ 30%. Teste de expressão genética de 20 genes foi validado para identificar COO em amostras parafinadas de LDGCB, facilitando sua caracterização [76]. Num estudo com 77 pacientes com LPSNC, foi observado concordância entre os critérios de Hans e LST *assay* de 83% [77].

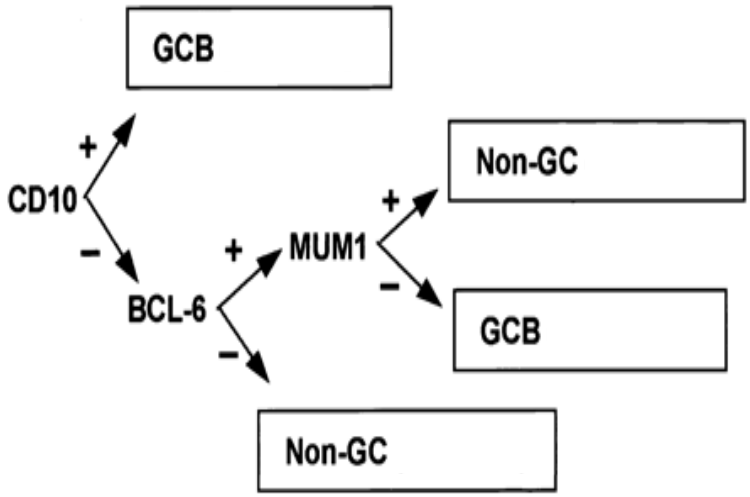



**Figura 1 -** Tipo de Célula de Origem conforme Critérios de Hans[10] para IHQ (2004). BCL6 e CD10 são marcadores de Centro Germinativo de Células B. MUM1 é expresso em plasmócitos e no desenvolvimento tardio de Células B e está associado a subgrupo ABC em estudos de perfil de expressão genética. Se CD10 ou ambos CD10 e BCL6 forem positivos, a COO é do subgrupo GCB. Se ambos BCL6 e CD10 são negativos, a COO é do subgrupo Não-GCB. Se BCL6 for positivo e CD10 for negativo, a expressão de MUM define o subgrupo da COO: se MUM1 é negativo, a COO é subgrupo GCB; se MUM1 é positivo, a COO é subgrupo Não-GCB

No LPSNC, a imunoexpressão de MUM1 e BCL6 é de 95% e 60%, respectivamente, e a maioria dos casos apresenta COO não-GCB [41,53,78]. Num estudo com 82 pacientes com LPSNC, 79 (96,3%) foram classificados como não-GCB, 42 (51,2%) expressavam BCL6$^+$ e MUM1$^+$ sugerindo “não-GCB”. Trinta e três (40,2%) expressavam exclusivamente MUM1, o que sugere sobreposição entre *late GC* e *early post-GC*, justificando o fenótipo não-GCB e o pior prognóstico [53]. Contudo, a classificação da COO pelos critérios de Hans não teve valor prognóstico numa coorte retrospectiva de 115 pacientes com LPSNC [79].

Num estudo retrospectivo com 31 casos de LPSNC tratados com HD-MTX, 26 (84%) pacientes foram caracterizados como não-GCB, a sobrevida mediana foi de 2,5 meses (0-6,6 meses) e 7,4 meses (4,4-10 meses) para os grupos GCB e não-GCB, porém não significante estatisticamente [12]. É importante ressaltar que o perfil transcricional das células neoplásicas do LPSNC é distinto do LDGCB sistêmico, mesmo quando a COO (GCB x ABC) é

a mesma, o que pode justificar o pior prognóstico e o comportamento mais agressivo do LPSNC. Pacientes com LPSNC ABC apresentam hiperexpressão e ativação da via do *Fibroblast Growth Factor*, associado à sobrevida e proliferação celulares, diferentemente do LDGCB sistêmico ABC [80].

Alguns estudos evidenciaram que a expressão de BCL6 (IHQ) foi associada a melhor prognóstico [13]. A análise imuno-histoquímica dos pacientes do CALGB50202 demonstrou que a hiperexpressão de BCL6 estava associada à menor SG [23]. Este resultado foi ratificado por um estudo prospectivo [81], porém outros evidenciaram o contrário: que a hiperexpressão de BCL6 estaria associada a melhor prognóstico [41]. Uma das possibilidades para esta discrepância poderia ser que o significado prognóstico do BCL6 seja dependente da coexpressão do MYC ou BCL2 ou devido ao tipo de tratamento que os pacientes receberam nestes estudos.

A expressão de CD3 é um marcador de células T e não é frequente em linfomas de célula B, porém pode estar presente em LNHDBC EBV+, possivelmente devido à inativação do PAX5 que atua na diferenciação da célula B, o que permite a expressão do CD3 [82-84]. É uma proteína com domínio extracelular, transmembrana e intracelular. A IHQ apresenta-se na membrana e citoplasma principalmente de células T normais e neoplásicas [85,86].

*Tumour Infiltrating Lymphocyte (TIL)* é caracterizado pela presença de pelo menos um vaso de pequeno a médio calibre circundado por pelo menos duas camadas de células T à IHQ pela positividade de CD3 (linfócito T), FOX-P3 (linfóciyo T regulador) e TIA-1 (células citotóxicas). É um fator de prognóstico positivo para sobrevida global, resposta tumoral ao tratamento em vários tipos de câncer (carcinoma ductal de mama, câncer de ovário e câncer de endométrio, entre outros), tanto como variável categórica (presença ou ausência) como variável qualitativa numérica (contagem de TIL) [87-89]. Num estudo retrospectivo com 62 pacientes com LPSNC, TIL esteve presente em 32% dos casos e foi associado à melhor resposta e sobrevida global [90].

Num estudo retrospectivo, multicêntrico, com 100 LPSNC, necrose tumoral foi observada em 24% e TIL em 36%. O padrão de necrose tumoral observado foi do tipo coagulativo, caracterizado por coleções de células neoplásicas fantasmas que ocupam espaço na biópsia, além da presença de

células apoptóticas. TIL foi analisado em campo de pequeno a médio aumento, analisando os vasos ao redor do tumor ou das células tumorais, com fenótipo de células T presente e acumuladas em múltiplas camadas próximas à parede vascular ou entre a parede vascular e as células tumorais. Presença de TIL foi associada à melhor SG na análise multivariada quando comparada à ausência de TIL (SG: 59% ± 14% vs. 42% ± 9%, P= 0.02, respectivamente). No entanto, a presença de necrose tumoral não foi considerada fator prognóstico em pacientes com LPSNC [56]. Num estudo com 30 pacientes do *International Extranodal Lymphoma Study Group,* um colar de CD3 perivascular reativo foi observado em 23% dos pacientes, todos com IPI modificado de risco baixo a intermediário [91].

## 2.4 Tratamento

O tratamento é composto de uma fase de indução seguida pela consolidação [92]. A escolha do tratamento na fase de indução depende de características clínicas, tais como idade, *performance status* (PS), comorbidade e IPI.

A indução pode ser realizada com HD-MTX, imunoquimioterapia associada a HD-MTX, WBRT, entre outras. Não se recomenda tratamento isolado com corticosteroides devido à alta taxa de recidiva e à interferência no diagnóstico histopatológico se administrado antes da realização da biópsia. A escolha do tratamento de consolidação depende da resposta clínica obtida na fase da indução, da tolerabilidade do paciente e da toxicidade. Opções da fase da consolidação incluem observação, citarabina em altas doses, RT, ASCT, entre outras. Os agentes quimioterápicos precisam ter boa penetração pela BHE. Agentes alquilantes e esteroides têm boa penetração em doses convencionais; MTX e araC têm baixa penetração, porém em doses altas conseguem atravessar a BHE. Agentes antracíclicos, alcalóides da vinca têm baixa penetração e baixa disponibilidade no SNC, os quais necessitam de doses tóxicas para serem efetivas em tumores no SNC [92].

Apesar de avanços no tratamento do LPSNC, a taxa de recorrência em 2 anos é de 50% e um terço dos pacientes são refratários ao tratamento

inicial[21,93].

Devido ao risco de neurotoxicidade induzido pelo tratamento, recomenda-se realização de testes neuropsicológicos para as funções de execução, atenção, memória e velocidade psicomotora antes, durante e após o tratamento [21,94].

### 2.4.1 Radioterapia

WBRT como terapia isolada era o tratamento de escolha no passado. Doses entre 36 a 45Gy apresentavam RC de 60% a 90%, porém com recidiva precoce e SG mediana 12-18 meses e alta morbi-mortalidade, incluindo neurotoxicidade precoce e tardia [95]. A neurotoxicidade é ainda mais prevalente quando associada à quimioterapia. Por estes motivos, além de o LPSNC ser uma doença multifocal e infiltrativa, radioterapia focal ou radiocirurgia não são recomendadas atualmente como primeira escolha terapêutica, porém pacientes que não respondem à quimioterapia podem se beneficiar desta terapia como resgate [16,94,95].

O benefício da WBRT como consolidação também é questionado. Um estudo multicêntrico, randomizado, fase 3, com 581 pacientes, comparou quimioterapia baseada em HD-MTX com ou sem consolidação com RT, sem evidência de melhora na SG apesar do aumento da PFS no braço com RT [22].

Estudo prospectivo e observacional demonstrou que radiocirurgia com *gamma knife* associado à quimioterapia aumentou a SG de 27 meses para 48 meses em pacientes submetidos à radiocirurgia *versus* aqueles submetidos apenas à quimioterapia, com RC de todas as lesões e sem declínio neurológico. No entanto, trata-se de estudo não randomizado, e a análise dos dados encontra-se em andamento [96].

Doses menores de radioterapia foram associadas a menor risco de perda neurocognitiva. Num estudo de fase 2, pacientes em RC foram submetidos à consolidação com citarabina e WBRT em doses menores (23,4 Gy) após indução com HD-MTX, sem perda de função cognitiva [97]. Tais dados, no entanto, devem ser analisados com cautela, devido ao risco de neurotoxicidade tardia [98]. Radioterapia foi associada a maior risco de toxicidade

neurológica tardia (OR 5,23, IC95% 2,33-11,74) [71].

Sintomas tardios associados à neurotoxicidade por WBRT incluem déficit de atenção, alterações de memória e de marcha, ataxia, incontinência, entre outros. Achados radiográficos incluem alteração de substância branca, aumento ventricular e atrofia cortical. Achados anátomo-patológicos incluem demielinização, perda neuronal hipocampal e aterosclerose de grandes vasos[99]. Não há tratamento efetivo para estas complicações [100].

### 2.4.2 Monoterapia ou Poliquimioterapia baseado em MTX

MTX em altas doses é o agente antineoplásico mais usado na fase de indução, pois possui boa penetração na BHE e depuração plasmática trifásica. Esquemas habituais incluem infusão rápida em 3 horas em ciclos de 14 ou 21 dias na dosagem ≥3 g/m$^2$. Doses ≥ 1g/m$^2$ alcançam nível terapêutico no cérebro e doses ≥3g/m$^2$ atingem nível terapêutico no LCR [101]. Infusões contínuas em 24 horas não são mais eficientes; administração de mais de seis ciclos de HD-MTX está associada à maior taxa de RC [97,102]. Doses até 3,5g/m2 têm boa tolerabilidade, sendo as principais toxicidades: disfunção renal, mucosite, citopenias e raramente hepatite, esta ocorrendo principalmente em pacientes idosos [103].

Uma meta-análise com 783 pacientes avaliou prognóstico e efeitos do tratamento em primeira linha em pacientes com LPSNC maiores que 60 anos. Nesta população, o tratamento baseado em HD-MTX aumentou a sobrevida quando comparado a WBRT (HR 0,70, IC95% 0,53-0,93). Não houve diferença entre HD-MTX associado à quimioterapia oral e outras terapias agressivas baseadas em HD-MTX (HR 1,39, IC 95% 0,90-2,15).

Estudo de fase 2 randomizado com 79 pacientes comparou HD-MTX (3,5g/m$^2$, D1) associado à citarabina (2g/m$^2$) com HD-MTX isolado na dose de 3,5g/m$^2$ a cada 21 dias, seguido de RT de consolidação. HD-MTX associado à citarabina ofereceu maior taxa de RC (46% x 18%, p=0,06) e de RG (69% x 40%, p=0,009), porém com maior incidência de neutropenia (90% x 15%, p=0,00001), anemia (46% x 10%, p=0,00001), complicações infecciosas (23% x 3%, p=0,0002), trombocitopenia (92% x 8%, p=0,0001) e hepatoxicidade

(10% x 3%, p=0,05) [104].

### 2.4.3 Imunoterapia e Imunoquimioterapia com Rituximabe

Rituximabe é um anticorpo monoclonal contra o antígeno CD20 presente em linfócitos B. Tem penetração limitada em SNC atingindo nível em LCR de 0,1% a 4,4% em relação ao nível sérico, porém a monoterapia com rituximabe levou à resposta radiológica em pacientes com LPSNC recidivados [105]. A meta-análise para avaliar o benefício do uso de rituximabe evidenciou que esse anticorpo levou a ganho de SLP 5 anos, com OR (*odds ratio*) 2,54 (IC95% 1,64-3,93, p=0,0001), e ganho de SG com OR 2,87 (IC 95% 2,02-4,08, p= 0,00001) [106]. Desta forma, a adição de anti-CD20 tem sido recomendada como padrão no tratamento de LPSNC.

O benefício da adição de rituximabe a HD-MTX associado a um agente alquilante também foi avaliado em estudos clínicos. Num estudo de fase 2 com 52 pacientes expostos à indução com rituximabe, MTX, procarbazina e vincristina seguida de consolidação com WBRT em dose baixa, constatou-se a taxa de resposta de 79% e SLP 2 anos 57% [97]. Num estudo com 33 pacientes maiores de 65 anos submetidos à indução com rituximabe, MTX, procarbazina e vincristina seguida de consolidação com ASCT, obteve-se RG 94% e SLP 2 anos 79% [107]. Em outro estudo com 44 pacientes tratados com HD-MTX 8g/m$^2$ (D1), rituximabe 375mg/m$^2$ (D3) e temozolamida 150mg/m$^2$ (D7 a D11) seguida de consolidação com etoposídeo 5mg/kg em infusão contínua por 96 horas e citarabina a 2g/m$^2$ a cada 12 horas por 8 doses, obteve-se RG 77%, RC 68% e SLP 4 anos, semelhante aos resultados obtidos com esquemas que incluem WBRT [23]. Num estudo com 53 pacientes com população predominantemente idosa (62% acima de 60 anos), avaliou-se a terapia de indução com rituximabe, MTX e temozolamida seguida de consolidação com WBRT hiperfracionado e temozolamida de manutenção, obtendo-se RG 57% e SLP 64% [108].

Num estudo de fase 2 (IELSG32), 219 pacientes LPSNC virgens de tratamento foram randomizados (1:1:1) para terapia de indução em três braços: braço A (MTX 3,5g/m$^2$ d1, araC 2g/m$^2$ d2-3, a cada 3 semanas), braço B (rituximabe 375mg/m$^2$ d5, MTX 3,5g/m$^2$ d1, araC 2g/m$^2$ d2-3, a cada 3

semanas) e braço C (rituximabe 375mg/m$^2$ d5, MTX 3,5g/m$^2$ d1, araC 2g/m$^2$ d2-3, tiotepa 30mg/m$^2$ d4 a cada 3 semanas) seguido de consolidação de acordo com a resposta clínica com radioterapia 36 Gy mais *boost* (reforço) de 9Gy ou BCNU 400mg/m2 d1, tiotepa 5mg/kg d2-3 mais ASCT em caso de RC ou resposta parcial (RP) ou doença estável (DE); e em caso de PD, radioterapia com 40Gy mais *boost* (reforço) de 9Gy. A mediana de *follow-up* foi de 40 meses (24-76). Em termos de SLP, A x B (RC 0,68, IC95% 0,45-1,02, p=0,06), A x C (RC 0,66, IC95% 0,53-0,81, p=0,0001) e B x C (RC 0,63, IC95% 0,40-0,99, p=0,04). Em termos de SG, A x B (RC=0,73, IC95% 0,48-1,11, p=0,14), A x C (RC=0,65, IC95% 0,52-0,83, p=0,0004) e B x C (RC 0,57, IC95% 0,35-0,93, p=0,02). Tais dados sugerem o benefício da adição de rituximabe ao tratamento oncológico [73].

Estudo prospectivo randomizado comparou MTX e temozolamida (braço A) *versus* MTX, procarbazina, vincristina e citarabina (braço B) em pacientes maiores de 60 anos com LPSNC virgens de tratamento. Braço B *versus* Braço A teve SLP de 9,5 meses (IC95% 5,3-13,8) *versus* 6,1 meses (IC95% 3,8-11,9), SG de 31 meses (IC95% 12,2-35,8 meses) *versus* 14 meses (IC95% 8,1-28,4 meses) e RG de 82% *versus* 71% (p=0,023), respectivamente, o que favorece o segundo esquema [109].

O estudo Alliance/CALGB 50202 avaliou 44 pacientes expostos à quimioterapia não mieloablativa com MTX, rituximabe e temozolamida por 8 ciclos, seguida de consolidação com araC e infusão contínua de etoposídeo em 96 horas. Com mediana de seguimento de 4,9 anos, a SLP foi maior que 2 anos e a SG, superior a 5 anos, sem neurotoxicidade [23].

### 2.4.4 Quimioterapia intraventricular

Quimioterapia intratecal via reservatório de Ommaya aumenta a concentração com maior duração no LCR em relação à quimioterapia intravenosa, pois a barreira hematoencefálica não interferiria na penetração das macromoléculas no LCR. Quimioterapia intraventricular com rituximabe e MTX em LPSNC apresentou TR 75% [110], porém análises retrospectivas não demonstraram benefício da adição de quimioterapia intratecal à HD-MTX, além

de maior risco de infecção e meningite [111-113].

### 2.4.5 Terapia de manutenção com agente quimioterápico

Lenalidomida possui atividade em LPSNC tanto como agente único como combinado a outros quimioterápicos. Manutenção com lenalidomida aumentou a SLP, com perfil de toxicidade aceitável em pacientes com recaída de LPSNC [114]. Estudos de fase 2 demonstraram perfil de segurança e atividade da lenalidomida aceitável em LPSNC. Manutenção com lenalidomida na dose de 5mg a 10mg após terapia de resgate foi associada à resposta durável em 5 de 10 pacientes com LPSNC. Foram detectados níveis terapêuticos de lenalidomida no LCR por 2 a 15 horas após uma dose 20mg [115].

### 2.4.6 Transplante de Medula Óssea Autólogo (ASCT)

Consolidação com HD-ASCT após quimioterapia parece aumentar a SG e SLP [116] devido à penetração no SNC [116,117], porém outros estudos sugerem que regimes de consolidação com ASCT estão associados à piora da função cognitiva [92].

Num estudo de fase 2, uma população de 79 pacientes LPSNC virgens de tratamento foi submetida à indução com HD-MTX, citarabina, rituximabe e tiotepa, seguida de condicionamento pré-HD-ASCT com carmustina e tiotepa, obtendo TR 91%, SG 2 anos 87%. O tratamento foi considerado tolerável, pois, durante a fase de indução, 47% dos pacientes tiveram anemia grau 3, e 63%, trombocitopenia grau 4. Durante a fase de HD-ASCT, 50% apresentaram febre grau 3, e 93%, leucopenia grau 4, de acordo com o CTCAE v4.0 (*Common Terminology Criteria for Adverse Events*) [118].

O estudo randomizado PRECIS, em andamento, com 140 pacientes está comparando radioterapia (40Gy) ou ThBuCTX/ASCT como regime de consolidação após indução com R-MBVP-AraC. Dados preliminares demonstraram que ambas RT e ASCT foram associadas a SLP em 2 anos de 63% e 86%, SG 2 anos de 64% e 65% nas coortes da RT e HD-ASCT, respectivamente [115].

### 2.4.7 Tratamento de resgate

Apesar da alta taxa de resposta inicial, a maioria dos pacientes apresenta PD em algum momento após tratamento inicial baseado em HD-MTX. O emprego de HD-MTX após PD pode ser efetivo, principalmente em pacientes que tiveram resposta prévia a este agente. Num estudo retrospectivo com 22 pacientes com recaída retratados com HD-MTX, obteve-se RG de 91% na primeira recaída e de 100% na segunda recaída [119]. Num estudo de fase 2 com 27 pacientes avaliados, o tratamento em segunda linha com citarabina e etoposídeo seguido de ASCT com condicionamento baseado em tiotepa, busulfan e ciclofosfamida apresentou RC de 90%, com SLP 41,1 meses e SG 58,6 meses [120]. A WBRT pode ser utilizada como terapia de resgate, com RG de até 74% e SG 10,6 meses num estudo com 27 pacientes [121].

### 2.4.8 Estudos de Pesquisa Clínica Fase 1/2 em pacientes com LPSNC recidivadas

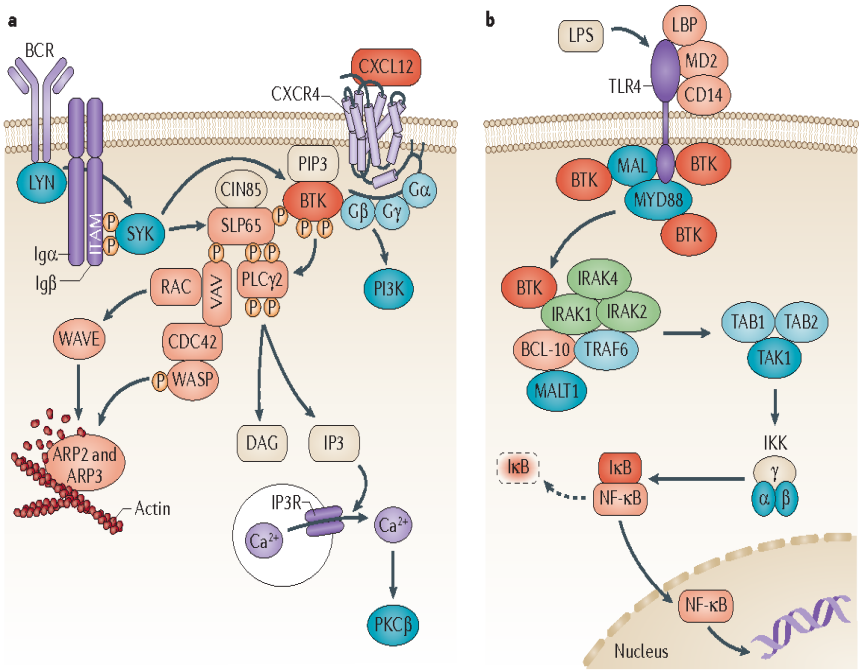
#### 2.4.8.1 *Ibrutinib*

Ibrutinib é um inibidor oral do *Bruton tirosina kinase* (BTK), o qual reduz a proliferação celular e induz apoptose. Além disso, potencializa a resposta da célula B via mecanismo independente da BTK [78,122]. Como pacientes com LPSNC podem ter alta taxa de mutação do receptor da célula B (BCR) e da via do MYD88, há plausibilidade biológica no uso de ibrutinibe em LPSNC. Estudo de fase 1 com 13 pacientes com LPSNC refratários demonstrou penetração suficiente do Ibrutinib em SNC, sendo bem tolerado em doses de 560mg e 840mg, com Resposta Global de 75% e SLP de 4,6 meses. Apenas um paciente teve aspergilose pulmonar e resistência ao ibrutinibe associada à mutação CARD11 (R179Q), CD79B e/ou A20 (TNFAIP3) [123,124].

Ibrutinib é um antagonista *in vitro* ao efeito dos agentes antifolatos em linhagem celular de LDGCB sistêmico ABC, por isso os estudos de fase 1/2 não associam ibrutinibe a metotrexato. Ele parece atuar como sensibilizador à quimioterapia e confere resposta superior à do HD-MTX. Estudo de fase 1 com

o esquema TEDDi-R (Temozolamida, Etoposídeo, Doxorubicina Lipossomal, Dexametasona, Ibrutinib, rituximabe incluindo ibrutinibe monoterapia durante 2 semanas) em pacientes virgens de tratamento e com recaída teve RG de 94% e RC 86%, porém com alta toxicidade: 94% de neutropenia grau 4 e 39% de aspergilose invasiva pulmonar ou cerebral, com mortalidade de 28%; bastante alta se comparada à taxa de mortalidade de 2-10% em pacientes tratados com quimioterapia baseada em HD-MTX [124,125].

Ratos *knocked-out* para BTK ($BTK^{-/-}$) inoculados com aspergilos apresentaram maior mortalidade quando comparados a ratos $BTK^{+/+}$. Isso demonstra o papel do BTK na imunidade a esta infecção [125]. A resposta das células mieloides aos esporos fúngicos depende de sinalização via BTK para induzir expressão de TNF-alfa e o recrutamento de neutrófilo [124]. A Figura 2 ilustra a sinalização celular via BTK.




FONTE: Hendriks *et al.*, 2014 [126]

**Figura 2 -** Sinalização celular via BTK [126]. A ativação do Receptor de Célula B (BCR) leva à sinalização intracelular e à formação de *micro-signalosome,* que é composto de VAK, PI3K, BTK, SLP65 e phsopholipase PLCy2. BTK é o principal responsável pela ativação de PLCy2, levando a influxo de Cálcio e ativação de receptores de fatores nucleares de transcripção de células T ativadas (NFAT) e NF-kB, além da ativação de ERF1 e ERF2. A ativação de BTK também leva à ativação da proteína da síndrome de Wiskott-Aldrich (AWASP), o que induz a mudança no citoesqueleto associada à ativação de BCR. AKT é ativado também pelo PI3K, que fosforila fatores de transcrição FOXO, inativando-os. AKT também bloqueia proteínas apoptóticas, como BH3, BAD, liberando o BCL-X L e estabilizando o MCL1

### 2.4.8.2 *Temsirolimus*

Temsirolimus é um inibidor do mTOR, importante na via do PI3-K/AKT/mTOR e em várias vias de sinalização *pro-survival*, pois regula a síntese proteica e o crescimento celular. Num estudos de fase 1/2 em pacientes com LPSNC recidivados, a monoterapia com temsirolimus obteve RG 54%, SLP 2,1 meses, porém com mortalidade de 13,5% (principalmente pneumonia) [127].

2.4.8.3 *Imunoterapia*

Imunoterapia pode ter um papel promissor no futuro do tratamento do LPSNC. Células T e macrófagos ativados levam à resposta inflamatória local e podem estar associados a melhor prognóstico. Isso sugere que a potencialização do sistema imune mediado por células T pode ser efetiva [55]. É frequente o ganho do número de cópias do 9p24,1/*PD-L1 e PD-L2* (*programmed death ligands* 1 e 2) e o aumento de expressão de proteínas PDCD1, PD-L1 e PD-L2 em LPSNC. Nivolumabe é um anticorpo humano IgG4 cujo alvo é a proteína PDCD1, o qual impede a ligação do PD-L1 presente no LPSNC com o PDCD1 do linfócito. Estudo de fase 1 (LPSNC refratários ou com recidiva) avaliou monoterapia com nivolumabe em quatro pacientes. Em seguimento de 13 meses, todos os pacientes obtiveram RC em 2 meses [33]. Estudo de fase 2 com Nivolumabe em LPSNC recidivados encontra-se em andamento.

2.4.8.4 *Lenalidomida*

Lenalidomida é um agente imunomodulador oral com efeito tumoral pleotrópico que inclui estimulação de célula T e expansão de células NK. Ele possui ação antagonista ao IRF4 e MYC, com efeito pró-sobrevivência [128,129]. Num estudo de fase 1, 14 pacientes com recaída foram expostos a lenalidomida EV e rituximabe endovenoso e intraventricular, com RG de 64% e SLP mediana 6 meses, sem mortalidade relacionada ao tratamento, sendo recomendada dose de 15mg/dia [130]. Num estudo retrospectivo com 8 pacientes com LPSNC R/R com última linha de resgate incluindo MTX, rituximabe, radioterapia ou ressecção subtotal, a manutenção com lenalidomida na dose de 5 a 10mg/d) evidenciou alta RG. Cinco pacientes obtiveram RC em até 2 anos após início de tratamento. Desta forma, sugeriu-se que a manutenção com lenalidomida poderia ser uma opção para terapia de resgate [130]. Estudo de fase 2 com lenalidomida e rituximabe em pacientes com recaída teve taxa de resposta de 63% e SLP 8,9 meses (ASH2016). O Quadro 2 demonstra alguns estudos de fase 1/2 em andamento.

| Molécula | Desenho | Taxa de resposta | SLP | Comentários |
|---|---|---|---|---|
| Ibrutinib | fase 1 MSKCC em recaída LPSNC | 75% | 4,6 meses | um caso de aspergilose pulmonar, resistência ao ibrutinib com mutação CARD11 |
| Ibrutinib | fase 2 em recaída LPSNC e linfoma intraocular | 56% | | um caso de aspergilose pulmonar, análise final pendente |
| DA-TEDDi-R com monoterapia com ibrutinibe | fase 1 em pacientes com recaída LPSNC | 94% ibrutinib, 84% RC com TEDDiR | | 39% taxa de aspergilose invasiva nos pulmões e cérebro, mortalidade relacionada ao tratamento em 28% |
| Temsirolimus | fase 1/2 em recaída LPSNC | 54% | 2,1 meses | mortalidade relacionada ao tratamento: 13,5% |
| Nivolumabe | fase 2 em recaída LPSNC, linfoma testicular | | | em andamento |
| Lenalidomida/ rituximab | fase 1 em recaída LPSNC | 64% | 6 meses | coorte retrospectiva: aumento em 12 vezes da duração de resposta com manutenção de lenalidomida |
| Lenalidomida/ rituximab | fase 2 em recaída LPSNC | 63% | 8,9 meses | análise final pendente |
| Pomalidomida/ dexametasona | fase 1 em recaída LPSNC ou recaída linfoma intraocular | | | em andamento |

**Quadro 2 -** Estudos de fase 1 e fase 2 em andamento

## 2.5 Fisiopatologia molecular do LPSNC

A fisiopatologia molecular do LPSNC ainda não se encontra completamente definida. Porém o avanço das técnicas de biologia molecular, em especial o sequenciamento de todo o exoma, a hibridização genômica comparativa e a análise de perfil de transcrição, do microambiente tumoral e de perfil de expressão gênica têm permitido a identificação de genes alvo envolvidos na sua patogênese [24,131,132].

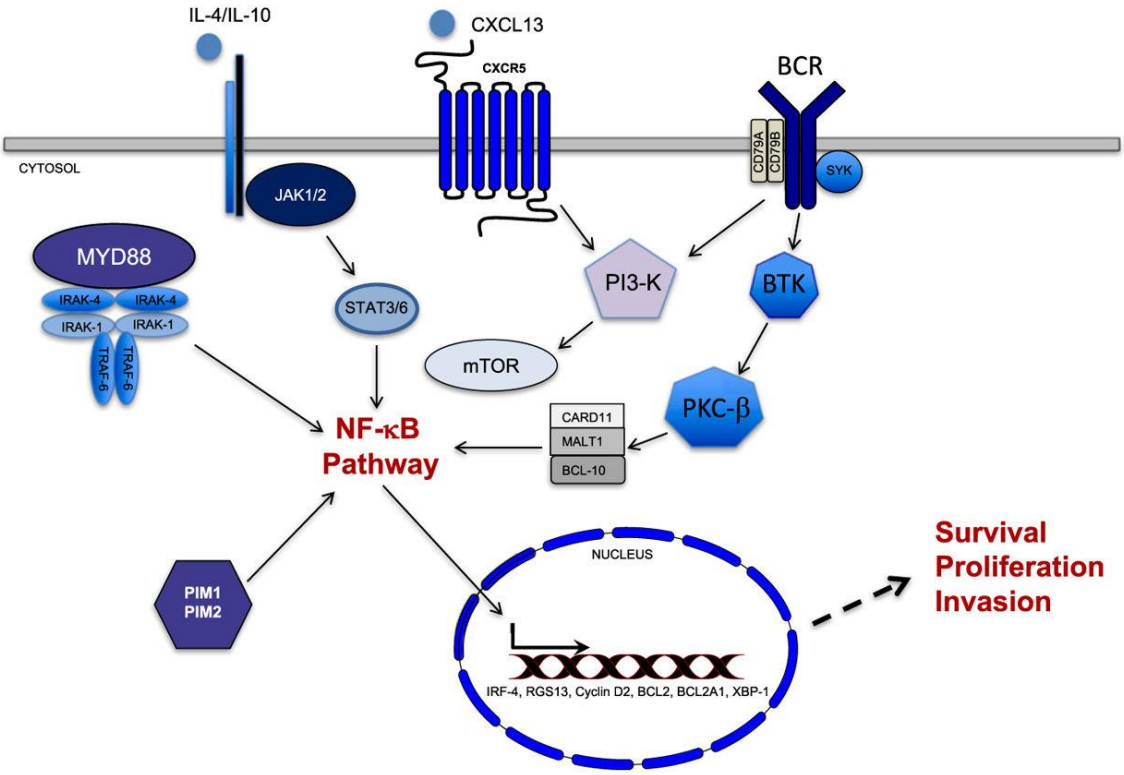
EBV não está associado à fisiopatologia do LPSNC em pacientes imunocompetentes. Num estudo com 70 pacientes imunocompetentes, a hibridização *in situ* para EBV foi negativa em todas as biópsias [53].

A ativação da via NFkB parece estar diretamente associada à patogênese do LPSNC. Esta via atua de modo a facilitar a transcrição de genes associados à sobrevida, proliferação e invasão celular, como *IRF-4, RSGS13, Ciclina D2, BCL2, BCL2A1* e *XBP-1* (Figura 3). A ativação crônica da via do BCR, principalmente decorrente de mutações do *MYD88/IRAK* e do *B-cell antigen receptor-associated protein cluster of differentiation* (CD79B), coopera para ativar a via NFkB [24,34]. Num estudo com 30 pacientes, mutações no CD79b foram associadas à melhor SLP em até 2 anos [133]. A Figura 3 - ilustra a via no NFkB.

MYD88 é uma proteína adaptadora usada pela maioria dos receptores do tipo Toll-like e do receptor da Interleucina-1 (IL1) para ativar a via NFkB por meio do receptor associado à kinase IL1 (IRAKs). Mutações no domínio citosólico do MYD88 por substituição de leucina por prolina na posição 265-L265P ocorrem em 55% dos pacientes com LPSNC [131]. Mutações do *MYD88* L265P promovem desenvolvimento de LDGCB em ratos [134]. Estas mutações também são frequentes no linfoma ocular [135]. Interessantemente, mutações no *MYD88* e *CD79B* são raras no LDGCB sistêmico com envolvimento de SNC, o que sugere patogênese molecular distinta entre as duas doenças [136]. Num estudo com 80 pacientes com LPSNC, mutações no *MYD88* foram associadas a melhor prognóstico [77]. No LDGCB sistêmico ABC, mutações do gene *MYD88* são menos frequentes, com ocorrência em 39% dos casos [131]., A mutação concomitante de *MYD88* L265P e *CD79B* ITAM foi encontrada em 37% do

LPSNC e em apenas 10% no LDGCB sistêmico do subtipo ABC [125].

Mutações no ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) associado ao BCR/CD79B ocorrem em 40% do LPSNC, e em 20% no LDGCB sistêmico do subtipo ABC [131]. Mutações no *CARD11* também podem ativar a via NFkB, sendo encontradas em 16% do LPSNC. Por outro lado, o TNFAIP3 (A20) é um regulador negativo do NFkB, e mutações somáticas neste linfoma estão presentes em 3% a 15% dos casos [137].




FONTE: Rubenstein, 2017 [24]

**Figura 3 -** Via do NFkB- A ativação transcripcional do NFkB é regulada por múltiplos sinais no LPSNC, incluindo o complexo MYD88/IRAK e o complexo BCR, constituído pelo CD79A e B. A ativação das kinases IRAK via mutação oncogênica do MYD88 e L265P ocorre em aproximadamente 555 do LPSNC. Ativação crônica da via de sinalização do BCR envolvendo o BTK interage com a via do MYD88/IRAK na ativação do NFkB. Sinalização via PIM kinases, PI3K/mTOR, JAK/STAT também estimula a sobrevida celular. Genes alvos do NFkB (incluindo *IRF-4, BCL2, ciclina D2, RGS-13, XPB-1*) também potencializam a sobrevida, a proliferação e a invasão.

Pesquisa do número de cópias de DNA por sequenciamento de todo o exoma evidenciou ativação da via do NFkB, com mutações genômicas

significativas no cromossomo 6q. Além disso, observou-se deleção do 6q21-23 em 40% a 60% dos LPSNC, associado a pior prognóstico. Prováveis genes envolvidos nesta deleção incluem o A20 (*TNFAIP3*), um regulador de diferenciação da célula B, *PRDM1* e uma tirosina fosfatase, *PTPRK* [131,138]. Sequenciamento de todo o genoma e estudos de hibridização demonstraram redução do número de cópias no 9p21.3 em até 80% dos casos. Esta anormalidade foi associada a alterações do regulador de ciclo celular CDKN2A [34]. Identificou-se também que maior número de cópias da protease inativadora de *TNFAIP3* e *MALT1* promove ativação da via do NFkB [138]

Estudos de PEG concluíram que o LPSNC é uma entidade heterogênea, com espectro de ABC associada à ativação da via NFkB e GCB. [41,53]. A expressão de BCL2 não relacionada à t(14;18)(q32;q21) é frequente [13,37]. Há evidência de hipermutação somática, rearranjos e mutações de genes de Ig e preservação de sitios *open reading frame* sugestivas de passagem pelo centro germinativo, assim como presença de morfologia do tipo centroblástica e ausência de correlação com EBV [14,37,39]. Assim como o LDGCB sistêmico, o LPSNC pode apresentar translocações envolvendo o gene *BCL6*, deleções 6q, hipermutação somática em proto-oncogenes, tais como *MYC* e *PAX5,* e inativação do *CDKN2A*. Porém, diferentemente do linfoma sistêmico, o PEG demonstrou que o LPSNC é caracterizado por expressão gênica de genes relacionados à adesão à matriz extracelular, como *MUM1, CXCL13* e *CHI3L1*. Hipermutação somática de segmentos do gene da cadeia pesada de Ig ($IgV_H$) sugere presença de proliferação celular dependente de antígeno. Consequentemente a patogênese tumoral depende da ativação de células B circulantes de maneira dependente de antígenos, as quais migram e colonizam o SNC devido à expressão de genes relacionados à adesão celular e à matriz extracelular. Contudo, os mecanismos responsáveis pelo tropismo pelo SNC ainda não são conhecidos [54,131,139].

Outros genes possivelmente associados à patogênese do LPSNC incluem *JAK-1* e kinase PIM [132]. PIM1 parece cooperar com MYC na linfomagênese, sendo frequentemente hipermutado no LPSNC [124]. A ativação do PIM kinases, das vias PI3K/mTOR e de JAK/STAT favorecem a sobrevida celular. Podem estar hiper-reguladas tanto em nível transcricional como

proteico no LPSNC [24,132].

### 2.5.1 Genes selecionados para o estudo

#### 2.5.1.1 *Gene MYC (Fator de Transcrição bHNH)*

O gene *MYC*, conhecido como Fator de Transcrição bHLH, está localizado no cromossomo 8q24,21. A proteína codificada por esse gene atua como proto-oncogene. Trata-se de uma fosfoproteína nuclear com função na proliferação celular, apoptose, crescimento celular, atividade da telomerase, metabolismo energético por meio da biogênese ribossomal e diferenciação celular, conhecido como padrão de assinatura do MYC [27,35,140,141]. A proteína MYC forma um heterodímero com o fator de transcrição MAX, o qual se liga a uma sequência *E box* de DNA, regulando a transcrição de vários genes. Sua hiperexpressão está associada a vários tipos tumorais. A t(8;14)(q24;q32) promove a fusão do gene *MYC* e a porção promotora do gene da IgVh está associada ao linfoma de Burkitt [140,142].

Rearranjos envolvendo o gene *MYC* ocorrem em 10%-15% dos LDGCB sistêmicos, estando associados a pior prognóstico independentemente do tipo do gene parceiro envolvido [143,144]. Rubenstein demostrou maior expressão mRNA MYC em LPSNC comparado com LNHDGCB sistêmico através de PEG e RT-PCR [145]. A ativação da via NFkB pode de forma alternativa desregular a expressão do *MYC* [146,147].

A expressão de *MYC* é desregulada em tumores por diversos mecanismos, como translocação cromossômica, mutações, reprogramação epigenética, aumento de estabilidade proteica e translação aumentada, entre outros [148-150]. Mutações hipersomáticas aberrantes do proto-oncogene *MYC* também têm sido observadas em estudos de expressão gênica com LPSNC[34,131]. PIM1, que interage com o MYC na linfomagênese, também é frequentemente identificado como um alvo de hipermutação somática aberrante no LPSNC, o que demonstra possível papel da ativação do MYC no LPSNC [138]. Hiperregulação de microRNAs (miRNAs) associados com a via do MYC também foi demonstrada em LPSNC [123].

No estudo CALCG 50202, evidenciou-se hiperexpressão de *MYC, PIM-1* e genes induzidos por IL-4, como *XBP1* em LPSNC [23]. Superregulação dos microRNAs miR-17-5-p, miR-20a, miR-9 que estão associados à hiperexpressão de *MYC* também foi encontrada no LPSNC [151].

Num estudo com 75 pacientes LPSNC HIV negativos, a prevalência de del(6)(q22) e de translocação dos genes *BCL6, IGH* e *MYC* foi de 45%, 17%, 13% e 3%, respectivamente. A presença de del(6)(q22) e/ou translocação de *BCL6* foi associada à pior SG (p=0,0097), independentemente de acometimento cerebral profundo ou uso de HD-MTX [69].

2.5.1.2 *Gene BCL2 (B-cell lymphoma 2)*

*BCL2* é um gene localizado no cromossoma 18q21,33 que codifica uma proteína antiapoptótica de mesmo nome. Encontra-se expresso na maioria dos tecidos, mas não no CG, onde sua transcrição é suprimida pelo gene *BCL6* [35]. A translocação de *BCL2* para o *lócus* da IgVh na t(14;18) produz ativação constitucional de *BCL2*, favorecendo a formação de clones de linfócitos de longa sobrevida suscetíveis a defeitos moleculares adicionais. Esta anormalidade favorece a tumorigênese no linfoma folicular principalmente quando associado à desregulação do *MYC* [35,148,152]. A t(14;18) está presente em 10% a 40% do LDGCB [153,154]. A hiperexpressão de *BCL2* está associada a maior número de cópias do 18q21,33 [34]. A proteína codificada usualmente está ausente ou expressa em baixos níveis no CG dos folículos secundários [9,155].

Em linfócitos B de murinos com mutação MYD88 L265P, observa-se ativação da via NFkB e hiperproliferação celular. Entretanto, a expressão de *BCL2* é necessária para sustentar a sinalização dependente do MYD88 L265P[156,157].

Na era pré-rituximabe, a hiperexpressão do gene *BCL2* foi associada a pior prognóstico no LDGCB sistêmico [154,158]. Na era pós-rituximabe, sua hiperexpressão deixou de ter impacto prognóstico na SG no LDGCB [159-161]. O rituximabe melhorou a SLP em pacientes BCL2-positivos (56% versus 25%, p=0,0001) e BCL2 negativos (59% versus 33%, p=0,02). Rituximabe também melhorou a SG nos pacientes BCL2 positivos (56% versus 42%, p=0,01) e

BCL2 negativos (58% versus 52%, p=06) [159]. Este imunoterápico induz apoptose por diversas vias de sinalização intracelular, incluindo a via do gene *BCL2* e do *B-cell lymphoma extra large* (BCL-xL). Também induz regulação reacional de IL-10 e fosforilação da via do transdutor de sinal de ativador de transcrição 3 (STAT3). Em outro estudo, a hiperexpressão de BCL2 não foi associada à pior SG, independente da célula de origem [160,162].

2.5.1.3 *Gene LMO2 (LIM domain only 2)*

O gene LIM domínio único 2, conhecido como Rombotina 2 ou *Transparent Testa Glabra* está localizado no cromossomo 11p13 [163]. Codifica uma proteína rica em cisteína altamente conservada, com dois domínios-LIM, e um domínio curto amino-terminal com atividade de transativação e de transcrição; com papel crucial na hematopoese, estando geralmente hiperconservado [148] [164]. Está expressa normalmente em células do centro germinativo, nas células precursoras hematopoiéticas e atuam no desenvolvimento do timo e na angiogênese [163,165,166]. Apresenta papel importante na leucemia linfoblástica T, sendo encontrada em tumores derivados de células do CG como LF, e LDGCB. Pode auxiliar na diferenciação entre LF e outros linfomas de células B pequenas [164] e de tumores sólidos, como câncer de próstata [167].

LMO2 regula a expressão gênica pela formação de complexos ligantes no DNA, como LDB1, E2A, HEB, Lyl1, ETO2, and SP1. Sua hiperexpressão em LDGCB sistêmico está associada ao maior número de centrômeros, podendo levar à separação cromossômica incorreta, contribuindo para a oncogênese. Além disso, pode interferir na expressão de transcriptoma composto de 311 genes de modo a contribuir para a hiperexpressão ou hipoexpressão de outros genes específicos [28]. Em LDGCB, a ausência de expressão do LMO2 está associada à presença de translocações do MYC [168].

O anticorpo anti-LMO2 foi validado para avaliar expressão do *LMO2* por IHQ. Num estudo, a expressão de LMO2 foi observada nos CG normais. No LDGCB se correlacionou com a expressão de marcadores de CG (BCL6 e CD10) e a ausência de expressão de marcadores não-CG (MUM1/IRF4 ou

BCL2) [169]. A LMO2 é uma proteína nuclear e seu ponto de corte de positividade à IHQ é de 30% [164]. Numa análise retrospectiva com 49 pacientes LPSNC, foi observada expressão proteica de LMO2, HGAL e BCL6 em 52%, 65% e 56% dos casos. A expressão de LMO2 foi associada à melhor SLP (25 x 8 meses, p=0,071) e SG (34 x 11 meses, p=0,027), e a expressão de *BCL6,* à maior SG (39 x 13 meses, p=0,055) e SLP (24 x 8 meses, p=0,006) [170].

2.5.1.4 *Gene MGMT (O-6-methilguanine-DNA-methyltransferase)*

O gene *MGMT,* localizado no cromossomo 10q26.3, codifica uma proteína reparadora de DNA envolvida na defesa celular contra mutagênese e toxicidade contra agentes alquilantes. A proteína catalisa a transferência de grupos metil da posição O-6-alquilguanina e outras metilações do DNA para sua própria molécula, reparando rupturas do DNA [171]. Em ratos *knocked-out* p53, não há transcrição desta proteína, o que sugere sua expressão dependente de p53 [172].

A proteína MGMT é uma enzima reparadora de DNA que protege a célula de agentes alquilantes ao remover grupos alkyl da posição $O^6$ da guanina [173]. Sua ausência à IHQ, utilizando ponto de corte de 5% a 15%, foi correlacionada com metilação da região promotora do gene *MGMT* [174,175]. Esta hipermetilação mostrou-se um biomarcador de bom prognóstico em LDGCB e glioblastoma multiforme e câncer de mama tratados com agentes alquilantes[29,176].

Num estudo com 24 pacientes com LPSNC, a metilação do *MGMT* e a ausência de expressão proteica estavam presentes em 54% dos casos, sendo que a metilação de *MGMT* tinha alta correlação com a perda de expressão proteica (ponto de corte da IHQ: 10%) possivelmente devido à maior homogeneidade celular do LPSNC (coeficiente de correlação= -0,49; Teste Exato de Fischer: p<0,01). Neste estudo, a hipermetilação da região promotora parece estar associada à maior taxa de SG e ocorre principalmente em pacientes maiores que 60 anos de idade [29].

2.5.1.5 *Gene POU2F1 (POU class 2 homeobox 1)*

O gene *POU2F1*, conhecido como OCT1 e localizado no cromossomo 1q24,2, codifica uma proteína com função de fator de transcrição da superfamília POU. Além de membro de proteínas transmembrana superfamília carreadora de solutos, é responsável pelo transporte e captação de nutrientes, metabólitos, drogas e toxinas. Os membros desta superfamília contêm uma região de 160 aminoácidos pela qual se ligam ao DNA em outra região específica com sequência de oito bases nitrogenadas ATGCAAAT [177,178]. Esse gene atua na diferenciação e proliferação das células B, e a hiperexpressão de OCT1 está associada à maior sobrevida celular em linfomas com t(14, 18) [176]. A expressão de *OCT1* está elevada em linhagem celular de linfoma e aumentou a suscetibilidade tumoral aos agentes quimioterápicos irinotecano e paclitaxel, possivelmente por facilitar o transporte dos antineoplásicos do meio extracelular para o meio intracelular [30]. Porém, estudos com tumores com linhagem epitelial demonstraram que a hiperexpressão de OCT1 se associou a pior prognóstico [179].

POU2F1 é necessário para transformação oncogênica e promoção de linfoma em modelos de ratos *knocked-out* para Tp53 [180]. A ablação de POU2F1 está associada com metabolismo oxidativo, elevação de expressão de ROS, aumento de sensibilidade a estresse oxidativo e genotóxico e diminuição de iniciação tumoral em modelos xenográficos [180].

2.5.1.6 *Gene PDCD1 (Programmed cell death-1)*

O gene *PDCD1*, conhecido como *PD1* e localizado no cromossomo 2q37.3, codifica uma proteína de superfície de membrana celular da superfamília das Ig [181]. Outros membros da família CD28 incluem o antígeno associado a linfócito citotóxico T (CTLA-4) e coestimulador induzível ICOS com papel na resposta celular imune. *PD1* é pouco expresso em células B [182,183]. Sua proteína geralmente é expressa em células do CG e atua como um ponto de checagem em linfócitos e na diferenciação celular. Hiperexpressão de PD1 foi considerada fator de prognóstico positivo em pacientes com LF [184]. O gene

é expresso em célula pró-B com papel na diferenciação celular, bem como em várias células imunes, como células T [75,148].

Foi identificado ganho do número de cópias do 9p24,1/*PD-L1/PD-L2* em pacientes com LPSNC, com concomitante hiperexpressão das proteinas PD-L1/PD-L2 [34]. Esta hiperexpressão funciona como mecanismo de escape das células neoplásicas do sistema imune, sendo um possível alvo terapêutico [34]. Num estudo com 24 pacientes, 13% (3/24) apresentaram translocação envolvendo o *PD-1* [34,185].

Alteração do número de cópias de *PD-L1* e *PD-L2* está associada a aumento de expressão de PD-L1 e PD-L2 no LPSNC. Estas proteínas interagem com o receptor PD1 presente nas células T, ativando a sinalização celular via PD1. Em consequência, há diminuição da ativação do receptor da célula T (TCR), proliferação e sobrevida de fatores de transcrição, o que causa redução da resposta imune antitumoral [34].

A presença de TIL com imunoexpressão de PDCD1 está diretamente relacionada à imunoexpressão de PDL1 na célula tumoral em vários tumores, inclusive LPSNC [75,186]. A hiperregulação de PDCD1 é consequência de exaustão imune e é um marcador de célula T disfuncional, o que facilita a tumorigênese [75]. A hipexpressão de PDL1 é considerada um marcador de alta resposta imune antitumoral, sendo consequência à infiltração tumoral de células T. [187]. O bloqueio da via mediada pelo PDCD1 leva à reversão do fenótipo da *exhausted T-cell* e à normalização da resposta antitumoral, sendo um racional para o tratamento com imunoterapia contra o câncer [188-190].

No LPSNC, o ganho do número de cópias do 9p24.1/*PDL1/PDL2* está associado ao aumento da expressão proteica do PDL1/PDL2, atuando como um mecanismo de escape imune. Isso sugere que drogas anti-PDCD1 poderiam ter um papel no tratamento [34]. A imunoexpressão de PDCD1 está associada à pior SG [75].

#### 2.5.1.7 *Gene BCL6 (B-cell lymphoma 6)*

O gene *BCL6,* localizado no cromossomo 3q27,3, codifica uma proteína fator transcrição *zinc finger* com um domínio N-terminal POZ. Esse gene atua

como um repressor de transcrição de sequência específica e modula a transcrição de células B IL4 dependente de STAT. O domínio POZ interage com outras proteínas, causando repressão tumoral. No LDGCB o gene BCL6 pode estar translocado e hipermutado o que favorece a tumorigênese [191]. Em 30 pacientes com LPSNC e grupo controle LDGCB sistêmico estudados, a expressão de BCL6 foi maior em indivíduos com LPSNC quando comparados com LDGCB sistêmico COO ABC (p=0,02). Isso sugere a importância do BCL6 no LPSNC [192].

O gene *BCL6* cofidica uma proteína repressora de transcrição de sequência específica, formando um complexo com diferentes corepressores e com histona. Assim, reprime-se a transcrição de diferentes genes alvos por meio de sua ligação direta com o DNA ou indiretamente com repressão de atividade transcricional [148 192].

Encontra-se usualmente expresso em centroblastos, na maioria dos centrócitos e em células T CD4+ do CG. Por outro lado, encontra-se inativado durante a diferenciação de centrócito para células B de memória ou plasmócitos [193,194].

O gene *BCL6* inibe o gene supressor do ciclo celular p21, inibidor da quinase dependente de ciclina, bem como o programa antiapoptótico ao suprimir a expressão de BCL2. Atua na resposta ao dano do DNA quando da regulação dos genes *p53, ATR* e *CHEK1* e impede a ativação prematura de centroblastos ao inibir os genes ativadores de linfócitos B *CD69, STAT1* (transdutor de sinal e ativador de transcrição 1) e *CD80* [35,194]. A desregulação de *BCL6* pode provocar o bloqueio da diferenciação de células pós-CG e determinar o acúmulo de células hipermutadas, o que facilita a tumorigênese[195].

A proteína repressora *transcripcional zinc-finger* é necessária para formação de CG. Sua correlação com prognóstico é contraditória em alguns estudos [41,170]. Sua hiperexpressão está associada à melhor SG em pacientes tratados com CHOP-símile [196].

Alterações cromossômicas envolvendo o gene *PRDM1* são relativamente comuns (23% a 37%), levando a bloqueio da diferenciação de células pós-CG e acúmulo de células hipermutadas, o que contribui para a

linfomagênese. A maioria das translocações envolvendo *BCL6* no LPSNC envolvem parceiros distintos do gene da Ig, ao contrário do observado no LDGCB sistêmico [69]. Segundo Winter *et al*. [197], pacientes sem expressão de BCL6 por IHQ beneficiam-se mais da adição de rituximabe à quimioterapia (SG 42% x 76%, CHOP x R-CHOP) do que pacientes BCL6 positivo (SG 73% x 74%, CHOP x R-CHOP), provavelmente devido à supressão da via NFkB pelo rituximabe [197]. O estudo CALGB 50202 também correlacionou hiperexpressão de BCL6 à IHQ com pior SG [23]. Estudos retrospectivos, porém, correlacionaram hiperexpressão BCL6 com melhor SG [41,198].

## 2.6 Justificativa

O aumento de incidência do LPSNC, associado à alta morbi-mortalidade, justifica a maior necessidade de pesquisas clínicas e moleculares, a fim de buscar melhores opções terapêuticas e de qualidade de vida.

Trata-se de um estudo de coorte retrospectiva unicêntrico. Seu desenho foi selecionado por tratar-se de uma doença rara, objetivando a maior obtenção possível de dados clínicos e material histopatológico confiáveis. Trata-se do maior estudo disponível, por meio do qual se descrevem as características clínico-epidemiológicas de LPSNC na população brasileira, e o único que avalia expressão gênica e correlação prognóstica.

É importante a realização de pesquisas genéticas em diferentes etnias e populações. A população brasileira é considerada um modelo para estudos genéticos e fenotípicos em mistura étnicorracial e pode apresentar características genotípicas distintas de populações não miscigenadas, bem como biomarcadores distintos [199]. Estudos evidenciam diferentes expressões gênicas entre diferentes populações com mesmo tipo tumoral. Num estudo retrospectivo em LPSNC, análise de genética de DNA e RNA através de *Next Generation Sequencing,* foi realizada em 18 pacientes hispânicos e 11 pacientes brancos. Nele, evidenciou-se que a população hispânica teria frequentemente mais de 3 mutações comparada à população branca (89% x 55%, p=0.03), porém sem correlação prognóstica, com SG 2 anos de 60% e 36%, respectivamente (p=0.23) [133]. Tais dados sugerem heterogeneidade nas

mutações encontradas no LPSNC, podendo ser relacionadas à etnicidade. Num estudo com o uso do banco de dados do SEER, foi evidenciada uma diferença de incidência entre as populações idosas negra e branca, sendo maior nesta última [48].

Estudos unicêntricos são valiosos por gerarem hipóteses que podem servir de base para estudos multicêntricos e com maior população. Eles têm como vantagens menor custo, maior facilidade na coleta de dados, uma população menos heterogênea com menos fatores confundidores. No entanto, a principal desvantagem é a limitação na validação dos dados em outras populações [200].

Estudos retrospectivos permitem analisar múltiplos desfechos por um longo período, com a identificação de fatores de risco e suas associações, sendo geralmente conduzidos em doenças raras. As principais desvantagens são a ausência de uniformidade de dados entre os indivíduos, a presença de fatores confundidores que levam à dificuldade na avaliação temporal entre os fatores analisados e o desfecho observado, além da causalidade entre eles [201].

# 3 OBJETIVOS

## 3.1 Objetivo primário

Avaliar o impacto da expressão dos genes *MYC, BCL2, LMO2, MGMT, POU2F1, PDCD1* e *BCL6* em pacientes com LPSNC e suas correlações com os desfechos de SLP e SG em pacientes tratados no Serviço de Hematologia do HC-FMUSP e Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), Brasil.

## 3.2 Objetivos secundários

a) Descrever as características clínicas epidemiológicas destes pacientes de um grande centro universitário brasileiro, informação atualmente indisponível na literatura médica nacional, com objetivo de melhorar o conhecimento e a caracterização destas neoplasias em população de área geográfica adstrita.
b) Avaliar o impacto prognóstico da expressão das proteínas MYC, BCL2, LMO2, MGMT, POU2F1 e PDCD1, mensuradas semiquantitativamente por técnica de IHQ, em portadores de LPSNC, para os desfechos de SG, SLP e SLD.
c) Avaliar a correlação da expressão molecular de RNA (RT-qPCR) e a expressão proteica por meio da reação de IHQ.

## 4 CASUÍSTICAS E METODOS

O projeto foi submetido ao CAPPesq por meio da Plataforma Brasil, CAAE 48989315.0.0000.0068; Número do Parecer: 1.266.854; aprovado em 07 de outubro de 2015 e anuência do ICESP sob Registro: NP597/2015. Somente após a aprovação, foi iniciado o projeto de pesquisa. Relatórios parciais sobre o andamento do projeto foram entregues semestralmente à CAPPesq por meio da Plataforma Brasil.

A Tabela 3 descreve os custos do projeto, referentes aos itens de consumo de material básico de imuno-histoquímica, PCR e kits necessários para a realização de ensaios propostos. O custo estimado foi de R$39.040,00. O projeto foi custeado pelo Serviço de Hematologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com verbas provenientes dos projetos de pesquisa clínica patrocinada do grupo de linfoma não-Hodgkin. Os ensaios clínicos foram realizados no Laboratório de Imunopatologia, atualmente vinculado ao LIM31.

**Tabela 3 -** Orçamento detalhado

| **Material** | **Valor Total** |
|---|---|
| Anticorpos para IHQ | R$16.500,00 |
| Serviços gerais de cortes e laboratório de IHQ e lâminas salinizadas | R$2.500,00 |
| Kit extração RecoverALL Total Nucleic Acid Isolation- Ambion | R$3.040,00 |
| Kit Rneasy FFPE- Qiagen | R$3.000,00 |
| Kit cDNA applied high capacity | R$3.500,00 |
| Sonda TaqMan (5 sequências) | R$5.000,00 |
| PCR MasterMix | R$2.500,00 |
| Placa | R$1.000,00 |
| Selante | R$2.000,00 |
| TOTAL | R$39.040,00 |

## 4.1 Pacientes selecionados

Devido à raridade do LPSNC, optou-se pela pesquisa de todos os pacientes cujos materiais anátomo-patológicos estivessem disponíveis nos arquivos do HC-FMUSP e no ICESP. Apenas biópsias realizadas a partir de 01/01/1995 encontravam-se disponíveis. Foi gerada uma primeira lista de pacientes cujos diagnósticos relatavam histopatologia “linfoma” e região anatômica “acometimento em sistema nervoso central”, diagnosticados entre 01/01/1995 e 31/12/2016, para posterior confirmação de diagnóstico de LPSNC e análise dos critérios de inclusão para este estudo. O ponto de corte de coleta de dados estabelecido foi 01/12/2017 para garantir um período de seguimento mínimo de aproximadamente 12 meses e objetivar análise de SG, com base em artigos que avaliavam mortalidade de 35% neste período [19].

Trata-se de um estudo de coorte unicêntrico retrospectivo. Estudos unicêntricos são valiosos por gerarem hipóteses que podem servir de base para estudos multicêntricos e com maior população. Eles têm como vantagens menor custo, maior facilidade na coleta de dados, uma população menos heterogênea com menos fatores confundidores. No entanto, a principal desvantagem é a limitação na validação dos dados em outras populações [200].

Estudos retrospectivos permitem analisar múltiplos desfechos por um longo período com a identificação de fatores de risco e suas associações, sendo geralmente conduzidos em doenças raras. As principais desvantagens são a ausência de uniformidade de dados entre os indivíduos, a presença de fatores confundidores – o que leva à dificuldade na avaliação temporal entre os fatores analisados e o desfecho observado – e a causalidade entre eles [201].

Uma lista inicial destes pacientes foi obtida pelos Serviços de Hematologia do HC-FMUSP e do ICESP, bem como pelos Serviços de Anatomia Patológica do HC-FMUSP e do ICESP.

### 4.1.1 Critérios de inclusão

- Idade ao diagnóstico maior ou igual a 18 anos e
- LPSNC com histopatologia LNHDGCB CD20+, a qual foi revista e

confirmada prospectivamente por hematopatologista do Departamento de Patologia da FMUSP.

### 4.1.2 Critérios de exclusão

- Imunodeficiências congênitas ou adquiridas (por exemplo: infecção por HIV, pós transplante de órgão);
- Linfoma primário ocular;
- Envolvimento secundário em SNC de linfoma sistêmico;
- Sorologia positiva para o vírus HIV (com ou sem Síndrome da Imunodeficiência Adquirida);
- Desenvolvimento de outro subtipo de linfoma até a data de censura;
- História prévia ou concorrente de linfoma de células B indolente;
- Indisponibilidade de amostra tecidual;
- Prontuário médico não recuperado e
- Laudo histopatológico divergente entre o diagnóstico retrospectivo e a nova análise histopatológica retrospectiva.

Os dados clínico-epidemiológicos, laboratoriais e de imagem foram obtidos a partir da análise de prontuários médicos manuais ou informatizados, nos quais se destacaram variáveis clínicas e demográficas, como: data de nascimento; sexo; raça; data de diagnóstico; número de linhas de tratamento; datas de início e de término de tratamento; tipos de tratamento oncológico realizados; tipo de resposta clínica ao tratamento; data de obtenção de remissão, progressão e recidiva; data de óbito e da última avaliação clínica; situação atual do linfoma na data de censura; IPI modificado, estádio clínico ao diagnóstico, presença de sinais e sintomas de hipertensão intracraniana, alteração de comportamento, alteração de memória, déficit neurológico focal, localização do tumor, PS na primeira consulta no Serviço de Hematologia; PS após término de cada linha de tratamento. Dados laboratoriais histopatológicos, padrão de infiltração perivascular, proteinorraquia e glicorraquia, outros marcadores no CSF, sorologia para HIV e EBV, exames de imagem de TC e RMN, bioquímica geral e hematológica também foram coletados quando disponíveis.

Foi feito contato telefônico com pacientes e/ou familiares em casos de perda de seguimento para identificar a situação atualizada do paciente. Em pacientes cujo contato telefônico não foi possível, realizou-se prospecção ativa no site da Receita Federal pelo número do Cadastro de Pessoa Física (CPF), permitindo-se avaliar se o paciente estava registrado como vivo até o ano fiscal anterior ao da pesquisa. Quando disponível, a *causa mortis* foi coletada. A coleta dos dados clínicos foi realizada até 01 de dezembro de 2017 (data de censura de coleta).

## 4.2 Diagnóstico anatomopatológico

O diagnóstico de LPSNC foi obtido por biópsia incisional estereotáxica ou aberta do tecido acometido. O produto da biópsia foi analisado por coloração de hematoxilina-eosina (H&E) e IHQ para pesquisar os antígenos linfoides B (CD20, CD22 ou CD79a), T (CD3) e Ki67 no Serviços de Anatomia Patológica do HC/ICESP-FMUSP. Nos casos em que o paciente foi submetido a mais de um procedimento diagnóstico, foi considerada apenas a biópsia mais representativa da lesão em estudo.

As lâminas disponíveis dos casos inicialmente selecionados foram disponibilizadas para revisão central realizada por hematopatologista no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Caso necessário, lâminas extras foram confeccionadas para auxiliar no diagnóstico conforme orientações da hematopatologista.

Os critérios da OMS foram utilizados para confirmação histopatológica. As células neoplásicas foram positivas para os marcadores da linhagem B (CD20, CD22 ou CD79a) [5,36,52]. Pacientes com indisponibilidade amostral ou com diagnóstico final discordante do original foram excluídos.

Em algumas amostras, foi realizado no momento do diagnóstico inicial painel de IHQ para Linfoma B e Linfomas T, sendo analisado também IHQ anti-CD3 nas células tumorais e linfócitos reacionais infiltrativos (TIL). TIL foi analisado em campo de pequeno a médio aumento com atenção para os vasos que circundavam o tumor e para as células tumorais. A expressão de CD3 foi

analisada como variável categórica como 0% ou ≥1%.

Não foram realizadas novas reações de IHQ anti-CD3 por carência de material histopatológico.

## 4.3 Estadiamento

História e exame físico fazem parte da rotina do serviço de hematologia, assim como avaliação laboratorial com hemograma completo, contagem de reticulócitos, bioquímica, função renal, avaliação hepática, dosagem sérica de ácido úrico, DHL, β2 microglobulina, sorologia para HIV, hepatite B e C. A presença de sintomas B foi definida mediante perda de peso superior a 10% do peso corpóreo basal em período inferior a seis meses e/ou febre persistente acima de 38ºC sem caracterização de infecção e/ou sudorese noturna recorrente [202].

Os pacientes eram estadiados de acordo com a época de entrada no serviço com TC ou ressonância nuclear magnética de crânio. Para excluir doença sistêmica, realizaram-se TCs de pescoço, tórax, abdômen e pelve além de biópsia de medula óssea. Punção lombar com análise bioquímica e morfológica incluindo citologia oncótica, proteinorraquia, glicorraquia e citometria de fluxo também foram realizadas. Os dados foram coletados conforme sua disponibilidade e registrados numa tabela de coleta de dados, sendo posteriormente categorizados.

## 4.4 Tratamento

Os pacientes incluídos no estudo receberam intenção curativa com protocolo Abrey, constituído por indução com cinco ciclos de HD-MTX 3,5 g/m$^2$, procarbazine 100 mg/m$^2$/d e vincristine 1.4 mg/m$^2$ endovenoso, [203]. Ocorreram algumas variações conforme o ano de tratamento ou condições clínicas dos pacientes. O metotrexate foi administrado por via endovenosa em 3 horas, com ciclos de 21 dias. Não foi realizado ajuste da dose do metotrexate de acordo com o clearence de creatinina. Hidratação, resgate com leucovorina e prescrição de G-CSF profilático foram realizados de acordo com as rotinas do

serviço presentes à época. Pacientes que obtiveram RC receberam regime de consolidação com WBRT (30 a 40Gy em até 20 frações) ou 2 ciclos de 28 dias com citarabina em altas doses (2 g/m$^2$/12 horas D1 até D4). Pacientes com RP receberam até mais 2 ciclos de tratamento de indução conforme descrito previamente. Pacientes com doença estável ou PD foram submetidas a WBRT.

Em 2018, uma nova rotina foi discutida no Serviço de Hematologia, incluindo tratamento com Anti-CD20 (rituximab), ainda a ser implementada.

## 4.5 Avaliação de resposta

Até o ano de 2005, as definições de RC, RP, PD e DE eram estabelecidas de acordo com a interpretação do médico assistente ou radiologista. Imagens anteriores a 2005 não estavam mais disponíveis, o que impediu a reavaliação de forma retrospectiva. Os dados foram coletados conforme registrados no prontuário dos pacientes à época e dos laudos radiológicos disponíveis.

A partir de 2005, adotaram-se critérios de resposta clínica para LPSNC conforme diretriz publicada [51]. A resposta terapêutica foi determinada por critérios clínicos e imagenológicos avaliados por TC, RNM, assim como punção lombar, avaliação oftalmológica, se disponíveis. Tais dados foram coletados conforme o prontuário e laudos radiológicos disponíveis.

## 4.6 Seguimento dos pacientes

Os pacientes foram acompanhados após término do tratamento com história e exame físico, exames laboratoriais e de imagem 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 anualmente a partir do quinto ano de remissão.

## 4.7 Reações de IHQ

Todas as lâminas disponíveis e as reações de IHQ previamente realizadas pelos pacientes no Departamento de Patologia da FMUSP e HC FMUSP foram recuperadas e analisadas novamente no Departamento de Patologia da FMUSP. Para inclusão no estudo, todos os pacientes precisavam ter suas lâminas/biópsias novamente avaliadas, confirmando o diagnóstico de LPSNC, independentemente do laudo inicial. Novas lâminas e colorações poderiam ser realizadas a partir das biópsias para se poder confirmar o diagnóstico de LPSNC, caso necessário.

Reações de IHQ para as proteínas de interesse foram realizadas conforme descritos nesta Seção 4.7.2 . A padronização da técnica encontra-se no Quadro 3.

### 4.7.1 Obtenção das amostras

Os blocos correspondentes às biópsias dos pacientes foram procurados nos dos blocários do HC-FMUSP e do ICESP. Pacientes sem biópsia/bloco disponível para a realização das técnicas de IHQ e moleculares foram excluídos do estudo.

As biópsias tinham sido fixadas em formalina e incluídas em parafina. Os blocos selecionados correspondiam às lâminas utilizadas para confirmar o diagnóstico anatomopatológico de LPSNC. Todos os pacientes com diagnóstico revisto e confirmado de LPSNC com critério de inclusão foram selecionados para reações de IHQ adicionais para pesquisa das proteínas MYC, BCL2, OCT1, MGM1, LMO2 e PD1. As reações foram realizadas em cortes de 3-4 µ dos blocos de parafina no Laboratório de IHQ do Departamento de Patologia da FMUSP. Devido à escassez de material, os primeiros cortes obtidos foram separados para extração de RNA e o restante, para a IHQ. Portanto, alguns pacientes não tiveram material suficiente para realizar todas as reações de IHQ das proteínas de interesse.

As técnicas descritas da reação de IHQ encontram-se na seção 4.7.2 , conforme a rotina do Departamento de Patologia da FM-USP. Não foram

realizadas reações de IHQ para BCL6 devido à escassez do material e porque a pesquisa de expressão gênica do *BCL6* foi adicionada posteriormente ao estudo.

### 4.7.2 Técnica da reação de IHQ

A IHQ foi realizada pela técnica convencional para material fixado em formol e incluído em parafina para as proteínas relacionadas aos genes em estudo (MYC, BCL2, POU2F1, MGMT, LMO2 e PDCD1).

Utilizaram-se os Ac monoclonais anti-c-MYC (clone Y69, Abcam, Cambridge, Massachussets, EUA), anti-BCL2 (clone 124, Cell Marque, Rocklin, California, EUA), anti-LMO2 (clone SP51, Cell Marque, Rocklin, California, EUA), anti-MGMT (clone MT3,1, Abcam, Cambridge, Massachussets, EUA), anti-OCT-1 (clone AB151, Abcam, Cambridge, Massachussets, EUA) e anti-PDCD1 (clone NAT105, Abcam, Cambridge, Massachussets, EUA).

As reações de IHQ foram padronizadas por meio de diluições seriadas dos anticorpos primários e diferentes pH antes do processamento das amostras dos pacientes. Controles positivos e negativos (omissão do anticorpo primário) foram realizados para todas as amostras. O resultado da padronização encontra-se no Quadro 3.

Os cortes de biópsia de Sistema Nervoso Central de 3-4 µm de espessura foram dispostos em lâminas salinizadas (Sigma Chemical Co, St. Louis, Missouri, EUA) em suporte adequado. O processo de desparafinação foi feito por exposição das lâminas ao xilol aquecido em estufa à temperatura de 60-65ºC por 5 minutos com subsequentes lavagens rápidas em três banhos de xilol frio.

Para hidratação, as lâminas foram colocadas em dois banhos de álcool absoluto, um banho de álcool a 95ºC e outro de álcool a 70ºC. Em seguida, foram lavadas em água corrente, em água deionizada e deixadas em tampão fosfato pH 7,4. A recuperação dos sítios antigênicos foi realizada em alta temperatura em Tris-EDTA pH9. O bloqueio da peroxidase endógena das hemácias foi realizado com peróxido de hidrogênio 10v (3%). Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, água destilada e deixadas em

tampão tris-fosfato pH 7.4 (TBS). Os anticorpos foram utilizados nas concentrações conforme Quadro 3. As lâminas foram incubadas *overnight* a 4ºC em câmara úmida. Posteriormente foram incubadas com o anticorpo secundário Polímero Novolink (Leica Biosystems Newcastle, UK) por 30 minutos em estufa a 37 graus. Foi utilizado o cromógeno Diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha). Posteriormente efetuou-se a contracoloração com Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha).

As lâminas foram analisadas em microscópio convencional. A leitura das lâminas foi feita estimando-se 200 células por campo quando possível, em um total de vinte campos de 40x. Foi utilizada análise semiquantitativa por dois observadores distintos, estabelecendo-se valor de consenso para cada caso. A análise semiquantitativa foi padronizada em escala de percentual de células atípicas, positivas para as proteínas interesse em intervalos de 25% (0%-totalmente ausência-, 1 a 25%, 26% a 50%, 51% a 75%, 76% a 100%).

| **Ac Monoclonais** | **Diluição final e pH*** | **Tecido** | **Marca** | **Código** |
|---|---|---|---|---|
| MYC (rabbit Clone Y69) | 1:100 pH9 | Linfoma de Burkitt | Abcam | ab 32072 |
| BCL2 (clone 124) | 1:100 pH9 | Amígdala | Cell Marque | 226M-96 |
| LMO2 (rabbit clone SP51) | 1:50 pH9 | Amígdala | Cell Marque | 370R-16 |
| MGMT (clone MT3.1) | 1:400 pH9 | Amígdala | Abcam | ab 39253 |
| POU2F1 (rabbit Clone AB151) | 1:200 pH9 | Amígdala | Abcam | ab 15112 |
| PDCD1 (clone NAT 105) | 1:100 pH9 | Amígdala | Abcam | ab 52587 |

*do tampão de recuperação antigênica

**Quadro 3 -** Padronização dos marcadores de IHQ utilizados

## 4.8 Método molecular

### 4.8.1 Obtenção das amostras

Para este estudo, foram realizados cortes de 5 µM de espessura em micrótomos manuais disponibilizados em tubos de 1,7 mL. As lâminas do micrômetro foram higienizadas com RNAse para evitar contaminação entre os pacientes e os cortes foram realizados no Departamento de Patologia da FMUSP. A extração de RNA foi realizada em até uma semana após obtenção dos cortes.

### 4.8.2 Extração de RNA de amostras fixadas em formol e incluídas em parafina

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.

A cada tubo de 1.7 ml contendo cortes 5 µm, foi adicionado 1,5 ml do reagente xilol a 100% para a desparafinização. Os tubos foram agitados em vórtex vigorosamente por 10 segundos, incubados a 37ºC por dez minutos e centrifugados durante dois minutos a 20.000 x g em temperatura ambiente, para obtenção de botão celular.

Posteriormente, removeu-se o sobrenadante por pipetagem cuidadosa, para não remover do botão celular. Em seguida, as células foram lavadas com 1,5 ml de etanol a 100%, nova agitação em vórtex por 10 segundos, novamente centrifugação a 20.000 x g por dois minutos, em temperatura ambiente e posterior remoção do sobrenadante. Após repetição do procedimento, as células foram incubadas por dez minutos à temperatura ambiente até evaporar totalmente o etanol residual.

Em seguida, as células foram ressuspensas em 150 µL de tampão PKD® (Qiagen) adicionados 10 µL de proteinase K. A amostra foi incubada a 55ºC por quinze minutos e, após isso, a 80ºC por mais quinze minutos. Adicionaram-se 320 µL do tampão RBC (*Red Blood Cell Lysis Buffer*), para otimização de lise de hemácias numa suspensão celular única com efeito mínimo nos leucócitos.

O lisado foi homogeneizado e transferido para coluna eliminadora de gDNA e centrifugado por trinta segundos, a 8000 x g. Em seguida, descartou-se a coluna, adicionaram-se 720 µL de etanol a 100% e transferiram-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. Em seguida, adicionaram-se 500 µL do tampão RPE® (Qiagen) à coluna *MinElute ENeasy*, fechando-se delicadamente a tampa. Procedeu-se à centrifugação por quinze segundos a 8.000 x g, descartando-se o líquido. Adicionaram-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, descartando-se o líquido. Em seguida, transferiu-se a coluna *MinElute ENeasy* para novo tubo coletor de 2 ml, o qual foi centrifugado com a tampa aberta por cinco minutos, à velocidade de 20.000 x g.

Então foi descartado o tubo coletor, transferindo-se a coluna *MinElute Eneasy* para outro tubo, agora de 1,7 ml. Adicionaram-se 30 µL de água livre de RNase à coluna, centrifugando-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 -20ºC até o momento do uso.

A concentração de RNA de cada amostra foi determinada no equipamento *NanoDrop Spectrophotometer ND-1000*, e sua integridade foi analisada no *RNA Nano Chip 2100 Bioanalyzer,* da Agilent.

### 4.8.3 Preparação do cDNA

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de 1,0 µg do RNA total. A preparação foi realizada conforme orientações do fabricante *Thermo Fisher* para o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.* O cDNA foi obtido da reação contendo 1µg de RNA total, 0,8 µL de 25X dNTP Mix (100 mM), 2,0 µL de RT Buffer (10 X tampão de reação), 2 µL de RT Randon Primers (10X), 1 µL *MultiScribe Reverse Transcriptase* (transcriptase reversa) e $H_2O$ tratada com dietilpirocarbonato (DPEC), com a obtenção do volume final de 20 µL. As amostras foram submetidas às temperaturas de 25ºC por dez minutos, 37ºC por 120 minutos e 85ºC por cinco minutos no termociclador *Veriti*

*Thermo Cycler* da *Thermo Fisher* para obtenção do cDNA. Em seguida, foram adicionados 180 µL de $H_2O$ tratada com DPEC.

### 4.8.4 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

A RT-qPCR foi realizada para os genes *MYC* (Hs 202453, ref.158378085), *BCL2* (Hs 0060823, ref. 158378081), *LMO2* (Hs 00277106, ref. 158378089), *MGMT* (Hs 501522, ref. 158378073), *POU2F1* (Hs 283402, ref. 158378077), *PDCD1* (Hs 158297, ref. 158378093) e *BCL6* (Hs 478588, ref. 19673829) – todos da *IDT technologies* (Coralville, Iowa, EUA). Como controle endógeno, foram utilizados os genes *GUSB* (*Catalog number*: 4310888E), *GAPDH* (*Catalog number*: 4352934E) e *RPLPO* (*Catalog number*: 4326314E) da *Applied Biosystems* (Foster City, CA, EUA). Foi utilizado o *TaqMan Universal PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA) e sua análise foi 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]). O Ct é o ponto de referência no qual a elevação do sinal fluorescente corresponde ao crescimento exponencial dos produtos da PCR[204]. As curvas de eficiência e quantificação gênica foram obtidas a partir de diluições seriadas.

A quantificação relativa baseou-se na construção de curva padrão a partir de quantidades conhecidas do cDNA do gene de interesse, diluídos dez vezes em triplicata com objetivo de obter quatros pontos na referida curva, totalizando-se quatro pontos na curva. Esta curva foi feita de cDNA total de um *pool* contendo 5 linfonodos normais [205]. Esta estratégia permitiu obter a quantidade relativa do gene de interesse em cada amostra pela disposição em gráfico contruído, colocando-se no eixo y o número de ciclos necessários para amplificação e, no eixo x, a quantidade correspondente de cDNA na curva padrão. A água sempre foi utilizada como controle negativo.

Ao final, os valores relativos de expressão gênica *BCL2, MYC, LMO2, MGMT, POU2F1, PDCD1* e *BCL6* foram normatizados em relação ao mRNA do gene endógeno *GUSB, GADPH* e *RPLPO*. O gene *GUSB* foi selecionado para

normatização por ser o mais discriminativo das amostras.

### 4.8.5 Eficiência gênica avaliada

A eficiência gênica encontra-se na Tabela 4.

**Tabela 4 -** Eficiências gênicas avaliadas

| Genes | R2 | Eficiência (%) |
|---|---|---|
| *MYC* | 0.99 | 98,70% |
| *BCL2* | 0.99 | 94,10% |
| *LMO2* | 0.99 | 96,40% |
| *MGMT* | 0.99 | 95,20% |
| *POU2F1* | 0.99 | 96,80% |
| *PDCD1* | 0.99 | 103,50% |
| *BCL6* | 0.99 | 102,90% |
| *GUSB* | 0.99 | 97,30% |
| *GAPDH* | 0.99 | 95,33% |
| *RPLPO* | 0.99 | 98,25% |

## 4.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram elaboradas por meio do aplicativo *Statistical Package for Social Sciences* – SPSS, versão 11.0 para Windows (Chicago, Il- USA). As variáveis quantitativas podem ser discretas quando determinadas por números inteiros ou contínuas quando representadas por qualquer valor de variação em escala numérica infinita. As variáveis categóricas ou qualitativas não são quantificáveis, mas medidas por meio de sua classificação em categorias, sendo apresentadas como frequências absolutas e porcentagens [206].

Neste estudo, utilizaram-se variáveis quantitativas contínuas (por exemplo, expressão gênica de *MYC, BCL2, LMO2, MGMT, POU2F1, PDCD1 e BCL6)* e variáveis qualitativas categóricas (por exemplo: sexo, raça, entre outras). Variáveis contínuas, como idade inferior a 60 anos e expressão gênica

menor que a mediana ou o ponto de corte estabelecido por Curva de ROC, foram transformadas em categóricas.

A análise univariada para medir associação entre as variáveis categóricas/qualitativas foi realizada pelo Teste Exato de Fischer. O Teste *T-Student* foi utilizado para as comparações entre as variáveis quantitativas e os desfechos selecionados [207,208]. Na análise univariada, foram considerados estatisticamente significantes valores até p ≤0,100, ou seja, com no máximo de 10% de chance de rejeitar a hipótese de igualdade quando ela é verdadeira. Devido ao pequeno tamanho amostral, optou-se por não realizar análise multivariada. Refratariedade, recaída e suas relações estatísticas foram avaliadas apenas na primeira linha de tratamento.

A análise da sobrevida é uma medida frequentemente utilizada para avaliar grupos com neoplasia. As curvas de SG, SLD e SLP foram estimadas pelo Método de Kaplan-Meier. No Método de Kaplan-Meier, os intervalos de tempo não são fixos, mas determinados pelo aparecimento de uma “falha”, e os sobreviventes ao longo do tempo são ajustados pela censura (os casos censurados entram no cálculo da função da probabilidade de sobrevida acumulada até o momento da perda) [209]. O Teste de Log-Rank foi utilizado para comparar as curvas de sobrevida particionadas por variáveis categóricas, porém os testes de Breslow e Tahone-Ware também foram calculados [210]. Estes testes são particularmente importantes quando as curvas não apresentam riscos proporcionais. O teste de Log-Rank tem peso maior no início e no meio de seguimento, o teste de Breslow tem peso maior no início do seguimento e o teste de Tahone-Ware tem peso maior no final do seguimento. Não foi realizada análise multivariada por regressão de Cox devido ao pequeno tamanho amostral [211]. As definições das Curvas de Sobrevida, Refratariedade e Recidiva encontram-se Quadro 4.

| Pontos de interesse | Definição |
|---|---|
| SG | Intervalo entre a data do diagnóstico e a data do último seguimento* (em meses) ou óbito, considerando-se como evento o óbito por qualquer etiologia. Razões para censura incluem: término do seguimento (paciente vivo) ou perda de seguimento. |
| SLD | Intervalo entre a data da RC e a data da recidiva (em meses), último seguimento ou óbito, considerando-se eventos a recidiva. Razões para censura incluem: término do seguimento (paciente vivo e sem progressão de doença) ou perda de seguimento. Esta curva só pôde ser calculada em pacientes que tenham obtido RC na primeira linha de tratamento. |
| SLP | Calculada como o tempo transcorrido entre o diagnóstico e o momento da progressão, recidiva, o último seguimento ou óbito (em meses), considerando-se como eventos PD ou recidiva. Esta curva só pôde ser calculada em pacientes que receberam pelo menos algum tipo de tratamento oncológico. Razões para censura incluem: término do seguimento (paciente vivo e sem progressão de doença) ou perda de seguimento. |
| Refratariedade | Definida como ausência de resposta (completa ou parcial) à primeira linha de tratamento. |
| Recidiva | Definida como PD após uma RC na primeira linha de tratamento. |

*Se a última data de seguimento conforme registro no prontuário foi inferior à data de censura de coleta de dados (01/12/2017), os pacientes tiveram seus status (vivo/morto) confirmados por via telefônica, quando possível, o mais próximo possível da data de censura. [212,213]

**Quadro 4 -** Definições das Curvas de Sobrevida, Refratariedade e Recidiva

Para determinar o melhor ponto de corte de positividade de expressão proteica por IHQ, utilizaram-se estimativa de sensibilidade e especificidade nos pontos de cortes previamente estabelecidos de 0%, 25%, 50%, 75% e 100% por Curvas de ROC (*Receiver Operator Characteristic Curve*) [214,215].

Algumas amostras apresentaram expressão gênica normatizada de valor zero considerando-se até cinco casas decimais, o que correspondeu a ausência absoluta de expressão. Estas amostras tiveram reações de rt-PCR repetidas, confirmando-se os resultados iniciais. Por tratar-se de ausência absoluta de expressão gênica, tornou-se impossível proceder ao cálculo logarítmico, dado que log 0 = menos infinito, para estas amostras. Desta forma,

a categorização da expressão gênica em variável quantitativa levaria à exclusão de várias amostras, diminuindo ainda mais o tamanho amostral, além de excluirem-se pacientes com expressão gênica ausente, o que poderia influenciar na interpretação das associações. Para evitar a exclusão destas amostras nas análises, optou-se por transformar a expressão gênica em variável categórica ao determinar o melhor ponto de corte de positividade da expressão gênica normatizada com o uso de estimativas de sensibilidade e especificidade por Curvas de ROC (*Receiver Operator Characteristic Curve*)[214,215].

Baseado nos pontos de corte estabelecidos obtidos através das Curvas de ROC, foi feito um teste de concordância (correlação) entre a expressão gênica e a expressão proteica (relacionados ao RT-qPCR e IHQ, respectivamente). O Coeficiente de Youden permite avaliar a performance dos testes diagnósticos. Coeficiente de Youden com valor zero corresponde à mesma proporção de testes positivos no grupo controle e no grupo com doença; Coeficiente de Youden com valor de 1 corresponde à ausência de Falsos Positivos e Falsos Negativos. O Coeficiente de Youden, porém, ignora a associação entre a sensibilidade e a especificidade do teste, podendo levar a achados errôneos [216]. O Coeficiente de Kappa é mais frequentemente utilizado e permite avaliar o desempenho dos testes diagnósticos com maior acurácia[217,218]. A classificação subjetiva por Kappa encontra-se na Tabela 5.

**Tabela 5 -** Classificação Subjetiva por Kappa

| **Valor** | **Interpretação da Associação** |
|---|---|
| <0,00 | pobre *(poor)* |
| 0,01 < valor < 0,20 | ligeira *(slight)* |
| 0,21 < valor < 0,40 | fraca *(fair)* |
| 0,41 < valor < 0,60 | moderada *(moderate)* |
| 0,61 < valor < 0,80 | substancial *(substantial)* |
| 0,81 < valor < 1,00 | quase perfeita *(almost perfect)* |
| 1,00 | perfeita *(perfect)* |

# 5 RESULTADOS

## 5.1 Casuística

Entre 01 de janeiro de 1995 e 31 de dezembro de 2016, 51 pacientes tiveram registro de “linfoma com acometimento em SNC” conforme demonstrado na Figura 4. Dois pacientes não tinham blocos teciduais disponíveis. Após a revisão histopatológica, catorze pacientes 14/49 (28,5%) foram excluídos por não apresentarem diagnóstico compatível com LPSNC LNHDGCB CD20+. Trinta e cinco (68,2%) do total de pacientes foram incluídos no estudo.

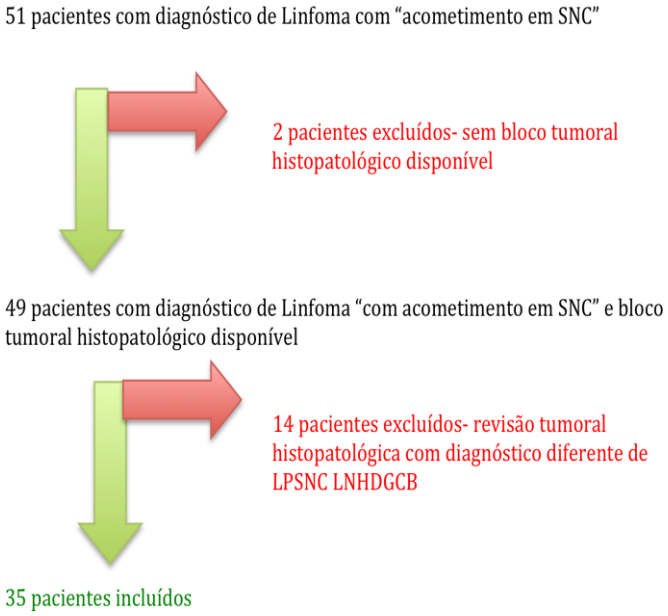



**Figura 4 -** Fluxograma da exclusão

A data de censura de coleta dos dados foi 01 de dezembro de 2017 com mediana de tempo de seguimento de 41 meses (1,1- 171,8). O tempo de seguimento foi calculado entre a data de diagnóstico e a data de óbito (em meses) ou a última data de seguimento (conforme registro em prontuário médico).

A mediana de idade ao diagnóstico foi de 62 anos (26,2-83,9). Vinte e

seis (74,2%) pacientes evoluíram a óbito até a data da censura. A *causa mortis* não se encontrava disponível nos prontuários, portanto não pode ser coletada.

A mediana de tempo de seguimento entre os pacientes vivos foi de 69,4 meses (16,1- 171,8 meses) e dos pacientes que evoluíram a óbito foi de 26,6 meses (1,1- 92,4 meses), conforme demonstrado na Tabela 6.

**Tabela 6 -** Tempos de seguimento

| Variável | Geral (%/n) | Status em 01/12/2017 | |
|---|---|---|---|
| | | Vivo (%/n) | Óbito (%/n) |
| **Número Total de Pacientes** | | | |
| % (n) | 100 (35) | 25,71 (9) | 74,2 (26) |
| **Tempo de Seguimento (meses)** | | | |
| média (dp) | 43,8 ( 39,18 ) | 77,5 ( 50,11 ) | 32,2 ( 27,10 ) |
| 1ºq;mediana;3ºq | 7,7 : 41,0 : 66,3 | 38,1 : 69,4 : 111,3 | 6,2 : 26,6 : 53,7 |
| mín ; máx | 1,1 : 171,8 | 16,1 : 171,8 | 1,1 : 92,4 |
| **Intervalo de Tempo entre Diagnóstico e Óbito (meses)** | | | |
| média (dp) | - | - | 32,2 ( 27,10 ) |
| 1ºq;mediana;3ºq | - | - | 6,2 : 26,6 : 53,7 |
| mín ; máx | - | - | 1,1 : 92,4 |
| **Intervalo de Tempo entre Diagnóstico e Última Consulta (meses)** | | | |
| média (dp) | - | 77,5 ( 50,11 ) | - |
| 1ºq;mediana;3ºq | - | 38,1 : 69,4 : 111,3 | - |
| mín ; máx | - | 16,1 : 171,8 | - |

## 5.2 Características clínico-laboratoriais ao diagnóstico

A mediana de idade ao diagnóstico foi de 62 anos (26,2 a 83,9 anos). A maioria dos pacientes era do sexo feminino (57,1%), apresentava acometimento de regiões profundas de SNC (77,1%), citologia oncótica negativa no LCR (91,4%) e PS inicial 0,1 ou 2 na primeira consulta no Serviço de Hematologia (57,2%). Com relação ao IPI modificado, 20% apresentavam IPI baixo (0+1), 48,6% apresentavam IPI intermediário (2+3) e 31,4%

apresentavam alto risco (4+5). As características clínicas dos pacientes encontram-se na Tabela 7.

As características clínico-laboratoriais por paciente encontram-se no Anexo A.

**Tabela 7 -** Características clínico-laboratoriais dos pacientes selecionados
(continua)

| Variável | Geral (%/n) |
|---|---|
| **Número total de pacientes** | |
| | 100% (35) |
| **Idade ao Diagnóstico (anos)** | |
| média (dp) | 60,1 ( 15,22 ) |
| 1ºq;mediana;3ºq | 49,8 : 62,0 : 72,9 |
| mín ; máx | 26,2 : 83,9 |
| ≤ 60 anos | 45,7% (16) |
| >60 anos | 54,3% (19) |
| **Sexo** | |
| masculino | 42,9% (15) |
| feminino | 57,1% (20) |
| **Acometimento de Regiões Profundas** | |
| não | 22,9% (8) |
| sim | 77,1% (27) |
| **Citologia LCR** | |
| citologia negativa | 91,4% (32) |
| citologia positiva | 5,7% (2) |
| desconhecido | 2,9% (1) |
| **Presença de HIC ao Diagnóstico** | |
| não | 71,4% (25) |
| sim | 28,6% (10) |
| **P.S. Inicial** | |
| 0 | 8,6% (3) |
| 1 | 25,7% (9) |
| 2 | 22,9% (8) |
| 3 | 37,1% (13) |
| 4 | 5,7% (2) |

**Tabela 7 -** Características clínico-laboratoriais dos pacientes selecionados
(conclusão)

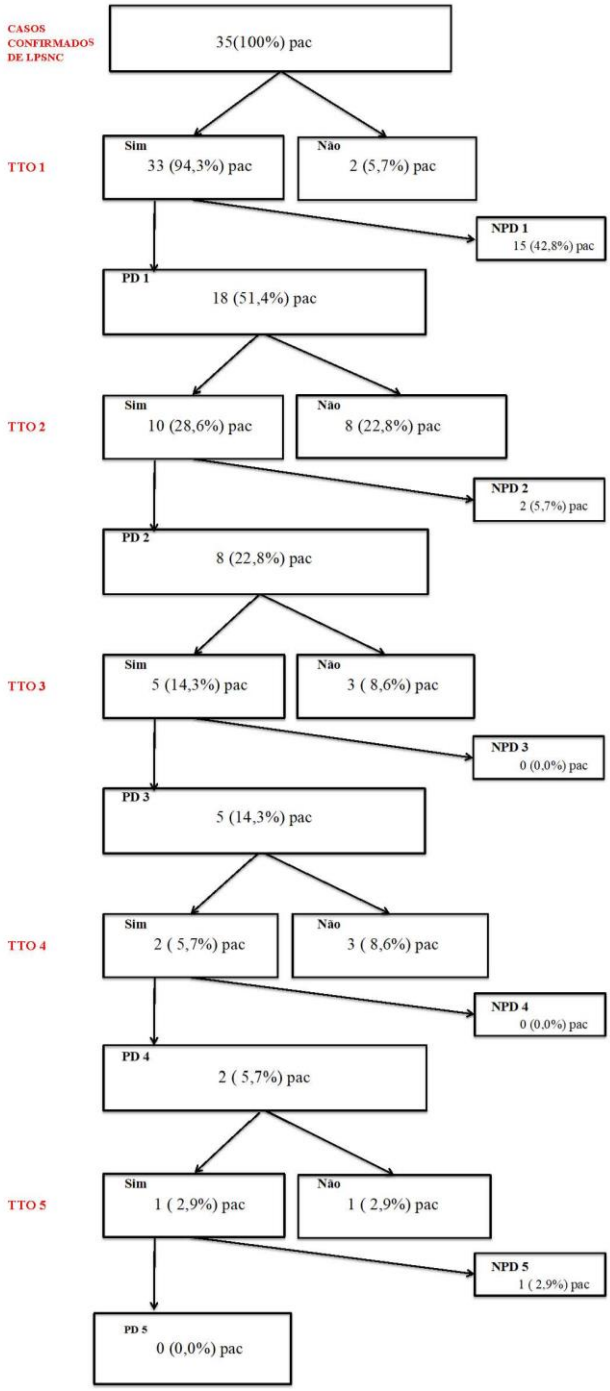
| Variável | Geral (%/n) |
|---|---|
| **Número total de pacientes** | |
| | 100% (35) |
| **RISCO IPI Modificado para LPSNC** | |
| Baixo (0+1) | 20% (7) |
| intermediário (2+3) | 48,6% (17) |
| alto (4+5) | 31,4% (11) |

## 5.3 Tratamentos oncológicos e resposta clínica

Com relação às linhas de tratamento oncológico com intuito curativo, observou-se que (Figura 5):

- 94,3% receberam pelo menos uma linha de tratamento (33/35);
- 28,6% receberam uma segunda linha de tratamento (10/35);
- 14,3% receberam uma terceira linha de tratamento (5/35);
- 5,7% receberam uma quarta linha de tratamento (2/35) e
- 2,9% receberam uma quinta linha de tratamento oncológico (1/35).

A maioria dos pacientes (51,4%;18/35) apresentou PD em algum momento da sua história clínica, porém apenas 28,6% submeteram-se a nova linha de tratamento. As características da primeira e da segunda linha de tratamento oncológico encontram-se nas Seções 5.3.1 e 5.3.2. A maioria dos pacientes (61%;21/35) recebeu radioterapia, em especial como consolidação (76%;16/21) ou terapia única (24%;5/21). Nenhum paciente foi submetido a TMO.




**Legenda**: Pac= Paciente/ / TTO 1= Primeira Linha de Tratamento/ TTO 2= Segunda Linha de Tratamento/ TTO 3= Terceira Linha de Tratamento/ TTO 4 =Quarta Linha de Tratamento/ TTO 5= Quinta Linha de Tratamento PD 1= Primeira Progressão de Doença/ PD 2= Segunda Progressão de Doença/ PD 3= Terceira Progressão de Doença/ PD 4= Quarta Progressão de Doença/ PD 5= Quinta Progressão de Doença / NPD 1= Ausência de Progressão de Doença após a Primeira Linha de Tratamento/ NPD 2= Ausência de Progressão de Doença após a Segunda Linha de Tratamento/ NPD 3= Ausência de Progressão de Doença após a Terceira Linha de Tratamento/ NPD 4= Ausência de Progressão de Doença após a Quarta Linha de Tratamento/ NPD 5= Ausência de Progressão de Doença após a Quinta Linha de Tratamento

**Figura 5 -** Número de linhas de tratamento oncológico

### 5.3.1 Primeira Linha de Tratamento Oncológico com Intuito Curativo

Quase todos os pacientes foram submetidos à primeira linha de tratamento oncológico (94,3%;33/35), sendo a quimioterapia baseada em HD-MTX a opção terapêutica mais utilizada (84%;28/33), seguida de radioterapia isolada (16%;5/33), com mediana de duração de tratamento de 4 meses e taxa de resposta global (TRG) de 72,8%. Dois pacientes não foram submetidos a nenhuma linha de tratamento, pois não tinham condições clínicas. Assim, para estes foi realizado tratamento paliativo. Nenhum paciente recebeu tratamento oncológico com anti-CD20 (rituximab) em primeira linha, pois não estava disponibilizado no Sistema Único de Saúde (SUS).

A maioria dos pacientes obteve RC (45,5%;15/33) à terapia de primeira linha, 27,3% (9/33) obtiveram RP e 27,3% (9/33) apresentaram PD. A taxa de refratariedade foi de 27,3% (9/33) (Tabela 8 e Gráfico 1). Apesar da alta taxa de resposta, a maioria dos pacientes apresentou PD em algum momento após a primeira linha de tratamento (54,5%;18/33). O Anexo B apresenta informações sobre a primeira linha de tratamento oncológico.

**Tabela 8 -** Taxas de resposta global, parcial, completa e refratariedade à primeira linha de tratamento oncológico

| Variável | Número de pacientes | Taxa |
|---|---|---|
| Taxa de Resposta Completa | 15/33 | 45,5% |
| Taxa de Resposta Parcial | 9/33 | 27,3% |
| Taxa de Resposta Global [1] | 24/33 | 72,8% |
| Taxa de Refratariedade [2] | 9/33 | 27,3% |
| Taxa de Recaída após RC | 3/15 | 20% |

(1) corresponde à soma da RP + RC;
(2) corresponde à fração de pacientes submetidos ao tratamento que apresentaram PD ou DE durante ou ao término do tratamento;

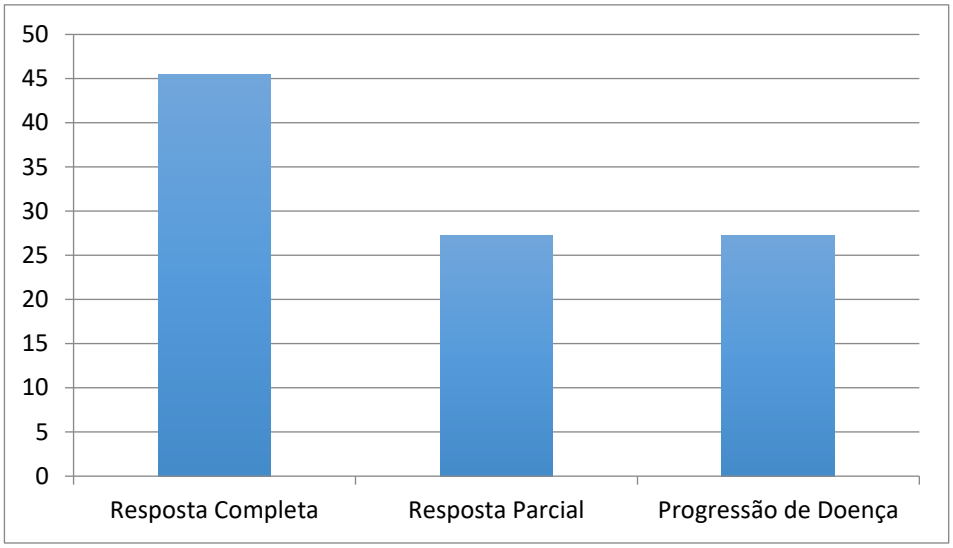



**Gráfico 1 -** Taxas de Resposta à Primeira Linha de Tratamento Oncológico

### 5.3.2 Segunda Linha de Tratamento Oncológico com Intuito Curativo

Dos 18 pacientes que apresentaram PD, a maioria (55,55%;10/18) foi submetida a uma segunda linha de tratamento, com mediana de duração de tratamento de dois meses. Aos pacientes sem condições clínicas de tratamento curativo, foi oferecido tratamento paliativo. Apesar da alta taxa de resposta após término do tratamento (60%;6/10), a maioria dos pacientes evoluiu com PD em algum momento (80%;8/10), conforme Tabela 9.

**Tabela 9 -** Taxas de resposta global, parcial, completa e refratariedade à segunda linha de tratamento oncológico

| Variável | Número de pacientes | Taxa |
|---|---|---|
| Taxa de Resposta Completa | 2/10 | 20,00% |
| Taxa de Resposta Parcial | 4/10 | 40,00% |
| Taxa de Resposta Global | 6/10 | 60,00% |
| Taxa de Refratariedade | 4/10 | 40,00% |

## 5.4 Expressão Proteica

Os resultados obtidos para a pesquisa de expressão proteica por IHQ estão disponibilizados na Tabela 10. A célula de origem (COO) foi classificada de acordo com os critérios de Hans [10]. Apenas 34% (12/35) dos casos puderam ser caracterizados, sendo 75% (9/12) classificados como não-GCB. Anti-CD3 foi realizado em 91,4% (32/35) dos casos, sendo a maioria (87,5%) positivo em linfócitos reacionais infiltrativos. A pesquisa de Ki67 foi realizada em 82,9% (29/35) dos casos e todos apresentaram índice de positividade > 70%. Não foi possível realizar reações de IHQ adicionais devido à escassez do material.

**Tabela 10 -** Descrição das revisões das reações de imuno-histoquímica disponíveis

| Variável | | Geral (%/n) |
|---|---|---|
| **Número Total de Pacientes** | | |
| | | 100% (35) |
| **anti-CD20** | | |
| | negativo | 0% (0) |
| | positivo | 100% (35) |
| **anti-CD3** | | |
| | negativo | 80% (28) |
| | positivo | 11,4% (4) |
| | não avaliado | 8,6% (3) |
| **anti-BCL6** | | |
| | negativo | 22,9% (8) |
| | positivo | 17,1% (6) |
| | não avaliado | 60% (21) |
| **anti-MUM1** | | |
| | negativo | 8,6% (3) |
| | positivo | 25,7% (9) |
| | não avaliado | 65,7% (23) |
| **COO Subtipo** | | |
| | GCB | 11,4% (4) |
| | não -GCB | 31,4% (11) |
| | não avaliado | 57,1% (20) |

Os resultados disponíveis encontram-se na Tabela 11.

A pesquisa da proteína MYC foi realizada em 94,3% (33/35) dos pacientes, dos quais a maioria apresentou valor > 50% (21/33;63,6%). BCL2 foi pesquisado em 91.4% (32/35), com resultado > 50% na maioria dos casos (27/32;84,5%). A proteína LMO2 foi pesquisada em 91,4% (32/35), em cuja maioria resultou não reativa (13/32;40,6%). A proteína MGMT foi realizada em 88,6% (31/35), sendo negativo em todos os casos. A expressão proteica de POU2F1 foi realizada em 94,3% (33/35), com resultado > 75% na maiotia dos casos (30/33;93,9%). A proteína PDCD1 foi pesquisada em 94,3%(33/35), sendo a maioria não reativa (30/33;90,9%).

**Tabela 11 -** Resultados das reações de imuno-histoquímica das proteínas de interesse

| Variável | | Geral (%/n) |
|---|---|---|
| **Número Total de Pacientes** | | |
| | | 100% (35) |
| **anti-MYC** | | |
| | 0%-50% | 34,2% (12) |
| | 51%-100% | 60% (21) |
| | não disponível | 5,8% (2) |
| **anti-BCL2** | | |
| | 0%-50% | 14,2% (5) |
| | 51%-100% | 80% (28) |
| | não disponível | 5,8% (2) |
| **anti-LMO2** | | |
| | 0%-25% | 40% (14) |
| | 26%-100% | 51,4% (18) |
| | não disponível | 8,6% (3) |
| **anti-MGMT** | | |
| | negativo | 88,6% (31) |
| | positivo | 0,0% |
| | não disponível | 11,4% (4) |
| **anti-POU2F1** | | |
| | negativo | 0,0% |
| | positivo | 94,2% (33) |
| | não disponível | 5,8% (2) |
| **anti-PDCD1** | | |
| | negativo | 85,7% (30) |
| | positivo | 8,6% (3) |
| | não disponível | 5,7% (2) |

## 5.5 Expressão Gênica

A expressão absoluta gênica dos genes *MYC, BCL2, LMO2, MGMT, POU2F1, PDCD1* e *BCL6* foi avaliável em, respectivamente, 60%, 60%, 60%, 60%, 65,7%, 60% e 65,7% dos casos (Tabela 12). Os resultados da expressão normatizada dos genes de interesse por paciente encontram-se no Anexo C. Foram realizados testes comparativos para todas as variáveis entre a amostra total (n=35) e a subamostra contendo apenas pacientes com expressão gênica avaliável. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a amostra total e a subamostra (Anexo D).

**Tabela 12 -** Amplificação normatizada dos genes de interesse

(continua)

| Variável | Geral (%/n) |
|---|---|
| **Número Total de Pacientes** | |
| | 100% (35) |
| **GENE *MYC*** | |
| número de amostras amplificadas | 21 |
| média (dp) | 0,201 (0,1778 ) |
| 1ºq;mediana;3ºq | 0,015 : 0,201 : 0,322 |
| mín ; máx | 0,000 : 0,641 |
| <0,201041 (n) | 47,6% (10) |
| ≥0,201041 (n) | 52,4% (11) |
| TOTAL (n) | 100% (21) |
| **GENE *BCL2*** | |
| número de amostras amplificadas | 21 |
| média (dp) | 0,906 (1,2381 ) |
| 1ºq;mediana;3ºq | 0,110 : 0,564 : 1,192 |
| mín ; máx | 0,000 : 5,566 |
| <0,3516 (n) | 38,0% (8) |
| ≥0,3516 (n) | 62,0% (13) |
| TOTAL (n) | 100% (21) |

**Tabela 12** - Amplificação normatizada dos genes de interesse

(continuação)

| Variável | Geral (%/n) |
|---|---|
| **Número Total de Pacientes** | |
| | 100% (35) |
| **GENE *LMO2*** | |
| número de amostras amplificadas | 21 |
| média (dp) | 3,877 (5,0025 ) |
| 1ºq;mediana;3ºq | 0,296 : 1,636 : 6,850 |
| mín ; máx | 0,000 : 17,506 |
| <0,689232 (n) | 33,3% (7) |
| ≥0,689232 (n) | 66,7% (14) |
| TOTAL (n) | 100% (21) |
| **GENE *MGMT*** | |
| número de amostras amplificadas | 21 |
| média (dp) | 0,760 (2,2315 ) |
| 1ºq;mediana;3ºq | 0,000 : 0,000 : 0,277 |
| mín ; máx | 0,000 : 10,072 |
| <0,335666 (n) | 76,2% (16) |
| ≥0,335666 (n) | 23,8% (5) |
| TOTAL (n) | 100% (21) |
| **GENE *POU2F1*** | |
| número de amostras amplificadas | 23 |
| média (dp) | 1,748 (2,0030 ) |
| 1ºq;mediana;3ºq | 0,000 : 1,448 : 2,828 |
| mín ; máx | 0,000 : 6,301 |
| <1,44819 (n) | 47,8% (11) |
| ≥1,44819 (n) | 52,2% (12) |
| TOTAL (n) | 100% (23) |

**Tabela 12** - Amplificação normatizada dos genes de interesse
(conclusão)

| Variável | Geral (%/n) |
|---|---|
| **Número Total de Pacientes** | |
| | 100% (35) |
| **GENE *PDCD1*** | |
| número de amostras amplificadas | 21 |
| média (dp) | 1,324 (2,4693 ) |
| 1ºq;mediana;3ºq | 0,000 : 0,000 : 1,870 |
| mín ; máx | 0,000 : 9,215 |
| <2,00938 (n) | 76,2% (16) |
| ≥2,00938 (n) | 23,8% (5) |
| TOTAL (n) | 100% (21) |
| **GENE *BCL6*** | |
| número de amostras amplificadas | 23 |
| média (dp) | 2,899 (2,6369 ) |
| 1ºq;mediana;3ºq | 0,648 : 2,716 : 3,787 |
| mín ; máx | 0,000 : 9,091 |
| <2,73477 (n) | 47,8% (11) |
| ≥2,73477 (n) | 52,2% (12) |
| TOTAL (n) | 100% (23) |

## 5.6 Construção de Curvas de ROC *(receiver operator characteristic curve*, em inglês)

### 5.6.1 Curvas de ROC para expressão proteica

Os resultados de IHQ para as proteínas de interesse foram quantificadas em quartis. Curvas de ROC puderam ser construídas para as proteínas MYC, BCL2 e LMO2 em relação à SG e à SLP. Para as demais proteínas, não foi possível construir curvas de ROC devido ao excesso de ausência de expressão (MGMT e PD1) ou excesso de positividade (OCT1). Após revisão da literatura para estas proteínas, optou-se por determinar como ponto de corte a ausência ou a presença de expressão. Os pontos de corte selecionados foram aqueles

com maior RV+ e menor RV-, podendo-se então transformar os resultados das IHQ em variáveis categóricas dicotômicas (menor ou maior / igual ao ponto de corte). A Tabela 13 - apresenta os pontos de corte da IHQ utilizados com base na construção das Curvas de ROC, conforme descrito na Seção 4.9. As Curvas de ROC para as proteínas MYC, BCL2 e LMO2 encontram-se, respectivamente, nos Anexos E, F e G.

**Tabela 13 -** Revisão bibliográfica dos pontos de corte da reação de imuno-histoquímica das proteínas de interesse e pontos de corte selecionados neste estudo

| Proteína de interesse | Ponto de corte [1] | Ponto de corte selecionado [2] |
|---|---|---|
| MYC | 50% [219] | **50%** |
| BCL2 | 40% [219]; 50% [220] | **50%** |
| LMO2 | 30% [164] | **25%** |
| MGMT | 5-10% [29,175,221] | **Positivo versus Negativo [4]** |
| POU2F1 | Positivo versus Negativo [3222] | **Positivo versus Negativo [4]** |
| PDCD1 | <1%; 1-10%; 11-25%; 26-50%; 51-75%, ≥76%[223] | **Positivo versus Negativo [4, 5]** |

(1) de acordo com os artigos descritos; (2) de acordo com a metodologia da curva de ROC; (3) presença ou ausência de imunofixação nas células tumorais; (4) >0 versus ≤0; (5) analisado na membrana celular e citoplasma

### 5.6.2 Curvas de ROC para expressão gênica normatizada

Conforme descrito na Seção 4.9, utilizaram-se as curvas de ROC para selecionar pontos de corte da expressão gênica normatizada a fim de transformar esta variável numérica em categórica dicotômica. Desta forma, os pacientes com ausência absoluta de expressão gênica puderam ser incluídos nas análises, pois não existe logaritmo de zero em qualquer base. Curvas de ROC foram construídas para todos os genes normatizados para os desfechos de SG e SLP, sendo selecionados os pontos de corte com maior RV+ e menor

RV (Tabela 14). As curvas de ROC para a expressão gênica normatizada dos genes *MYC, MGMT, PDCD1, BCL2, LMO2, POU2F1* e *BCL6* encontram-se nos Anexos H, I, J, K, L, M e N.

**Tabela 14 -** Pontos de corte da expressão normatizada dos genes de interesse

| Variável | Ponto de Corte | Metodologia |
|---|---|---|
| *MYC* | ≥0,201041 vs <0,201041 | Curva de ROC |
| *BCL2* | ≥0,3516 vs <0,3516 | Curva de ROC |
| *LMO2* | ≥0,689232 vs <0,689232 | Curva de ROC |
| *MGMT* | ≥0,335666 vs <0,335666 | Curva de ROC |
| *POU2F1* | ≥1,44819 vs <1,44819 | Curva de ROC |
| *PDCD1* | ≥2,00938 vs <2,00938 | Curva de ROC |
| *BCL6* | ≥2,73477 vs <2,73477 | Curva de ROC |

## 5.7 Curvas de Sobrevida

Conforme descrito na Tabela 6, a mediana de acompanhamento de toda a coorte foi de 41 meses (mínimo de 1,1 e máximo de 171,8 meses). A mediana do intervalo de tempo entre o diagnóstico e o óbito foi de 26,6 meses (mínimo de 1,1 e máximo de 92,4 meses). Até a data da censura, 26/35 pacientes tinham evoluído a óbito. As construções das curvas de SG, SLP e SLD pelo método de Kaplan-Meier encontram-se no Anexo O.

### 5.7.1 Sobrevida Global

A SG mediana foi de 42,6 meses (IC95% 26,6-58,6 meses). A probabilidade de SG em 24 meses foi 65,5%; a probabilidade de SG em 48 meses foi de 43,8% e a probabilidade de SG em 60 meses foi de 40,4% (Gráfico 2).

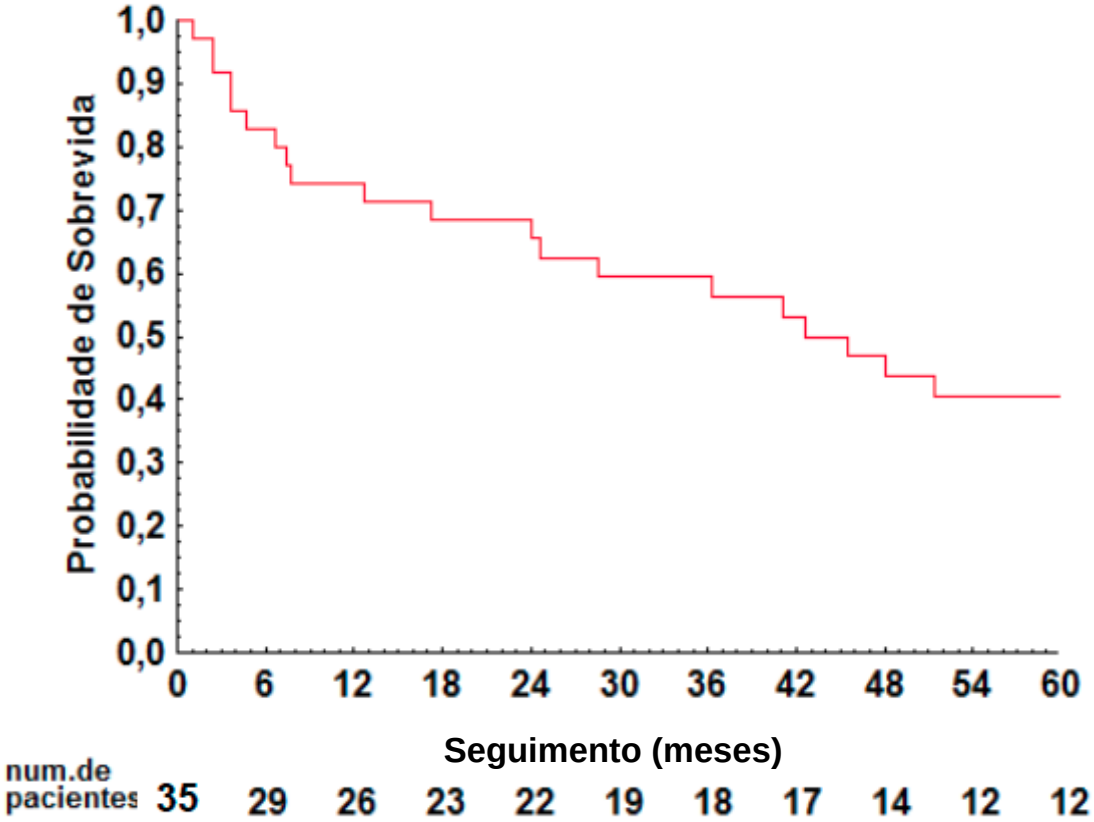



**Gráfico 2 -** Curva de Sobrevida Global nos pacientes com LPSNC

### 5.7.2 Sobrevida Livre de Doença (1ª linha de tratamento)

A SLD mediana foi de 59,2 meses (IC95% 31,9- 86,6 meses). A curva de Kaplan-Meier (Gráfico 3).

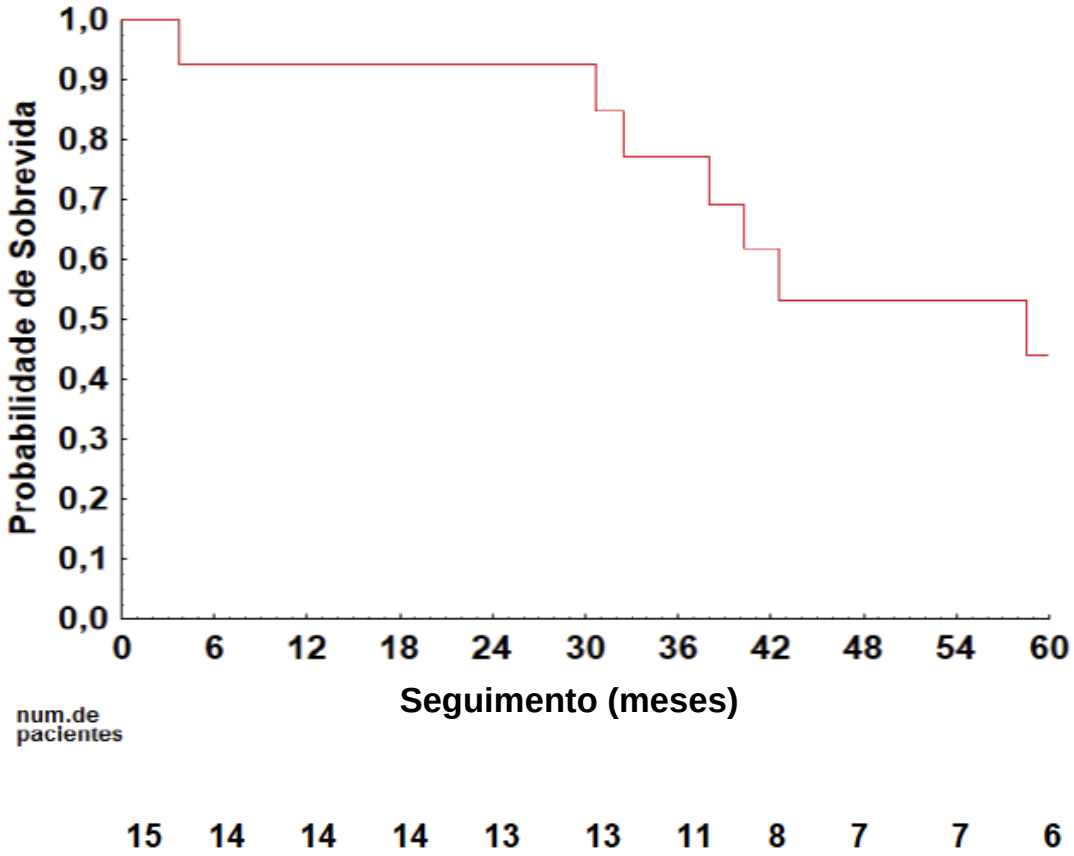



**Gráfico 3 -** Curva de Sobrevida livre de doença nos pacientes com LPSNC

### 5.7.3 Sobrevida Livre de Progressão (1ª linha de tratamento)

A SLP mediana foi de 41 meses (IC95% 19,7-62,4 meses). A probabilidade de SLP em 24 meses foi de 63,6%, a probabilidade de SLP em 48 meses foi de 37,1% e a probabilidade de SLP em 60 meses foi de 25,9% (Gráfico 4).

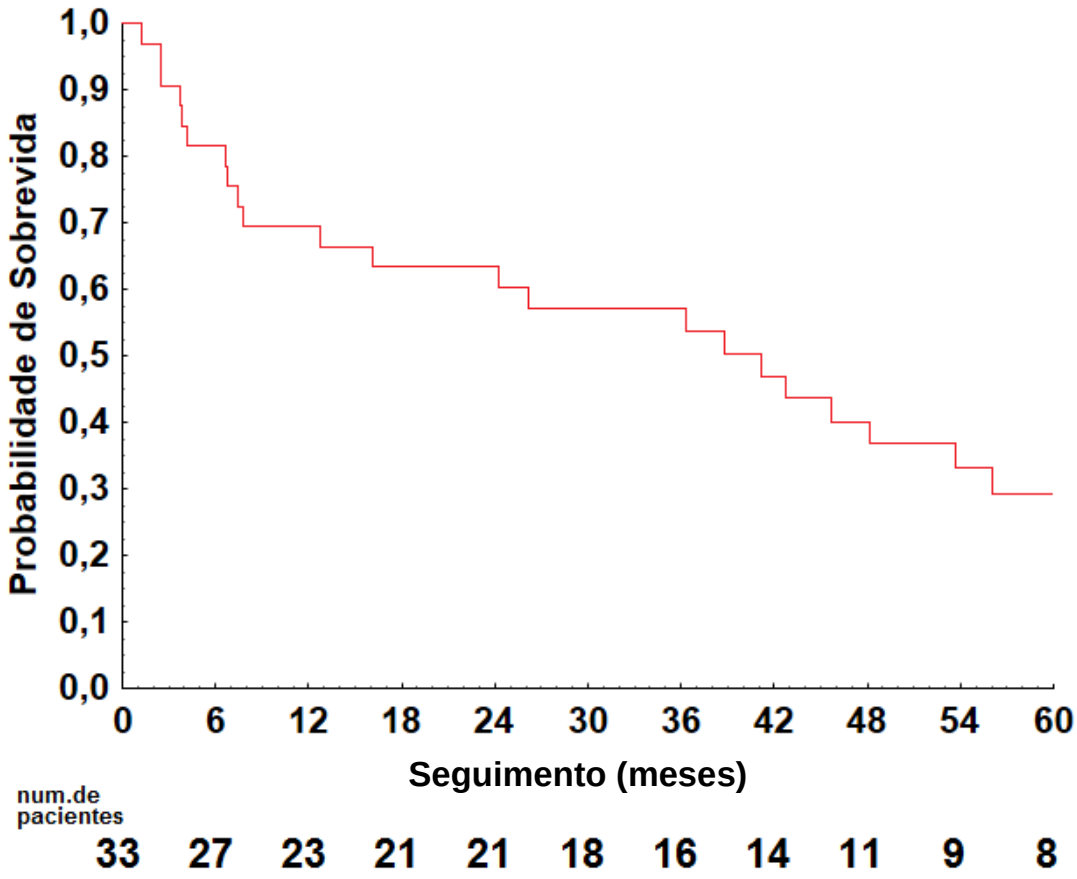



**Gráfico 4 -** Curva de Sobrevida livre de progressão nos pacientes com LPSNC

## 5.8 Fatores de Prognóstico para SG, SG 2 anos, SLD e SLP

### 5.8.1 Análise Univariada para SG e SG em 24 meses

Até a última data de coleta de dados (01/12/2017), 74,3% (26/35) evoluíram a óbito e 25,7% (9/35) estavam vivos. Nove pacientes evoluíram a óbito em até 1 ano após o diagnóstico e 12 pacientes evoluíram a óbito em até 2 anos após o diagnóstico.

Com relação à Sobrevida Global, as variáveis idade >60 anos, IPI modificado ≥2, P.S. ≥3, ausência de tratamento com radioterapia, expressão gênica de *MYC* ≥ 0,201041, BCL2 ≥51%, refratariedade à primeira linha de tratamento e progressão de doença após a primeira linha de tratamento estiveram associadas a pior prognóstico, com diferença estatisticamente significante (p ≤0,1). Os valores de HR, IC95% e valor P (log-rank) encontram-se na Tabela 15.

Com relação à SG em 2 anos, a P.S. ≥3, ausência de tratamento com radioterapia, expressão gênica de *MYC* ≥ 0,201041, LMO2 ≤25%, refratariedade à primeira linha de tratamento e progressão de doença após a primeira linha de tratamento estiveram associadas a pior prognóstico**,** com diferença estatisticamente significante (p ≤0,1). Os valores de HR, IC95% e valor P (log-rank) encontram-se na Tabela 16.

**Tabela 15 -** Análise univariada de Cox para SG

| Variáveis | HR (IC 95%) | valor p** |
|---|---|---|
| Idade (> 60 anos vs≤ 60 anos) | **2,466 (1,091;5,573)** | **0,025** |
| IPI modificado (2+3+4+5 vs 0+1) | **3,564 (1,055;12,036)** | **0,029** |
| P.S. (3+4 vs 0+1+2) | **7,005 (2,671;18,37)** | **<0,001** |
| Radioterapia (Não vs Sim) | **3,413 (1,516;7,683)** | **0,002** |
| COO (não-GCB vs GCB) | 1,877 (0,397;8,882) | 0,417 |
| anti-CD3 (Negativo vs Positivo) | 4,464 (0,6;33,229) | 0,109 |
| anti-MYC (51-100% vs 0-50%) | 1,186 (0,502;2,802) | 0,696 |
| anti-BCL2 (51-100% vs 0-50%) | **3,559 (0,833;15,196)** | **0,067** |
| anti-LMO2 (0-25% vs 26-100%) | 1,67 (0,736;3,793) | 0,215 |
| anti-MGMT (1-100% vs 0%)# | | |
| anti-PDCD1 (1-100% vs 0%) | 0,516 (0,12;2,215) | 0,364 |
| anti-POU2F1 (1-100% vs 0%)* | | |
| gene *MYC* (≥0,201041 vs <0,201041) | **6,117 (1,617;23,149)** | **0,003** |
| gene *BCL2* (≥0,3516 vs <0,3516) | 1,934 (0,652;5,739) | 0,227 |
| gene *LMO2* (<0,689232 vs ≥0,689232) | 2,099 (0,747;5,895) | 0,151 |
| gene *MGMT* (≥0,335666 vs <0,335666) | 1,793 (0,546;5,894) | 0,331 |
| gene *POU2F1* (<1,44819 vs ≥1,44819) | 1,179 (0,453;3,067) | 0,735 |
| gene *PDCD1* (<2,00938 vs ≥2,00938) | 1,539 (0,34;6,965) | 0,573 |
| gene *BCL6* (<2,73477 vs ≥2,73477) | 0,952 (0,356;2,543) | 0,922 |
| Refratariedade (Sim vs Não) | **28,272 (5,823;137,272)** | **<0,001** |
| PD após 1 linha tratamento (Sim vs Não) | **3,248 (1,33;7,932)** | **0,006** |

# Não pode ser calculado, pois todos os pacientes tinham anti-MGMT 0%
* Não pode ser calculado, pois todos os pacientes tinham anti-POU2F1 100%
** em vermelho: valores com diferença estatisticamente significante valor p≤0,05/ em negrito: valores com diferença estatisticamente significante 0,10≥ valor p>0,05
*** *Since coefficients did not converge, no further models will be fitted.*

**Tabela 16 -** Análise univariada de Cox para SG em 2 anos

| Variáveis | HR (IC 95%) | valor p** |
|---|---|---|
| Idade (> 60 anos vs≤ 60 anos) | 2,025 (0,609;6,742) | 0,239 |
| IPI modificado (2+3+4+5 vs 0+1) | 3,388 (0,437;26,273) | 0,214 |
| P.S. (3+4 vs 0+1+2) | **5,851 (1,568;21,83)** | **0,003** |
| Radioterapia (Não vs Sim) | **2,874 (0,908;9,095)** | **0,060** |
| COO (não-GCB vs GCB) | 0,973 (0,196;4,832) | 0,973 |
| anti-CD3 (Negativo vs Positivo) | 1,616 (0,207;12,636) | 0,643 |
| anti-MYC (51-100% vs 0-50%) | 0,473 (0,152;1,478) | 0,187 |
| anti-BCL2 (51-100% vs 0-50%) | 2,087 (0,269;16,182) | 0,470 |
| anti-LMO2 (0-25% vs 26-100%) | **8,131 (1,737;38,068)** | **0,002** |
| anti-MGMT (1-100% vs 0%)# | | |
| anti-PDCD1 (1-100% vs 0%) | 0,877 (0,113;6,803) | 0,900 |
| anti-POU2F1 (1-100% vs 0%)* | | |
| gene *MYC* (≥0,201041 vs <0,201041) | **3,597 (0,723;17,888)** | **0,095** |
| gene *BCL2* (≥0,3516 vs <0,3516 ) | 2,187 (0,44;10,863) | 0,326 |
| gene *LMO2* (<0,689232 vs ≥0,689232) | 2,173 (0,542;8,704) | 0,261 |
| gene *MGMT* (≥0,335666 vs <0,335666 ) | 2,958 (0,689;12,704) | 0,127 |
| gene *POU2F1* (<1,44819 vs ≥1,44819) | 1,528 (0,41;5,7) | 0,523 |
| gene *PDCD1* (<2,00938 vs ≥2,00938) | 2,354 (0,289;19,145) | 0,409 |
| gene *BCL6* (<2,73477 vs ≥2,73477 ) | 1,294 (0,347;4,821) | 0,699 |
| Refratariedade (Sim vs Não) | **20,955 (4,349;100,967)** | **<0,001** |
| PD após 1 linha tratamento (Sim vs Não) | **4,053 (0,859;19,116)** | **0,055** |

# Não pode ser calculado, pois todos os pacientes tinham anti-MGMT 0%

* Não pode ser calculado, pois todos os pacientes tinham anti-POU2F1 100%

** em vermelho: valores com diferença estatisticamente significante valor p≤0,05/ em negrito: valores com diferença estatisticamente significante 0,10≥ valor p>0,05

*** *Since coefficients did not converge, no further models will be fitted.*

### 5.8.2 Análise Univariada para SLD

Até a última data de coleta de dados (01/12/2017), a maioria dos pacientes recebeu algum tipo de primeira linha de tratamento oncológico (94%; 33/35), com taxa de resposta completa de 45,5% (15/33) e de recaída após resposta completa de 20% (2/15). Com relação à SLD, a idade >60 anos, IPI modificado ≥2, P.S. ≥3, ausência de tratamento com radioterapia estiveram associados a pior prognóstico, com diferença estatisticamente significante (p ≤0,1). Os valores de HR, IC95% e valor P (log-rank) encontram-se na Tabela 17.

**Tabela 17 -** Análise univariada de Cox para SLD

(continua)

| **Variáveis** | **HR (IC 95%)** | **valor p**** |
|---|---|---|
| Idade (> 60 anos vs≤ 60 anos) | **3,333 (0,773;14,376)** | **0,088** |
| IPI modificado (2+3+4+5 vs 0+1) | **0,177 (0,021;1,489)** | **0,076** |
| P.S. (3+4 vs 0+1+2) | **10,272 (1,807;58,393)** | **0,002** |
| Radioterapia (Não vs Sim) | **4,126 (0,966;17,623)** | **0,039** |
| COO (não-GCB vs GCB) | * | NA |
| anti-CD3 (Negativo vs Positivo) | 0,894 (0,105;7,573) | 0,918 |
| anti-MYC (51-100% vs 0-50%) | 1,392 (0,279;6,935) | 0,687 |
| anti-BCL2 (51-100% vs 0-50%) | *** | NA |
| anti-LMO2 (0-25% vs 26-100%) | *** | NA |
| anti-MGMT (1-100% vs 0%)# | | |
| anti-PDCD1 (1-100% vs 0%) | *** | NA |
| anti-POU2F1 (1-100% vs 0%)* | | |
| gene *MYC* (≥0,201041 vs <0,201041) | 2,924 (0,26;32,934) | 0,364 |
| gene *BCL2* (≥0,3516 vs <0,3516 ) | 1,423 (0,126;16,043) | 0,774 |
| gene *LMO2* (<0,689232 vs ≥0,689232) | 0,237 (0,021;2,674) | 0,207 |
| gene *MGMT* (≥0,335666 vs <0,335666 ) | *** | NA |
| gene *POU2F1* (<1,44819 vs ≥1,44819) | 1,732 (0,235;12,783) | 0,586 |
| gene *PDCD1* (<2,00938 vs ≥2,00938) | *** | NA |

**Tabela 17 -** Análise univariada de Cox para SLD

(conclusão)

| **Variáveis** | **HR (IC 95%)** | **valor p**** |
|---|---|---|
| gene *BCL6* (<2,73477 vs ≥2,73477 ) | 4,472 (0,279;71,807) | 0,247 |
| Refratariedade (Sim vs Não) | | NA |
| PD após 1 linha tratamento (Sim vs Não) | 2,697 (0,489;14,86) | 0,236 |

# Não pode ser calculado, pois todos os pacientes tinham anti-MGMT 0%

* Não pode ser calculado, pois todos os pacientes tinham anti-POU2F1 100%

** em vermelho: valores com diferença estatisticamente significante valor p≤0,05/ em negrito: valores com diferença estatisticamente significante 0,10≥ valor p>0,05

*** *Since coefficients did not converge, no further models will be fitted.*

### 5.8.3 Análise Univariada para SLP

Até a última data de coleta de dados (01/12/2017), a maioria dos pacientes recebeu algum tipo de primeira linha de tratamento oncológico (94%; 33/35), com taxa de resposta global de 72,7% (24/33), porém a maioria dos pacientes apresentou PD em algum momento após RP ou RC (75%; 18/24).

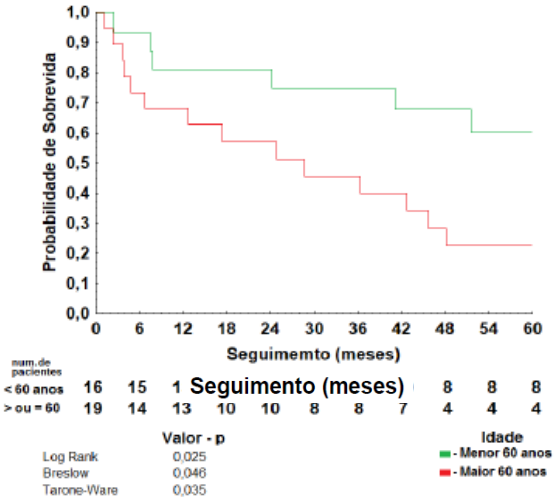
Com relação à SLP, idade >60 anos, IPI modificado ≥2, P.S. ≥3, ausência de tratamento com radioterapia, expressão gênica de *MYC* ≥ 0,201041, BCL2 ≥51%, expressão gênica de *LMO2* <0,689232, expressão gênica de *MGMT* ≥0,335666, refratariedade à primeira linha de tratamento e progressão de doença após a primeira linha de tratamento estiveram associados a pior prognóstico, com diferença estatisticamente significante (p ≤0,1). Os valores de HR, IC95% e valor P (log-rank) encontram-se na Tabela 18.

**Tabela 18 -** Análise univariada de Cox para SLP

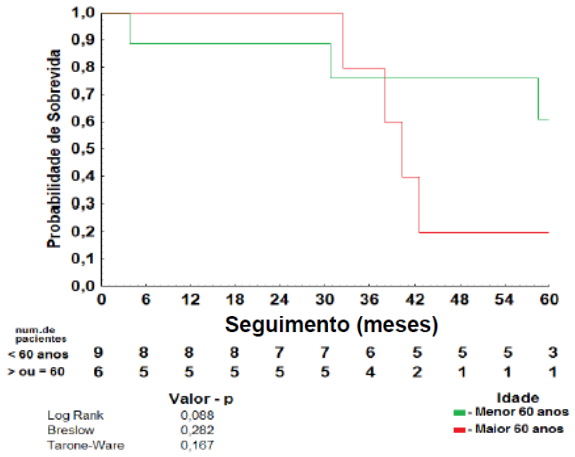
| **Variáveis** | **HR (IC 95%)** | **valor p**** |
|---|---|---|
| Idade (> 60 anos vs ≤ 60 anos) | **2,857 (1,239;6,589)** | **0,010** |
| IPI modificado (2+3+4+5 vs 0+1) | **4,151 (1,193;14,446)** | **0,001** |
| P.S. (3+4 vs 0+1+2) | **3,951 (1,651;9,454)** | **0,001** |
| Radioterapia (Não vs Sim) | **2,281 (1,027;5,067)** | **0,037** |
| COO (não-GCB vs GCB) | 3,225 (0,391;26,588) | 0,248 |
| anti-CD3 (Negativo vs Positivo) | 4,386 (0,588;32,746) | 0,115 |
| anti-MYC (51-100% vs 0-50%) | 1,519 (0,6;3,85) | 0,374 |
| anti-BCL2 (51-100% vs 0-50%) | **3,376 (0,784;14,534)** | **0,083** |
| anti-LMO2 (0-25% vs 26-100%) | 1,677 (0,715;3,935) | 0,229 |
| anti-MGMT (1-100% vs 0%)# | | |
| anti-PDCD1 (1-100% vs 0%) | 0,838 (0,196;3,583) | 0,811 |
| anti-POU2F1 (1-100% vs 0%)* | | |
| gene *MYC* (≥0,201041 vs <0,201041) | **3,96 (1,192;13,147)** | **0,016** |
| gene *BCL2* (≥0,3516 vs <0,3516 ) | 1,98 (0,651;6,021) | 0,221 |
| gene *LMO2* (<0,689232 vs ≥0,689232) | **2,718 (0,87;8,493)** | **0,073** |
| gene *MGMT* (≥0,335666 vs <0,335666) | **3,749 (0,879;15,993)** | **0,056** |
| gene *POU2F1* (<1,44819 vs ≥1,44819) | 0,909 (0,334;2,477) | 0,852 |
| gene *PDCD1* (<2,00938 vs ≥2,00938) | 1,762 (0,389;7,979) | 0,456 |
| gene *BCL6* (<2,73477 vs ≥2,73477) | 0,815 (0,301;2,211) | 0,687 |
| Refratariedade (Sim vs Não) | **75,672 (8,96;638,734)** | **<0,001** |
| PD após 1 linha tratamento (Sim vs Não) | **5,425 (2,094;14,053)** | **<0,001** |

#Não pode ser calculado, pois todos os pacientes tinham anti-MGMT 0%
*Não pode ser calculado, pois todos os pacientes tinham anti-POU2F1 100%
** em vermelho: valores com diferença estatisticamente significante valor p≤0,05/ em negrito: valores com diferença estatisticamente significante 0,10≥ valor p>0,05
*** *Since coefficients did not converge, no further models will be fitted.*

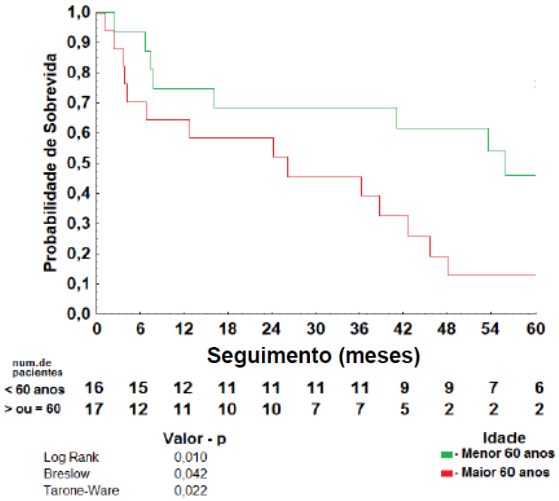
### 5.8.4 Testes de Log-Rank: gráficos por variáveis analisadas




a) Teste de Log-Rank para SG
HR (IC95%)= 2,466 (1,091; 5,573)

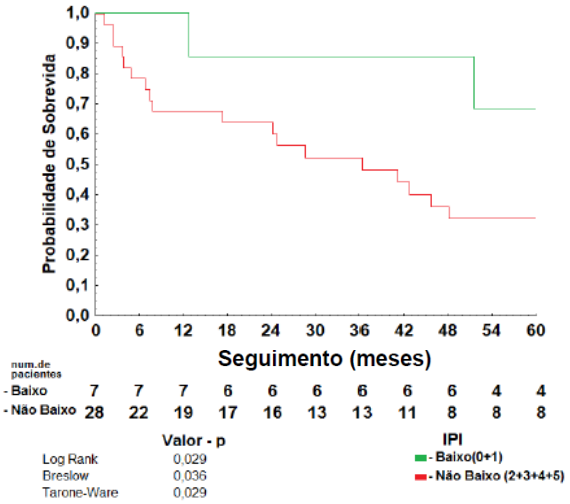



b) Teste de Log-Rank para SLD
HR (IC95%)= 3,33 (0,773; 14,376)

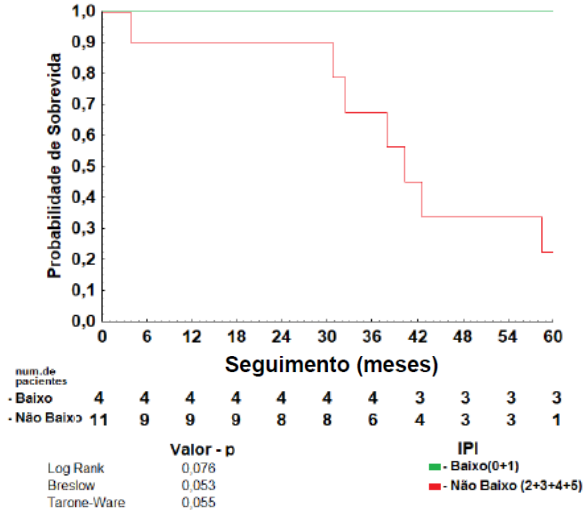



c) Teste de Log-Rank para SLP
HR (IC95%)= 2,857 (1,239; 6,589)

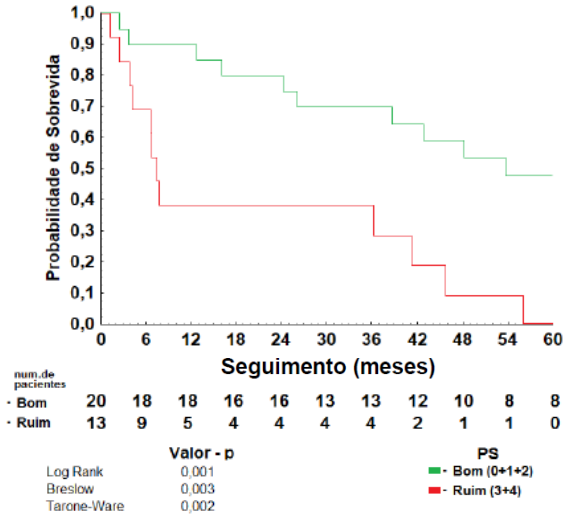
**Gráfico 5 -** Teste de Log-rank – Variável: Idade (> 60 anos vs ≤ 60 anos)




a) Teste de Log-Rank para SG
HR (IC95%)= 3,564 (1,055; 12,036)

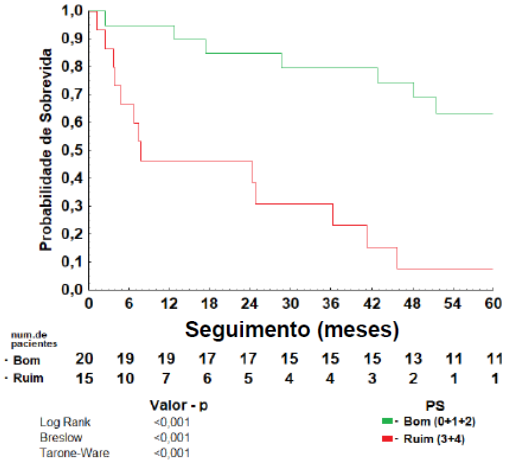



b) Teste de Log-Rank para SLD
HR (IC95%)= 0,177 (0,21; 1,489)

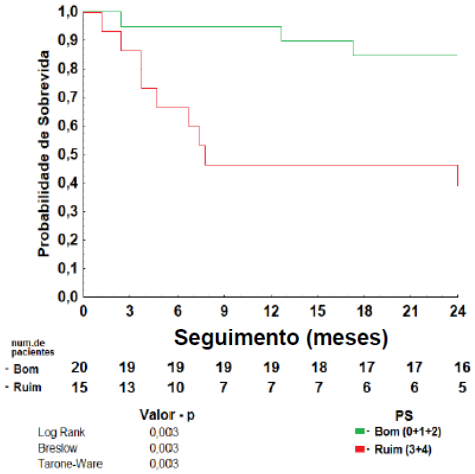



c) Teste de Log-Rank para SLP
HR (IC95%)=4,151 (1,193; 14,446)

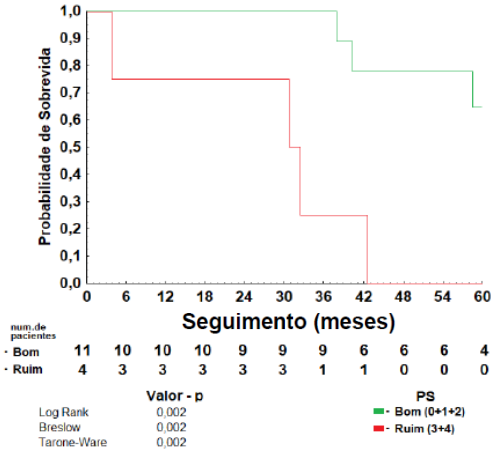
**Gráfico 6 -** Teste de Log-rank – Variável: IPI modificado (2+3+4+5 vs 0+1)



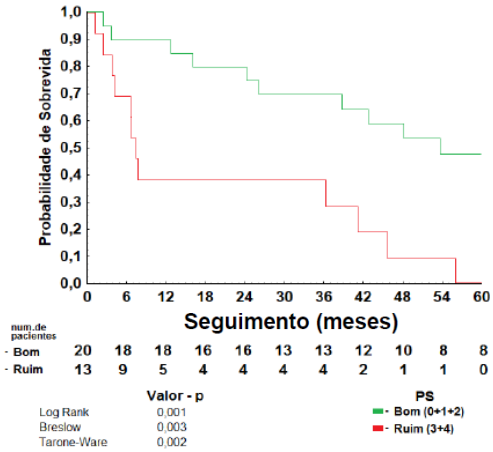

a) Teste de Log-Rank para SG
HR (IC95%)= 7,005 (2,671; 18,37)




b) Teste de Log-Rank para SG 24 meses
HR (IC95%)= 5,851 (1,568; 21,83)

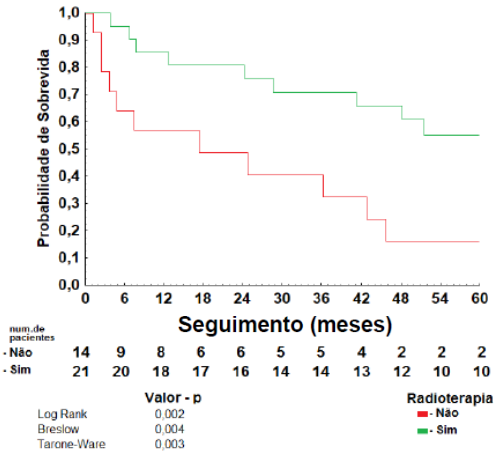



c) Teste de Log-Rank para SLD
HR (IC95%)= 10,272 (1,807; 58,393)

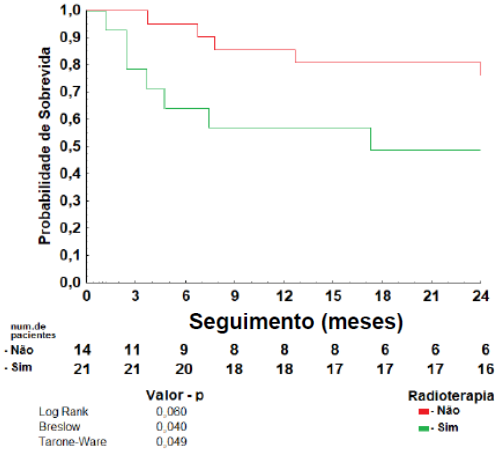



d) Teste de Log-Rank para SLP
HR (IC95%)= 3,951 (1,651; 9,454)

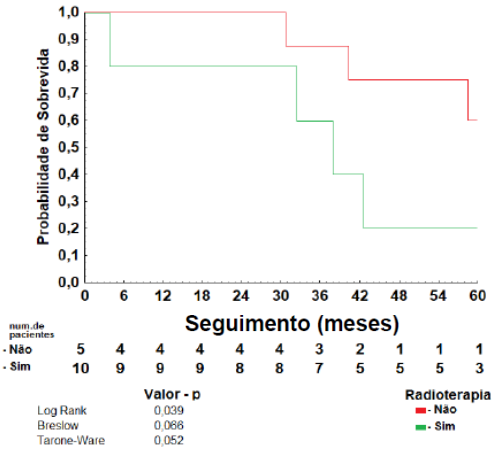
**Gráfico 7 -** Teste de Log-rank – Variável: Performance Status (3+4 vs 0+1+2)



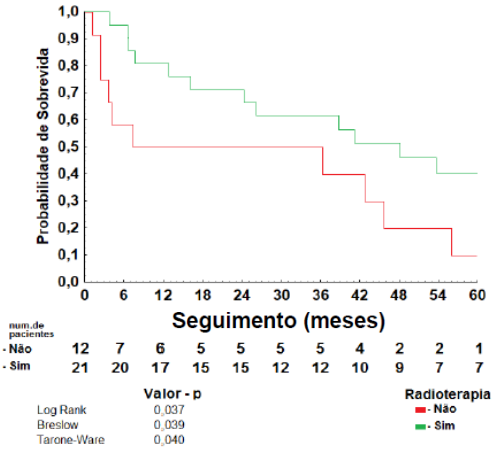

a) Teste de Log-Rank para SG
HR (IC95%)= 3,413 (1,516; 7,683)




b) Teste de Log-Rank para SG 24 meses
HR (IC95%)= 2,874 (0,908; 9,095)

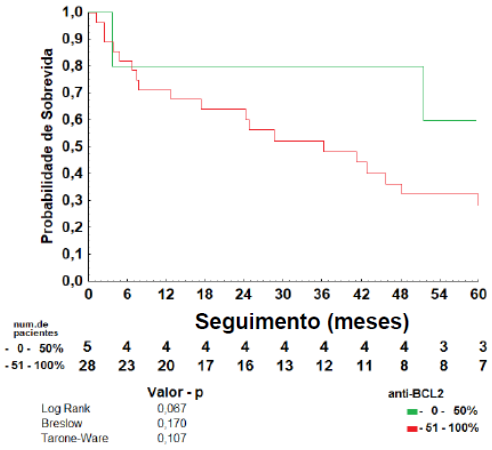



c) Teste de Log-Rank para SLD
HR (IC95%)= 4,126 (0,966; 17,623)

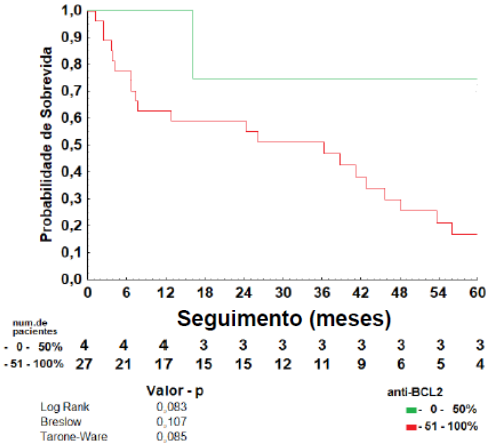



d) Teste de Log-Rank para SLP
HR (IC95%)= 2,281 (1,027; 5,067)

**Gráfico 8 -** Teste de Log-rank – Variável: Radioterapia (Não realizada vs Realizada)

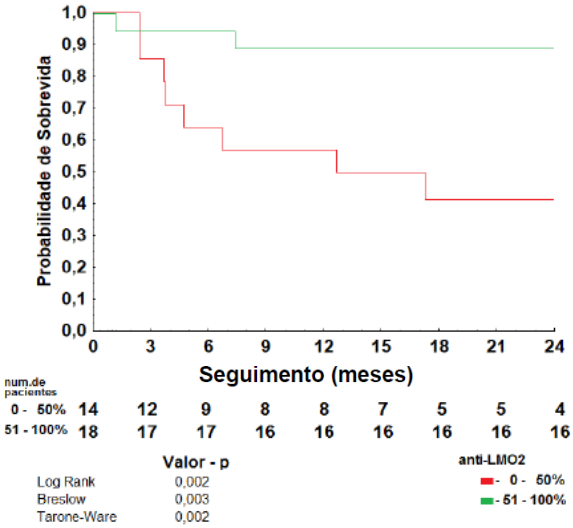



a) Teste de Log-Rank para SG
HR (IC95%)= 3,559 (0,833; 15,196)



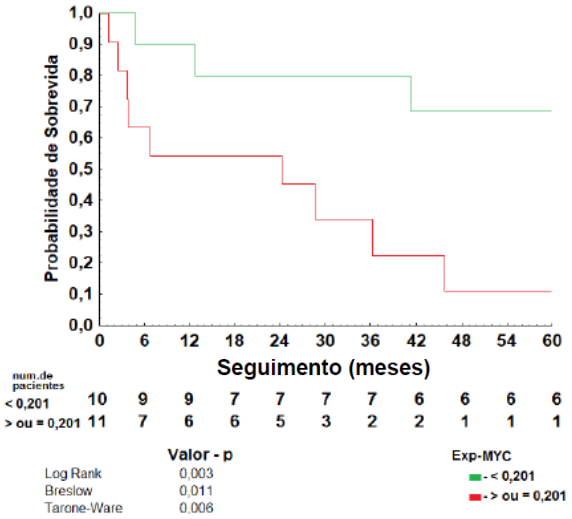

b) Teste de Log-Rank para SLP
HR (IC95%)= 3,376 (0,784; 14,534)

**Gráfico 9 -** Teste de Log-rank – Variável: Anti-BCL2 (51-100% vs 0-50%)

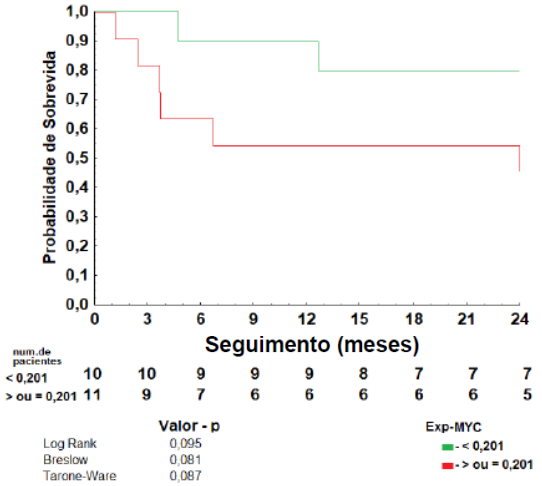



a) Teste de Log-Rank para SG 24 meses
HR (IC95%)=8,131 (1,737; 38,068)

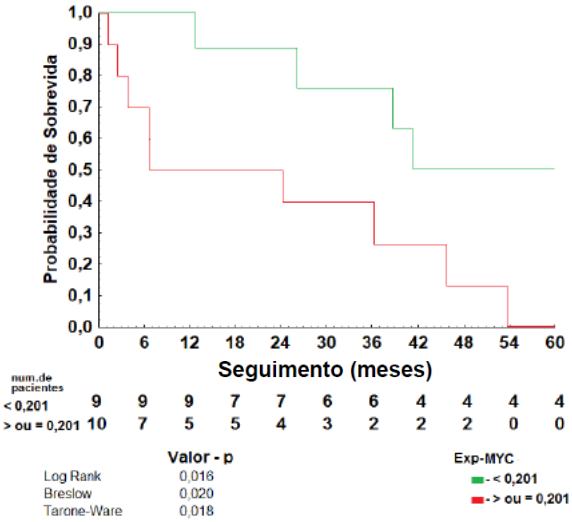
**Gráfico 10 -** Teste de Log-rank – Variável: anti-LMO2 (0-25% vs ≥26%)




a) Teste de Log-Rank para SG
HR (IC95%)= 6,117 (1,617; 23,149)

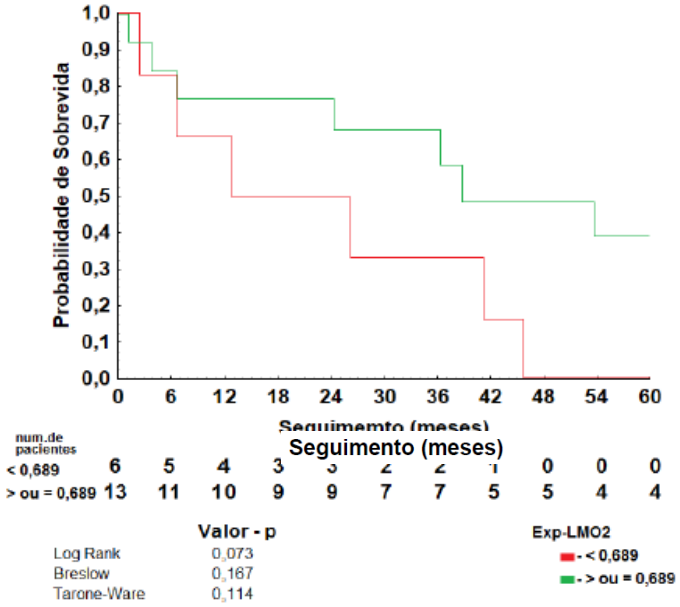



b) Teste de Log-Rank para SG 24 meses
HR (IC95%)= 3,597 (0,723; 17,888)



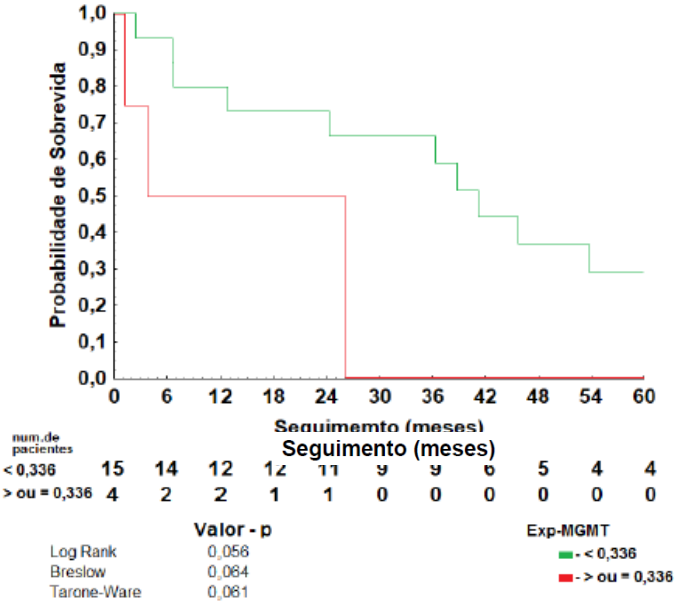

c) Teste de Log-Rank para SLP
HR (IC95%)= 3,96 (1,192; 13,147)

**Gráfico 11 -** Teste de Log-rank – Variável: Gene *MYC* (≥0,201041 vs <0,201041)




a) Teste de Log-Rank para SLP
HR (IC95%)= 2,718 (0,87; 8,493)

**Gráfico 12 -** Teste de Log-rank – Variável: Gene *LMO2* (<0,689232 vs ≥0,689232)




a) Teste de Log-Rank para SLP
HR (IC95%)=3,749 (0,879; 15,993)

**Gráfico 13 -** Teste de Log-rank – Variável: Gene *MGMT* (≥0,335666 vs <0,335666)

## 5.9 Fatores de Prognóstico para Mortalidade até a data de censura e Mortalidade em 2 anos após o diagnóstico

### 5.9.1 Análise Univariada

Análises univariadas para Mortalidade Global e Mortalidade em 2 anos foram realizadas para as variáveis estudadas, conforme demonstrado na Tabela 19.

Com relação à Mortalidade Global, Idade >60 anos IPI modificado ≥2, PS ≥3, ausência de tratamento radioterápico, CD3 negativo, expressão gênica de *MYC* ≥0,201041,BCL2 >51%, expressão gênica de *PD1* ≥2,00938, PD após a 1ª linha de tratamento estiveram associados com aumento de risco de óbito durante o seguimento em análise univariada (p ≤0,1).

Com relação à Mortalidade em até 2 anos após o diagnóstico, ausência de tratamento radioterápico, LMO2 ≤25% e refratariedade à primeira linha de tratamento (p=0,001) estiveram associados com maior risco de óbito (risco de morte em até 2 anos após diagnóstico) em análise univariada (p ≤0,1).

**Tabela 19 -** Análise univariada para Mortalidade Global e Mortalidade em 2 Anos

| **Variáveis** | **Óbito global** | | **Óbito em até 24 meses após o diagnóstico** | |
|---|---|---|---|---|
| | **OR (IC 95%)** | **valor p** | **OR (IC 95%)** | **valor p** |
| Idade (> 60 anos vs≤ 60 anos) | **6,61 (1,13-38,70)** | **0,027** | 2,18 (0,51-9,33) | 0,295 |
| IPI modificado (2+3+4+5 vs 0+1) | **6,13 (1,03-36,45)** | **0,036** | 3,88 (0,41-36,79) | 0,219 |
| P.S. (3+4 vs 0+1+2) | **9,33 (1,02-85,70)** | **0,028** | **8,5 (1,71-42,28)** | **0,006** |
| Radioterapia (Não vs Sim) | **8,00 (0,87-73,40)** | **0,043** | 2,74 (0,62-12,08) | 0,182 |
| COO (não-GCB vs GCB) | 4,50 (0,37-54,16) | 0,234 | 1,20 (0,12-11,87) | 0,880 |
| anti-CD3 (Negativo vs Positivo) | **13,80 (1,18-161,72)** | **0,015** | 1,67 (0,15-18,22) | 0,678 |
| anti-MYC (51-100% vs 0-50%) | 2,13 (0,42-10,75) | 0,364 | 2,50 (0,57-10,93) | 0,225 |
| anti-BCL2 (51-100% vs 0-50%) | **9,00 (1,13-71,96)** | **0,023** | 2,25 (0,47-10,78) | 0,312 |
| anti-LMO2 (0-25% vs 26-100%) | 1,05 (0,19-5,69) | 0,958 | **14,4 (2,31-89,94)** | **0,002** |
| anti-MGMT (Positivo x Negativo) | NA | NA | NA | |
| anti-PDCD1 (Positivo x Negativo) | 0,25 (0,01-4,60) | 0,328 | NA | |
| anti-POU2F1 (Positivo x Negativo) | NA | NA | NA | |
| gene *MYC* (≥0,201041 vs <0,201041) | **10,00 (0,91-110,29)** | **0,043** | 4,80 (0,68-33,80) | 0,112 |
| gene *BCL2* (≥0,3516 vs <0,3516 ) | 2,00 (0,29-13,74) | 0,488 | 2,57 (0,37-17,83) | 0,344 |
| gene *LMO2* (≥0,689232 vs <0,689232) | NA | 0,046 | 0,30 (0,05-1,99) | 0,215 |
| gene *MGMT* (≥0,335666 vs <0,335666) | 1,82 (0,16-20,71) | 0,635 | 3,3 (0,41-26,37) | 0,259 |
| gene *POU2F1* (≥1,44819 vs <1,44819) | 1,13 (0,17-7,24) | 0,903 | 0,60 (0,11-3,25) | 0,561 |
| gene *PDCD1* (≥2,00938 vs <2,00938) | **0,15 (0,02-1,70)** | **0,082** | 0,32 (0,03-3,56) | 0,352 |
| gene *BCL6* (≥2,73477 vs <2,73477) | 0,44 (0,06-3,11) | 0,419 | 0,60 (0,11-3,25) | 0,561 |
| Refratariedade (Sim vs Não) | NA | 0,034 | **88,00 (6,99-1108,27)** | **0,001** |
| PD após 1 linha tratamento (Sim vs Não) | **19,43 (2,03-185,73)** | **0,003** | 5,20 (0,9-30,08) | 0,057 |

## 5.10 Fatores de Prognóstico para Risco de Recaída e Refratariedade na primeira linha de tratamento

### 5.10.1 Análise Univariada

Em análise univariada, Idade > 60 anos foi associado a maior risco de refratariedade à primeira linha de tratamento oncológico com diferença estatisticamente significante (p ≤0,1). Idade >60 anos, IPI ≥2, CD3 negativo, expressão gênica de *MYC* ≥0,201041, expressão gênica de *PD1* ≥2,00938 estiveram associados a maior risco de recaída após a primeira linha de tratamento com diferença estatisticamente significante (p ≤0,1), conforme demonstrado na Tabela 20.

**Tabela 20 -** Análise univariada para Refratariedade e Recaída

| Variáveis | Refratariedade | | Recaída | |
|---|---|---|---|---|
| | **OR (IC 95%)** | **valor p** | **OR (IC 95%)** | **valor p** |
| Idade (>60 anos vs ≤ 60 anos) | **9 (0,76-106,01)** | **0,067** | **12,44 (1,31-117,93)** | **0,012** |
| IPI modificado (2+3+4+5 vs 0+1) | 6,75 (0,53-86,56) | 0,127 | **7,33 (1,17-46,05)** | **0,024** |
| P.S. (3+4 vs 0+1+2) | **NA** | **0,031** | NA | NA |
| Radioterapia (Não vs Sim) | **NA** | **0,031** | 5,5 (0,59-51,52) | 0,112 |
| COO (não-GCB vs GCB) | NA | NA | 2 (0,11-34,82) | 0,644 |
| anti-CD3 (Negativo vs Positivo) | 4 (0,27-58,56) | 0,309 | **12,62 (1,97-148,13)** | **0,021** |
| anti-MYC (51-100% vs 0-50%) | 1,17 (0,13-10,22) | 0,893 | 4 (0,69-23,23) | 0,115 |
| anti-BCL2 (51-100% vs 0-50%) | **NA** | **0,008** | 5,75 (0,62-54,43) | 0,102 |
| anti-LMO2 (0-25% vs 26-100%) | 1(0,07-14,64) | 1 | 1,67 (0,28-10,09) | 0,583 |
| anti-MGMT (1-100% vs 0%) | NA | | NA | |
| anti-PDCD1 (1-100% vs 0%) | NA | | NA | |
| anti-POU2F1 (1-100% vs 0%) | NA | | NA | |
| gene *MYC* (≥0,201041 vs <0,201041) | 4,5 (0,25-80,57) | -0,322 | **7,2 (0,62-83,35)** | **0,098** |
| gene *BCL2* (≥0,3516 vs <0,3516 ) | 4,5 (0,25-80,57) | 0,322 | 1,2 (0,15-9,77) | 0,868 |
| gene *LMO2* (≥0,689232 vs <0,689232) | **NA** | **0,024** | **NA** | **0,085** |
| gene *MGMT* (≥0,335666 vs <0,335666) | NA | 0,371 | 1,09 (0,09-13,78) | 0,948 |
| gene *POU2F1* (≥1,44819 vs <1,44819) | 3 (0,19-47,96) | 0,453 | 0,86 (0,11-6,62) | 0,885 |
| gene *PDCD1* (≥2,00938 vs <2,00938) | NA | 0,264 | **0,11 (0,01-1,15)** | **0,052** |
| gene *BCL6* (≥2,73477 vs <2,73477) | 0,20 (0,01-3,66) | 0,285 | 0,86 (0,11-6,62) | 0,885 |
| Refratariedade (Sim vs Não) | NA | 0,403 | NA | 0,127 |
| PD após 1 linha tratamento (Sim vs Não) | 4 (0,34-47,11) | 0,267 | **NA** | **0,001** |

## 5.11 Correlação entre expressão gênica e expressão proteica

As Tabelas 21, 22 e 23 apresentaram as correlações entre as expressões gênicas (RT-qPCR normatizadas de *MYC, BCL2* e *LMO2*) e suas proteínas correspondentes (anti-MYC, anti-BCL2 e anti-LMO2). Teste de concordância para BCL6 não pode ser realizado, pois não foram realizadas reações de IHQ prospectivamente neste estudo. Os outros genes/proteínas de interesse (PD1, MGMT e OCT1) não puderam ser calculados devido à ausência ou ao excesso de expressão gênica ou proteica.

Houve correlação moderada entre a expressão gênica de *MYC* (<0,201041 vs ≥0,201041) e sua respectiva proteína (0/1/2 vs 3/4), com coeficiente de Kappa=0,596 e valor p=0,022. O mesmo ocorreu entre a expressão gênica de *BCL2* (<0,3516 vs ≥0,3516) e sua respectiva proteína (0/1/2 vs 3/4), com coeficiente de Kappa=0,426 e valor p=0,042.

O Anexo P demonstra as médias e medianas de expressão gênica normatizada em cada quartil de IHC da proteína correspondente.

**Tabela 21 -** Correlação entre IHQ proteína MYC e expressão gênica *MYC*

| **MYC** | | **expressão gênica** | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **<0.201041** | **≥0.201041** | total %(n) |
| **IHQ Anti-MYC** | **0%-50%** | 35 % (7) | 10 % (2) | 45 % (9) |
| | **51%-100%** | 10 % (2) | 45 % (9) | 55 % (11) |
| | total %(n) | 45 % (9) | 55 % (11) | **100 % (20)** |
| **Porcentagem de concordância** | | 80,0% | | **Acurácia Geral** |
| **Porcentagem de discordância** | | 20,0% | | |
| **Coeficiente de Kappa** | | | | classificação** |
| **valor** | | 0,596 | | **moderada** |
| **teste hipótese** | H0: igual a zero | **p = 0,022** | | **rejeita H0** |
| **sensibilidade** | | 0,778 | | |
| **especificidade** | | 0,818 | | |
| **valor preditivo positivo** | | 0,778 | | |
| **valor preditivo negativo** | | 0,818 | | |
| **Coef de Youden** | | 0,596 | | |
| **Eficiência** | | 0,798 | | |

* considerando expressão gênica como teste gold (ouro)
** classificação da concordância obtida pelo coeficiente de Kappa

**Tabela 22 -** Correlação entre IHQ proteína BCL2 e expressão gênica *BCL2*

| BCL2 | | expressão gênica | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **<0.3516** | **≥0.3516** | total %(n) |
| **IHQ Anti-BCL2** | **0%-50%** | 14,3 % (3) | 0 % (0) | 14,3 % (3) |
| | **51%-100%** | 23,8 % (5) | 61,9 % (13) | 85,7 % (18) |
| | total %(n) | 38,1 % (8) | 61,9 % (13) | **100 % (21)** |
| **Porcentagem de concordância** | | 76,2% | | **Acurácia Geral** |
| **Porcentagem de discordância** | | 23,8% | | |
| **Coeficiente de Kappa** | | | | classificação** |
| **valor** | | 0,426 | | **moderada** |
| **teste hipótese** | H0: igual a zero | **p = 0,042** | | **rejeita H0** |
| **sensibilidade** | | 0,375 | | |
| **especificidade** | | 1,000 | | |
| **valor preditivo positivo** | | 1,000 | | |
| **valor preditivo negativo** | | 0,722 | | |
| **Coef de Youden** | | 0,375 | | |
| **Eficiência** | | 0,688 | | |

* considerando expressão gênica como teste gold (ouro)
** classificação da concordância obtida pelo coeficiente de Kappa

**Tabela 23 -** Correlação entre IHQ proteína LMO2 e expressão gênica *LMO2*

| LMO2 | | expressão gênica | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **<2.57603** | **≥2.57603** | total %(n) |
| **IHQ Anti-LMO2** | **0%-25%** | 33,3 % (7) | 14,3 % (3) | 47,6 % (10) |
| | **26%-100%** | 23,8 % (5) | 28,6 % (6) | 52,4 % (11) |
| | total %(n) | 57,1 % (12) | 42,9 % (9) | **100 % (21)** |
| **Porcentagem de concordância** | | 61,9% | | **Acurácia Geral** |
| **Porcentagem de discordância** | | 38,1% | | |
| **Coeficiente de Kappa** | | | | classificação** |
| **Valor** | | 0,243 | | **Fraca** |
| **teste hipótese** | H0: igual a zero | p = 0,387 | | aceita H0 |
| **sensibilidade** | | 0,583 | | |
| **especificidade** | | 0,667 | | |
| **valor preditivo positivo** | | 0,700 | | |
| **valor preditivo negativo** | | 0,545 | | |
| **Coef de Youden** | | 0,250 | | |
| **Eficiência** | | 0,625 | | |

* considerando expressão gênica como teste gold (ouro)
** classificação da concordância obtida pelo coeficiente de Kappa

## 6 DISCUSSÃO

Este estudo foi desenhado como uma coorte unicêntrica retrospectiva. Apesar das limitações deste tipo de estudo, na literatura se encontram disponíveis principalmente estudos de coorte unicêntricos, retrospectivos com amostras populacionais pequenas em LPSNC (menores que 50) [24,131,224,225]. O número de pacientes obtido foi levado em consideração no plano de análises estatísticas, sendo planejadas apenas estatística descritiva e análises univariadas. Análises multivariadas, regressões logísticas e de Cox são geralmente utilizadas para identificação de fatores de risco e biomarcadores, porém apresentam resultados menos tangíveis e confiáveis quando o número de observações é pequeno e múltiplos fatores confundidores precisam ser ajustados. Portanto, não elas não foram realizadas [226]. Estudos com amostras pequenas podem limitar as análises estatísticas, principalmente quando múltiplas variáveis são analisadas e comparadas, apresentando maiores margem de erro, intervalos de confiança, resultados falso positivos, podendo hiperestimar a magnitude da associação, com menor precisão dos resultados e conclusões que precisam ser interpretadas com cautela [226]. O tamanho do efeito esperado também tem impacto no cálculo do tamanho amostral, por exemplo. Estudos que analisam biomarcadores com baixo OR ou HR esperados precisam de amostras maiores para que o efeito real possa ser diferenciado de uma variação aleatória [227].

Em nosso estudo, a maioria dos pacientes era do sexo feminino (57,1%) e a mediana de idade ao diagnóstico foi de 62 anos, similar à literatura. Houve predomínio do sexo feminino, com mediana de idade entre 65 e 67 anos em aproximadamente 51% dos pacientes [19,228].

Dez pacientes tiveram diagnóstico de LPSNC com 70 anos ou mais, representando 29% dos casos. O acometimento de população idosa tem sido verificado no LPSNC. Segundo dados do *Central Brain Tumor Registry of the United States* and SEER, foi evidenciado um aumento de incidência de LPSNC acima de 70 anos entre 1973 e 2013 (de 0,2 para 2,1/100.000 pessoas) [46]. Apesar de idade não ser o melhor biomarcador para tolerabilidade ao

tratamento ou preditor de toxicidade, pacientes acima de 70 anos apresentam mais frequentemente redução de suas funções fisiológicas, que impactam na farmacocinética e farmacodinâmica dos fármacos utilizados no tratamento oncológico, o que colabora para o aumento do risco de toxicidade e morbi-mortalidade [229]. Como discutido posteriormente, o tratamento oncológico na população estudada foi individualizado, e a idade dos pacientes foi um dos determinantes na escolha terapêutica, a fim de minimizar a toxicidade e proporcionar melhor qualidade de vida.

Vários fatores clínicos são considerados na decisão do tratamento oncológico, incluindo o *performance status*. Neste estudo, apesar de a maioria (22/35; 65,7%) dos pacientes apresentar inicialmente PS ≥2, quase a totalidade (33/35; 94,2%) foi submetida a alguma linha de tratamento oncológico. Dados semelhantes foram demonstrados num estudo retrospectivo com 378 pacientes, em que 58% dos pacientes apresentavam PS ≥2 e 98% foram submetidos a algum tipo de tratamento oncológico [230]. *Performance status* está associado à sobrevida global em pacientes com LDGCB e LPSNC, assim como em outros tumores. Geralmente um PS avançado está associado a doença em estádio mais avançado, com pior prognóstico e menor tolerabilidade ao tratamento oncológico, limitando opções terapêuticas. Àinda que contribuísse para o incremento de suas toxicidades, conforme demonstrado, não foi impeditivo de tratamento oncológico na presente coorte.

Conforme previamente exposto, a maioria dos pacientes apresentava idade >60 anos e PS≥2. Estes foram os primeiros fatores de mau prognósticos identificados em pacientes com LPSNC, corroborado por diversos estudos independentemente da escolha terapêutica [95,230-232]. Em nosso estudo, idade >60 anos foi associada a piores SG, SLD, SLP e refratariedade ao tratamento e P.S. ≥3 foram associados a piores SG, SG 2 anos, SLD e SLP (valor p ≤0,1), alinhados com dados da literatura. Tais dados demonstram a necessidade de novas opções terapêuticas para esta população para que causem menor morbi-mortalidade.

Apesar de punção lombar ser contraindicada em pacientes com LPSNC em até 42% dos pacientes [233], nesta coorte foi realizada em quase a totalidade dos pacientes (97%). No entanto, a maioria (91%) apresentou citologia oncótica

negativa, similar a dados da literatura. Dados publicados evidenciam citopatologia oncótica positiva em apenas 13% dos casos (quando associado à citometria de fluxo) [234,235]. A pesquisa de células neoplásicas como citologia é um método de baixa sensibilidade e com alta taxa de resultados falso negativos, mesmo em pacientes com evidência de extensa infiltração meníngea, o que poderia justificar os resultados encontrados [230,236]. Apesar disso, há relatos de diagnóstico de LPSNC pela associação de citologia oncótica e citometria de fluxo, demonstrando que tal procedimento possui valor clínico e prognóstico e foi factível nesta população [234].

A localização topográfica do LPSNC no SNC tem importante papel prognóstico, além de ter impacto na realização do procedimento de biópsia esterotáxica. Diferentemente do estudo conduzido por Ferreri *et al*., no qual apenas 36% dos pacientes apresentavam acometimento de regiões profundas em SNC (regiões periventriculares, gânglios da base, corpo caloso, tronco cerebral e cerebelo), neste estudo a maioria (77%) apresentava acometimento de regiões profundas do SNC evidenciado por exames de imagem [230].

Considerando os fatores prognósticos já descritos, como idade, PS e acometimento de regiões profundas, a maioria dos pacientes apresentava risco IPI modificado de risco intermediário e alto (80%), o que demonstra a alta prevalência de fatores de mau prognóstico na população estudada. É descrito que pacientes com IPI modificado de risco intermediário e alto estão associados a pior prognóstico, com SG em 2 anos entre 48%-57% e 17%-24%, respectivamente, independentemente do tratamento utilizado, similares aos encontrados no presente estudo [230]. Em nosso estudo, em análise univariada, o IPI modificado ≥2 foi associado a pior SG, SLD, SLP e maior recaída ($p \leq 0,1$). Desta forma, confirma-se tratar de um fator de prognóstico adverso na nossa população, corroborando dados de Ferreri *et al*. e Cady *et al*. [68,69]. A análise de IPI modificado é de fácil execução, o que permite a identificação precoce de pacientes com mau prognóstico, que muitas vezes necessitam de acompanhamento médico mais frequente e tratamentos mais agressivos. Portanto, deve ser realizado assim que possível nos pacientes com LPSNC.

O tipo de acesso e o fluxo de sistema público de saúde também pode ter impacto prognóstico, ao retardar o diagnóstico e na escolha teratêutica. Neste

estudo, os pacientes eram referenciados de serviços primários e secundários de saúde por suspeita de tumores em SNC ao Serviço de Neurocirurgia do HC-FMUSP para realização de procedimentos diagnósticos e terapêuticos. Após suspeita de linfoma em SNC, os pacientes eram então encaminhados ao Serviço de Hematologia do HC-FMUSP para acompanhamento e tratamento. Portanto, a data de confirmação diagnóstica na nossa população dependia de variáveis como demora para obtenção de acesso aos serviços de saúde e à inespecificidade dos sintomas clínicos iniciais do LPSNC, o que comumente pode levar à demora diagnóstica. Diagnósticos tardios podem levar à deterioração clínica dos pacientes, o que interfere na escolha do tratamento e tolerância ao mesmo e causa impacto no prognóstico, na SG e nas taxas de resposta, conforme demonstrado num estudo brasileiro com pacientes com LDGCB sistêmico tratados no HC-FMUSP [237]. Além disso, a infiltração do linfoma no SNC por longo período pode levar a dano tecidual, o que dificulta o diagnóstico e piora piorar o PS (com menor tolerabilidade ao tratamento), levando à perda de autonomia, a danos neurológicos com sintomas debilitantes muitas vezes irreversíveis apesar da obtenção de RC e ao tratamento, com alta morbidade da patologia [238]. No presente estudo, não foi possível calcular o intervalo entre o início de sintomas e o procedimento diagnóstico realizado. No entanto, conforme discutido posteriormente, as taxas de SG observadas neste estudo foram semelhantes às dos principais estudos realizados em países desenvolvidos [22,23,68]. Isso sugere que este intervalo pode ter sido semelhante. É provável que a maioria dos pacientes em todo o mundo tenha alguma demora diagnóstica devido aos diagnósticos diferenciais nesta população.

Considerando os dados obtidos e alinhados com boas práticas clínicas, pôde-se observar individualização na escolha terapêutica baseada nas condições clínicas dos pacientes. Alinhada com literatura médica, a maioria dos pacientes foi submetida à quimioterapia baseada em HD-MTX (63,6%). Monoquimioterapia ou WBRT isolada foram indicadas principalmente para pacientes isosos, com mediana etária de 69 anos devido à maior tolerabilidade e menor toxicidade aguda, apesar de proporcionarem taxas de resposta inferiores e menos duradouras [57,98,239]. A taxa de resposta global encontrada após a primeira linha de tratamento foi de 72,8%, semelhante a dados

publicados por Ferreri *et al*. (RG 69%) em pacientes tratados com HD-MTX [230]. Estes dados confirmam a qualidade de tratamento oferecido no complexo HC-FMUSP, similar a dados apresentados internacionalmente.

WBRT foi prescrita como consolidação de tratamento ou tratamento isolado. A maioria dos pacientes (9/12; 75%) recebeu radioterapia como regime de consolidação após indução, por apresentarem melhores condições clínicas satisfatórias e bom PS. Radioterapia isolada foi prescrita principalmente para pacientes sem condições clínicas de tolerar tratamentos oncológicos com maior toxicidade. Em nosso estudo, tratamento com radioterapia foi associado com melhores SG, SLD, SLP (valor p ≤0,1). Como a análise multivariada não foi realizada, a interpretação de radioterapia como fator de bom prognóstico deve ser considerada com cautela, principalmente porque a radioterapia isolada e a radioterapia como regime de consolidação não foram analisadas separadamente como fator prognóstico, devido ao baixo número de pacientes. No entanto, o potencial benefício da radioterapia é discutido na literatura, principalmente como tratamento isolado, por exemplo. Em um estudo retrospectivo com 82 pacientes, a radioterapia isolada foi associada à melhor SG quando comparada a tratamento suportivo em pacientes com LPSNC e PS ruim, incluindo em pacientes idosos, podendo ser utilizada como terapia em pacientes com condições clínicas limítrofes [240]. O benefício da radioterapia como regime de consolidação é questionável, principalmente em face de novas opções terapêuticas e risco de neurotoxicidade [22].

Apesar de um possível ganho de SG com WBRT, é importante ressaltar que, de modo geral, os pacientes submetidos à radioterapia não apresentavam dados/acompanhamento neurológico ou cognitivo progressivos registrados no prontuário, de forma que a neurotoxicidade tardia não pôde ser analisada neste estudo. Isso é de extrema importância na nossa coorte, por se tratar majoritariamente de população idosa e pelo fato de a maioria dos pacientes ter sido submetida a tratamento radioterápico. Dessa forma, dados sobre opções terapêuticas e neurotoxicidade neste estudo necessitam ser interpretados com cautela. Num estudo conduzido por Ferreri *et al*., WBRT foi associado a declínio neurológico de funções executoras e de aprendizado em 50% dos pacientes em até 2 anos [20].

Apesar da alta taxa de resposta global aos tratamentos oncológicos e radioterápicos descritos na literatura, existe uma alta taxa de recorrência e refratariedade (50% e 30%, respectivamente). A recaída e refratariedade após tratamento oncológico estão associadas a pior prognóstico [93]. Em nosso estudo, a taxa de refratariedade (27,30%) foi similar à literatura médica. Refratariedade à primeira linha de tratamento e PD após a primeira linha de tratamento estiveram associados a pior prognóstico, incluindo piores SG, SG 2 anos, SLP (valor p ≤0,1), conforme esperado.

Novos estudos clínicos e novas opções terapêuticas têm surgido no LPSNC. Em nosso estudo, nenhum paciente foi submetido a tratamento com rituximabe ou TMO, o qual tem sido adicionado ao serviço do HC-FMUSP em 2018, após a data limite de seleção dos pacientes.

Resseção neurocirúrgica não foi recomendada como opção terapêutica em nenhum dos pacientes desta coorte, por não fazer parte do arsenal terapêutico e pelo fato de LPSNC ser uma patologia multifocal [241]. Isso também demonstra possivelmente o alto grau de suspeição de LPSNC em exames de imagem, com indicação do procedimento cirúrgico correto.

O presente estudo confirmou a alta mortalidade do LPSNC, com SG mediana de 42,6 meses (IC95% 26,6-58,6 meses), semelhante aos dados da literatura, cuja SG mediana varia entre 20,6 meses (IC95% 12,4 a 33,4 meses) e 60 meses em pacientes tratados com radioterapia isolada e HD-MTX, respectivamente [198,203,231]. As SG em 24 e 48 meses (65,5% e 43,8%, respectivamente) também foram semelhantes aos dados da literatura médica, na qual pacientes são submetidos a tratamento basedo em HD-MTX (52 ±4% e 43,8%, respectivamente) [242,243] [53]. Dados do SEER têm demonstrado ganho de SG em 5 anos entre os períodos de 1992-1994 e 2004-2006 de 19,1% (IC95%: 14,8-23,8) e 30,1% (IC95%: 24,2-28,1%), respectivamente, devido às novas opções terapêuticas disponíveis [19]. Contudo, tal ganho de sobrevidas não pode ser analisado no presente estudo, pois os pacientes não foram separados por período de inclusão devido ao baixo tamanho amostral.

Com uma mediana de tempo de seguimento de 41 meses (1,1- 171,8), foi evidenciada uma alta taxa de mortalidade (74%), semelhante à maioria dos estudos disponíveis. Essa elevada mortalidade pode ser explicada pela

associação de diversos fatores que, em conjunto, conferiram prognóstico adverso. Destacamos características clínico-laboratoriais desfavoráveis, como elevado IPI ao diagnóstico, idade ao diagnóstico e PS inicial >2, entre outras. Tais dados demonstram a necessidade de diagnóstico mais precoce do LPSNC, antes da deterioração clínica, tratamento individualizado e o uso de novas opções terapêuticas, como *target therapies*.

Apesar de todos os pacientes terem sido acompanhados clinicamente durante ou após o tratamento oncológico, dados sobre a *causa mortis* não se encontravam disponíveis. A maioria dos pacientes (21/26; 80,7%) apresentava doença em atividade documentada na última consulta médica, sugerindo que a *causa mortis* poderia estar relacionada à progressão tumoral. Tais dados estão alinhados com um grande estudo retrospectivo com 370 pacientes tratados com quimioterapia e/ou radioterapia, em que a maioria (70,1%) evoluiu a óbito após 24 meses de seguimento, sendo as principais causas de óbito relacionadas ao linfoma (87%), à toxicidade do tratamento (8%), entre outros fatores [230].

Biomarcadores moleculares também foram selecionados e estudados, objetivando melhor compreensão da patogênese tumoral e identificação de fatores prognósticos. No presente estudo, a expressão gênica foi estudada utilizando o qRT-PCR, por ser considerado um método rápido, de alta sensibilidade e especificidade para a quantificação de expressão gênica [244]. Em nosso estudo, os *guidelines* MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) foram utilizados seguindo padronização internacional da técnica e dos descritores [204]. Foi observada ausência de amplificação gênica entre 34,3% e 40% das amostras. Os estudos foram realizados em amostras parafinadas, algumas delas bastante antigas. Vários fatores podem justificar a ausência de amplificação, como a possível degradação do RNA, a condição de emblocamento das amostras em parafina das amostras e a reduzida quantidade de tecido tumoral emblocado, pois, na maioria das biópsias, havia escassa quantidade amostral. Dentre outros fatores que podem ter interferido na qualidade do RNA extraído de amostras FFPE, estão a demora na fixação do material após a realização da biópsia, levando à degradação do RNA induzido por autólise e a fixação do tecido com formalina

não tamponada, levando à degradação ácida do RNA [245,246]. Tais fatores podem ter ocorrido na nossa população. Apesar disso, não foi evidenciada diferença estatisticamente significante das características clínicas e laboratoriais entre os pacientes da coorte analisada para expressão gênica e os que foram excluídos. Assim, afasta-se qualquer suspeição de seleção de pacientes de melhor ou pior prognóstico do ponto de vista clínico e laboratorial, já que os pacientes avaliados são representativos da amostra total.

A curva de amplificação das eficiências gênicas confirmam a qualidade das reações de RT-qPCR. O gene de referência *GUSB* foi selecionado como gene de referência/controle endógeno para controle e verificação das possíveis variações ou interferentes da reação de RT-qPCR e para análise da eficiência e da quantidade de RNA total [245,247]. Neste estudo, os dados quantitativos obtidos no RT-qPCR foram transformados em variáveis qualitativas pelo estabelecimento de pontos de corte obtidos em curvas de ROC. Isso foi necessário para a inclusão de pacientes com ausência absoluta de expressão dos genes selecionados. Estas amostras apresentaram amplificação do gene de referência e tiveram suas reações de RT-qPCR com expressão do gene de interesse indetectável. Estes resultados foram confirmados (resultado do *Ct* como indeterminado). É importante ressaltar que estas amostras tiveram reações com valor zero em até 5 dígitos decimais, apesar de realização da reação até o número máximo de ciclos. O significado deste resultado é que tais genes não eram expressos ou expressos em poucas células em baixo nível de maneira não detectável. Portanto, não podem ser excluídas de análises estatísticas e precisaram ser convertidas em variáveis categóricas [248].

A expressão gênica de *MYC* ≥0,201041 foi associada a piores SG, SG2 anos, SLP, óbito global e risco de recaída após tratamento (valor p ≤0,1), sendo considerado um biomarcador de mau prognóstico, o que corrobora dados da literatura médica. É sabido que hiperexpressão de MYC está associada à iniciação, à progressão e à manutenção tumoral, além de diversas neoplasias, como linfoma de Burkitt e Mieloma Múltiplo, o que confere um pior prognóstico [148,150].

Em nosso estudo, a maioria dos pacientes ficou acima dos pontos de corte estabelecidos para imunoexpressão proteica (60%) de MYC, porém sem

correlação prognóstica. Tal dado corrobora dados de Rubenstein *et al*., em cujo estudo prospectivo com 44 pacientes, a expressão gênica e proteica elevada de MYC (positividade nuclear >50%) foi identificada em 54% dos pacientes, porém sem correlação prognóstica [23]. O papel da expressão proteica de MYC também foi avaliado num estudo com 14 pacientes, onde a sua hipexpressão esteve associada à pior SG. No entanto, o ponto de corte utilizado foi de apenas 20%, diferentemente daquele utilizado em nosso estudo e no estudo de Rubenstein *et al*. [249]. Portanto, nosso estudo apresenta resultados alinhados com a literatura médica, demonstrando o papel prognóstico de MYC no LPSNC[75].

O gene *BCL2* regula a morte celular programada inclusive em linfócitos, e, quando hiperexpressa, pode bloquear a apoptose. Está associado à resistência à quimioterapia e à radioterapia, conferindo mau prognóstico[154,220,250,251]. Em nosso estudo, a maioria dos pacientes ficou acima dos pontos de corte estabelecidos para a expressão proteica de BCL2 (80%), similar a dados da literatura [252,253]. Sua hiperexpressão foi associada a piores SG e SLP (valor p ≤0,1), corroborando dados da literatura [252-254].

Tais dados precisam ser considerados conjuntamente com o tratamento recebido, pois nenhum paciente foi submetido à terapia com rituximabe. No LDGCB sistêmico, imunoexpressão de BCL2 é considerado um biomarcador de mau prognóstico, principalmente em estudos conduzidos na era pré-rituximabe[154,255]. Na era pós-rituximabe, o impacto prognóstico de hipexpressão de BCL2 parece ser reduzido. Num estudo com 399 pacientes, foi demonstrado que a adição de rituximabe ao esquema CHOP foi capaz de evitar a falha à quimioterapia em pacientes com hiperimunoexpressão de BCL2 [220]. Expressão gênica de *BCL2* ≥0,3516 não foi associada a nenhum dos desfechos clínicos estudados.

Em nosso estudo, o teste de correlação entre expressão gênica e expressão proteica pôde ser realizado apenas para MYC, BCL2 e LMO2. Não foi possível estabelecer ponto de corte para correlação de outros genes estudados devido ao excesso de expressão gênica indetectável (MGMT e PDCD1) ou excesso de hiperexpressão (POU2F1) [256].

Observamos correlação moderada (kappa entre 0,41-0,60) entre

expressão gênica e proteica de MYC, bem como de BCL2. Dados similares são encontrados na literatura médica, na qual a correlação entre expressão gênica e proteica é de apenas 40% (classificada como moderada). Isso deve-se a fatores como estabilidade proteica, taxa de transcrição e translação, taxa de degradação do mRNA, atividade do micRNA, regulação pós-transcripcional e de modificação pós-translacional [257]. De modo geral, o nível de transcriptoma não é diretamente proporcional ao nível de proteína, sendo insuficiente para explicar a relação entre genótipo e seu fenótipo [257]. A meia vida de uma proteína pode variar de minutos a dias, enquanto a taxa de degradação do mRNA fica em torno de 2-7 horas em mamíferos. Outro fator a ser considerado é que, nos mamíferos, há uma baixa taxa de transcrição de mRNA, quando comparado com à translação [258]. É comum a falta de proporcionalidade entre a expressão proteica e a expressão gênica de proteínas que não são controladas pela expressão gênica, mas por sua ativação, como é o caso das proteínas kinases cuja expressão gênica é constante, mas sua ativação varia ao longo do tempo [259]. Em estudos com células de câncer de mama, foi observada hiperexpressão proteica de POU2F1 sem concomitante hiperexpressão gênica (mRNA) possivelmente devido a alterações na metabolização e na degradação de POU2F1 [260]. Tais motivos podem explicar a ausência de correlação entre expressão gênica e proteica dos outros genes de interesse estudados e o fato de ter sido encontrada apenas correlação moderada para MYC e BCL2.

O gene *LMO2* e sua respectiva proteína possui papel crucial na hematopoiese e vem sendo estudado em tumores hematológicos, incluindo LPSNC [148]. Em nosso estudo, a maioria dos pacientes ficou acima dos pontos de corte para imunoexpressão proteica (51,4%) de LMO2. Alguns estudos têm demonstrado hiperexpressão de LMO2 em LPSNC quando comparados a LDGCB sistêmico. Num estudo com 32 pacientes com LPSNC, apenas 37% apresentavam imunoexpressão de LMO2, inferior ao nosso resultado [75]. No entanto, o ponto de corte utilizado por Four *et al*. foi de 30%, superior ao ponto de corte selecionado (25%) [75].

No nosso estudo, tanto a hiperexpressão proteica de LMO2 >25% quanto a gênica de *LMO2* ≥0,689232 estiveram associadas a melhor prognóstico (SG 2 anos e SLP, respectivamente, valor p ≤0,1). Tais dados

estão alinhados com dados da literatura médica, incluindo não apenas tumores hematológicos, mas outros como câncer de pâncreas, pulmão, entre outros[261,262].

O gene *MGMT* e sua proteína são frequentemente estudados em neoplasias devido ao seu impacto prognóstico e preditor de resposta a agentes alquilantes, usualmente utilizados no tratamento do LPSNC. Em nosso estudo, a mediana de expressão gênica do *MGMT* foi zero e nenhum paciente apresentou expressão proteica. É sabido que a metilação da região promotora de MGMT leva à ausência de expressão gênica e proteica, estando associada à patogênese de vários tumores, como carcinoma colorretal, carcinoma de pulmão, linfoma e glioblastoma [179]. Neste estudo, não foi realizada a análise de metilação da região promotora, porém a ausência de expressão proteica bem como a baixa expressão gênica poderiam ser secundárias à metilação da região promotora, com impacto prognóstico e talvez preditor de resposta a tratamentos com regimes alquilantes.

A expressão gênica de *MGMT* ≥0,335666 foi associada a pior prognóstico (SLP, valor p=0,056). No entanto, tais dados precisariam ser confirmados por análise multivariada conjuntamente com o tipo de tratamento recebido pelos pacientes e sua expressão proteica. O gene *MGMT* codifica uma proteína reparadora de DNA, que está associada na defesa celular contra mutagênese e toxicidade celular induzida por agentes alquilantes. Seu silenciamento genético está associado a melhor prognóstico (SG) nos pacientes que receberam quimioterapia com base em HD-MTX [29,176,252].

É sabido que o gene *POU2F1* (OCT1) codifica uma proteína com efeitos tumorigênicos [179]. Por esse motivo, as expressões gênica e proteica de POU2F1 (OCT1) foram analisadas, porém não foram associadas a nenhum dos desfechos clínicos estudados. O papel prognóstico de tal gene é conflitante entre diferentes estudos publicados. Em alguns estudos, a expressão proteica de POU2F1 foi associada à maior agressividade tumoral e pior prognóstico em tumores gástrico, de cólon, de próstata, de pulmão, de mama, entre outros [32]. Em outros estudos, a expressão gênica de *POU2F1* não foi considerada um biomarcador prognóstico [260].

Células cancerígenas apresentam mecanismos de escape ao sistema

imune, os quais têm sido considerados alvos terapêuticos e pesquisados também no LPSNC. A imunoexpressão de PDCD1 e PDL1 tem sido estudada como fator preditor de resposta e prognóstico em diferentes tumores [263,264]. Em nosso estudo, a mediana de expressão gênica de *PDCD1* foi zero, e a maioria dos pacientes (85%) não apresentou imunoexpressão proteica de PDCD1 nas células tumorais. Tais dados são discordantes da literatura. Num estudo com 32 pacientes com LPSNC, a imunoexpressão de PDCD1 no TIL e PDL1 nas células tumorais foi de 53% e de 37%, respectivamente. Num estudo com 20 pacientes, 60% apresentavam imunoexpressão de PDCD1 no TIL intratumoral[265].

No nosso estudo, a hipexpressão gênica de *PDCD1* ≥2,00938 foi associada a maior risco de recaída após tratamento e mortalidade global (valor p ≤0,1). No entanto, a expressão proteica de PDCD1 não foi associada a nenhum dos desfechos clínicos estudados, o que sugere não se tratar de um biomarcador prognóstico na nossa população. Num estudo retrospectivo com 76 pacientes conduzido por Cho *et al*., a expressão proteica de PDCD1 foi associada a piores SG e SLP, o que evidencia papel do microambiente tumoral no prognóstico destes pacientes [266]. Entretanto, o tamanho amostral e o ponto de corte para expressão proteica de PD1 foram diferentes (≥70 células/HPF) entre o nosso estudo e o estudo conduzido por Cho *et al*.

O papel do microambiente tumoral e a presença de TIL também foram estudados na nossa coorte, pela análise das reações de IHQ anti-CD3 previamente disponíveis. O CD3 é um complexo de proteínas transmembrana presente em linfócitos T, importante na ativação de linfócitos T citotóxicos e células T helper. Em nosso estudo, a imunoexpressão de CD3 foi pesquisada retrospectivamente em 92,4% dos pacientes (32/35), resultando ausente na maioria (28/32, 87,5%), conforme esperado no LPSNC subtipo LDCGB. A ausência de imunoexpressão de CD3 foi associada a maior risco de recaída após tratamento e maior mortalidade global (valor p ≤0,1). O complexo de proteínas CD3 é considerado um marcador de linhagem de células T e atua como um correceptor que se associa ao receptor de células T, com papel fundamental na resposta imune adaptativa [267]. Esse complexo está expresso em infiltração perivascular reativa de células T (TIL), sendo caracterizado

também por linfócitos reativos T isolados ou localizados entre parede vascular e as células neoplásicas [90].

Tais dados estão alinhados com a literatura, na qual a presença de infiltrado perivascular reativo de células T é considerado um biomarcador histopatológico de bom prognóstico. Num estudo com 73 pacientes com LPSNC, a presença de infiltrado perivascular de linfócitos T foi associada à melhor SG, independentemente do risco IPI modificado [56]. Importante ressaltar que *Ponzoni et al* realizou a análise qualitativa de TIL, e não quantitativa.

A expressão gênica de *BCL6* não foi associada a nenhum dos desfechos clínicos estudados, e sua expressão proteica não pôde ser estudada devido à falta de material histopatológico. O BCL6 é um importante regulador do sistema imune. Translocações cromossômicas de *BCL6* e de genes da cadeia de imunoglobulina são frequentes no LPSNC, com a ativação constitutiva do BCL6, levando à hiperexpressão gênica e proteica com consequente efeito tumorigênico [148,252,268,269]. Apesar de a imunoexpressão de BCL6 estar presente em aproximadamente 55% do LPSNC [270], sua importância prognóstica ainda é tema de discussão. Alguns estudos evidenciaram que a alta imunoexpressão de BCL6 (positividade nuclear >60%) foi associada a piores prognósticos (SG, SLP)[23,81]. Entretanto, estudos retrospectivos evidenciaram que a imunoexpressão de BCL6 estaria associada a melhor prognóstico (SG) [41].

## 7 CONCLUSÕES

- Com relação à expressão gênica normatizada temos que (em análise univariada): *MYC* ≥0,201041 foi associada a pior prognóstico (piores SG, SG em 2 anos e SLP; maior mortalidade global e risco de recaída); *BCL2* ≥0,3516 não foi considerada fator prognóstico; *LMO2* ≥0,689232 foi associada a melhor prognóstico (melhor SLP); *MGMT* ≥0,335666 foi associada a pior prognóstico (pior SLP); *PDCD1* ≥2,00938 foi associada a pior prognóstico (maior mortalidade global e risco de recaída); *POU2F1* ≥1,44819 e *BCL6* ≥2,73477 não foram consideradas fatores prognósticos;
- As características clínico-laboratoriais e de prognóstico desta coorte foram similares aos da literatura médica disponível. A mediana de idade ao diagnóstico foi de 62 anos, 77% apresentavam acometimento de regiões profundas de SNC ao diagnóstico e 80% apresentavam IPI modificado intermediário-alto. A SG mediana foi de apenas 42,6 meses (IC95% 26,6-58,6 meses), SLP mediana, de 41 meses (IC95% 19,7-62,4 meses) e SLD mediana, de 59,2 meses (IC95% 31,9-86,6 meses);
- Com relação à imunoexpressão proteica, temos que (em análise univariada): MYC >50% não foi considerada fator prognóstico; BCL2 >50% foi associada a pior prognóstico (piores SG e SLP; maior mortalidade global); LMO2 >25% foi associada a melhor desfecho clínico (melhor SG em 2 anos e menor mortalidade em 2 anos); expressão de MGMT, POU2F1 e PDCD1 não foram considerados fatores prognósticos e
- Houve correlação moderada entre a imunoexpressão proteica e a expressão gênica de MYC, bem como de BCL2.

# 8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1- Criação de banco de dados de pacientes do Serviço de Hematologia da FMUSP;
2- Realização de estudos retrospectivos multicêntricos em população brasileira, com uma coorte maior e realização de análises multivariadas e
3- Validação dos resultados encontrados em estudos prospectivos com LPSNC.

# 9 ANEXOS

**ANEXO A -** Características clínico-laboratoriais por paciente

(continua)

| | | | Pacientes que Evoluíram a Óbito | | | Pacientes vivos | | Características Clínicas | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pacientes | sexo | idade diagnóstico (anos) | óbito (a) | idade óbito (anos) | tempo entre diagnóstico e óbito meses | idade última consulta (anos) | tempo entre diagnóstico e última consulta (meses) | RISCO IPI modificado (b) | P.S inicial (c) | P.S inicial ≥2? (a) | Acometimento de regiões profundas em SNC? (a) | Citologia LCR positiva? (a) | Presença de HIC? (a) |
| P1 | 0 | 47,2 | 0 | | | 58,8 | 139,7 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| P2 | 0 | 54,0 | 1 | 54,6 | 7,3 | | | 2 | 4 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| P3 | 0 | 75,5 | 1 | 81,0 | 66,3 | | | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P4 | 0 | 67,9 | 1 | 75,6 | 92,4 | | | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| P6 | 1 | 62,0 | 0 | | | 68,1 | 73,8 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P7 | 1 | 82,2 | 1 | 82,4 | 2,4 | | | 2 | 4 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| P8 | 0 | 49,9 | 1 | 51,9 | 24,1 | | | 1 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| P9 | 0 | 72,9 | 1 | 79,3 | 76,6 | | | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| P10 | 1 | 61,1 | 1 | 61,2 | 1,1 | | | 2 | 3 | 1 | 0 | 2 | 1 |
| P11 | 1 | 78,7 | 1 | 81,1 | 28,5 | | | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| P13 | 1 | 49,8 | 1 | 53,2 | 41,0 | | | 2 | 3 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| P14 | 1 | 76,9 | 1 | 80,0 | 36,2 | | | 2 | 3 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| P15 | 1 | 77,5 | 1 | 78,1 | 6,7 | | | 2 | 3 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| P16 | 1 | 64,6 | 1 | 68,2 | 42,6 | | | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| P17 | 1 | 59,9 | 0 | | | 65,5 | 67,8 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| P18 | 1 | 76,6 | 1 | 80,4 | 45,5 | | | 2 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| P19 | 1 | 49,3 | 1 | 54,8 | 66,1 | | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P21 | 1 | 45,7 | 1 | 45,9 | 2,4 | | | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| P22 | 0 | 42,3 | 1 | 47,5 | 62,4 | | | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| P24 | 0 | 59,7 | 1 | 64,7 | 60,7 | | | 1 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| P25 | 1 | 56,5 | 1 | 60,8 | 51,4 | | | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| P26 | 1 | 28,0 | 0 | | | 34,9 | 82,8 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P27 | 1 | 53,1 | 0 | | | 67,4 | 171,8 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| P28 | 0 | 29,7 | 0 | | | 35,5 | 69,4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P30 | 1 | 66,9 | 1 | 69,0 | 24,7 | | | 1 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| P31 | 0 | 62,1 | 1 | 66,1 | 48,0 | | | 2 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| P32 | 1 | 66,2 | 1 | 67,6 | 17,2 | | | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| P36 | 0 | 41,2 | 0 | | | 45,3 | 49,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P37 | 1 | 65,9 | 1 | 66,9 | 12,6 | | | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| P40 | 0 | 83,9 | 1 | 84,2 | 3,7 | | | 2 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| P41 | 0 | 26,2 | 0 | | | 28,4 | 27,0 | 2 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| P42 | 1 | 73,6 | 0 | | | 74,9 | 16,1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| P43 | 1 | 69,0 | 1 | 69,3 | 3,7 | | | 1 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| P44 | 0 | 72,5 | 1 | 72,9 | 4,7 | | | 1 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| P51 | 0 | 56,6 | 1 | 57,2 | 7,7 | | | 1 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 |

a) 0= não, 1= sim; b) risco IPI modificado- Ferreri et al, 2003; c) PS inicial- Oken et al, 1982; d) 0= 0%, 1= entre 1% e 25%, 2= entre 26% e 50%, 3= entre 51% e 75%, 4= entre 76% e 100%, 5= Não Avaliável; e) 0= negativo, 1= positivo, 2= Não Avaliável; f) conforme critério de Hans, 0= GCB, 1= Não-GCB, 2= Não Avaliável; g) média da expressão gênica normatizada para os genes de interesse; h) 0= Resposta Completa, 1= Resposta Parcial, 2= Progressão de Doença, 3= Não Disponível; i) valores em branco correspondem a amostras não amplificadas

Características clínico-laboratoriais por paciente

(continuação)

| | Imuno-histoquímica das Proteínas de Interesse | | | | | | Imuno-histoquímica de Outras Proteínas Disponíveis (conforme disponibilidade e realização prévia) | | | | | | | Célula de Origem |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pacientes | anti-MYC (d) | anti-MGMT (d) | anti-PDCD1 (d) | anti-BCL2 (d) | anti-LMO2 (d) | anti-POU2F1 (d) | anti-CD20 (e) | anti-CD3 (e) | anti-CD56 (e) | Ki67 (e) | anti-BCL6 (e) | anti-CD10 (e) | anti-MUM1 (e) | COO SUBTIPO (f) |
| P1 | 2 | 0 | 0 | 4 | 2 | 4 | 1 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P2 | 1 | 5 | 0 | 4 | 4 | 3 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| P3 | 5 | 0 | 0 | 3 | 3 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P4 | 2 | 0 | 1 | 4 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P6 | 3 | 0 | 0 | 1 | 4 | 4 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| P7 | 3 | 0 | 0 | 4 | 1 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 |
| P8 | 4 | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | 1 |
| P9 | 4 | 0 | 0 | 4 | 3 | 4 | 1 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P10 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P11 | 4 | 0 | 0 | 3 | 3 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P13 | 3 | 0 | 0 | 4 | 2 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P14 | 4 | 0 | 0 | 4 | 3 | 4 | 1 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P15 | 4 | 0 | 4 | 4 | 0 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P16 | 1 | 0 | 0 | 3 | 4 | 4 | 1 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P17 | 2 | 0 | 1 | 2 | 2 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| P18 | 4 | 0 | 0 | 4 | 2 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P19 | 4 | 0 | 0 | 4 | 2 | 4 | 1 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P21 | 4 | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 |
| P22 | 3 | 0 | 0 | 4 | 4 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| P24 | 4 | 0 | 0 | 4 | 3 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P25 | 4 | 0 | 0 | 1 | 4 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| P26 | 1 | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 2 | 2 |
| P27 | 4 | 0 | 0 | 2 | 0 | 4 | 1 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P28 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| P30 | 3 | 5 | 0 | 4 | 0 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P31 | 3 | 0 | 0 | 3 | 3 | 4 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| P32 | 4 | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P36 | 3 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P37 | 2 | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| P40 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 | 1 | 1 |
| P41 | 3 | 0 | 0 | 4 | 4 | 4 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 1 |
| P42 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P43 | 4 | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| P44 | 1 | 0 | 0 | 3 | 0 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| P51 | 1 | 0 | 0 | 3 | 5 | 4 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |

a) 0= não, 1= sim; b) risco IPI modificado- Ferreri et al, 2003; c) PS inicial- Oken et al, 1982; d) 0= 0%, 1= entre 1% e 25%, 2= entre 26% e 50%, 3= entre 51% e 75%, 4= entre 76% e 100%, 5= Não Avaliável; e) 0= negativo, 1= positivo, 2= Não Avaliável; f) conforme critério de Hans, 0= GCB, 1= Não-GCB, 2= Não Avaliável; g) média da expressão gênica normatizada para os genes de interesse; h) 0= Resposta Completa, 1= Resposta Parcial, 2= Progressão de Doença, 3= Não Disponível; i) valores em branco correspondem a amostras não amplificadas

Características clínico-laboratoriais por paciente

(continuação)

| | Expressão Normatizada dos Genes de Interesse | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pacientes | MYC média (g) (i) | MGMT média (g) (i) | PDCD1 média (g) (i) | BCL2 média (g) (i) | LMO2 média (g) (i) | POU2F1 média (g) (i) | BCL6 média (g) (i) |
| P1 | 0,110 | 0,000 | 0,000 | 0,091 | 0,689 | 0,000 | 1,203 |
| P2 | | | | | | | |
| P3 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,130 | 2,576 | 4,386 | 4,923 |
| P4 | 0,000 | 0,336 | 0,000 | 0,645 | 0,157 | 1,568 | 1,703 |
| P6 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,197 | 7,140 | 0,000 | 3,297 |
| P7 | 0,341 | 0,000 | 0,000 | 1,842 | 0,138 | 1,722 | 3,277 |
| P8 | 0,235 | 0,000 | 0,000 | 2,205 | 0,000 | 0,000 | 0,648 |
| P9 | | | | | | | |
| P10 | 0,202 | 1,418 | 1,035 | 0,766 | 4,078 | 1,033 | 3,787 |
| P11 | 0,235 | 0,000 | 9,215 | 0,352 | 10,973 | 0,000 | 8,337 |
| P13 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 3,122 | 0,000 |
| P14 | 0,304 | 0,000 | 0,000 | 0,081 | 1,636 | 6,141 | 2,716 |
| P15 | 0,412 | 0,000 | 0,000 | 0,528 | 0,947 | 2,783 | 2,735 |
| P16 | | | | | | | |
| P17 | 0,030 | 0,011 | 0,000 | 0,079 | 1,991 | 1,448 | 0,639 |
| P18 | 0,371 | 0,000 | 0,000 | 1,472 | 0,451 | 0,000 | 1,113 |
| P19 | | | | | | 0,000 | 0,000 |
| P21 | | | | | | 0,000 | 0,000 |
| P22 | 0,475 | 0,000 | 1,730 | 5,566 | 17,506 | 1,683 | 7,376 |
| P24 | | | | | | | |
| P25 | | | | | | | |
| P26 | 0,000 | 0,000 | 6,405 | 1,159 | 1,051 | 6,301 | 9,091 |
| P27 | | | | | | | |
| P28 | | | | | | | |
| P30 | | | | | | | |
| P31 | | | | | | | |
| P32 | | | | | | | |
| P36 | | | | | | | |
| P37 | 0,070 | 0,218 | 0,000 | 0,324 | 0,065 | 4,481 | 1,640 |
| P40 | 0,214 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,436 | 0,000 | 0,271 |
| P41 | 0,641 | 0,070 | 4,159 | 0,652 | 7,785 | 0,000 | 5,446 |
| P42 | 0,198 | 2,524 | 2,663 | 1,189 | 13,780 | 2,828 | 3,346 |
| P43 | 0,201 | 10,072 | 2,009 | 0,564 | 6,560 | 2,134 | 3,427 |
| P44 | 0,178 | 1,318 | 0,592 | 1,194 | 3,463 | 0,568 | 1,705 |
| P51 | | | | | | | |

a) 0= não, 1= sim; b) risco IPI modificado- Ferreri et al, 2003; c) PS inicial- Oken et al, 1982; d) 0= 0%, 1= entre 1% e 25%, 2= entre 26% e 50%, 3= entre 51% e 75%, 4= entre 76% e 100%, 5= Não Avaliável; e) 0= negativo, 1= positivo, 2= Não Avaliável; f) conforme critério de Hans, 0= GCB, 1= Não-GCB, 2= Não Avaliável; g) média da expressão gênica normatizada para os genes de interesse; h) 0= Resposta Completa, 1= Resposta Parcial, 2= Progressão de Doença, 3= Não Disponível; i) valores em branco correspondem a amostras não amplificadas

#o valor 0,000 corresponde à ausência absoluta de expressão gênica, portanto um valor a ser considerado.

##NA- corresponde a reações de RT-qPCR que foram consideradas como não avaliáveis.

Características clínico-laboratoriais por paciente

(continuação)

| | Informações sobre Primeira Linha de Tratamento | | | | | | | | | Informações sobre Segunda Linha de Tratamento | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pacientes | TTO 1 Linha (a) | idade no TTO1 (anos) | Recebeu HD-MTX? (a) | duração TTO1 (meses) | melhor resposta clínica (h) | Apresentou PD? (a) | tempo entre final TTO 1 e PD (meses) | Recaída? (a) | Refratariedade? (a) | TTO 2 Linha (a) | Recebeu HD-MTX? (a) | idade no TTO2 (anos) | duração TTO2 (meses) | melhor resposta clínica (h) | Apresentou PD? (a) | tempo entre final TTO 2 e PD (meses) |
| P1 | 1 | 47,3 | 1 | 9,13 | 0 | 0 | | 0 | 0 | | | | | | | |
| P2 | 1 | 54,1 | 1 | 2,03 | 0 | 0 | | 0 | 0 | | | | | | | |
| P3 | 1 | 75,6 | 1 | 3,97 | 1 | 1 | 32,7 | | 0 | 1 | 1 | 78,7 | 2,5 | 1 | 1 | 11,9 |
| P4 | 1 | 67,9 | 1 | 5,00 | 1 | 1 | 21,0 | | 0 | 1 | 1 | 70,0 | 8,7 | 1 | 1 | 15,3 |
| P6 | 1 | 62,2 | 1 | 5,30 | 0 | 1 | 60,2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 67,7 | 2,8 | 0 | 0 | |
| P7 | 1 | 82,3 | 1 | 0,70 | 2 | 1 | 1,0 | | 1 | | | | | | | |
| P8 | 1 | 50,0 | 1 | 4,00 | 2 | 1 | 1,1 | | 1 | 1 | 0 | 50,4 | 1,0 | 0 | 1 | 10,8 |
| P9 | 1 | 73,0 | 0 | 5,00 | 0 | 0 | | 0 | 0 | | | | | | | |
| P10 | 1 | 61,2 | 1 | 0,13 | 2 | 1 | 0,0 | | 1 | | | | | | | |
| P11 | 1 | 78,8 | 1 | 5,50 | 1 | 1 | 17,8 | | 0 | 1 | 0 | 80,8 | 1,5 | 2 | 1 | 0,0 |
| P13 | 1 | 49,9 | 1 | 8,73 | 0 | 0 | | 0 | 0 | | | | | | | |
| P14 | 1 | 77,0 | 1 | 3,20 | 0 | 0 | | 0 | 0 | | | | | | | |
| P15 | 1 | 77,6 | 0 | 1,00 | 2 | 1 | 5,0 | | 1 | | | | | | | |
| P16 | 1 | 64,7 | 1 | 3,83 | 0 | 1 | 37,9 | 1 | 0 | | | | | | | |
| P17 | 1 | 60,1 | 1 | 5,97 | 0 | 0 | | 0 | 0 | | | | | | | |
| P18 | 1 | 76,8 | 1 | 0,60 | 0 | 1 | 42,4 | 1 | 0 | | | | | | | |
| P19 | 1 | 49,4 | 1 | 6,33 | 0 | 0 | | 0 | 0 | | | | | | | |
| P21 | 1 | 45,8 | 0 | 0,73 | 2 | 1 | 0,0 | | 1 | | | | | | | |
| P22 | 1 | 42,3 | 1 | 11,00 | 1 | 1 | 42,4 | | 0 | 1 | 1 | 46,9 | 4,5 | 2 | 1 | 0,8 |
| P24 | 1 | 59,8 | 1 | 5,80 | 1 | 1 | 49,0 | | 0 | 1 | 0 | 64,5 | 0,7 | 2 | 1 | 2,2 |
| P25 | 1 | 56,7 | 1 | 5,50 | 1 | 1 | 8,6 | | 0 | 1 | 1 | 58,1 | 4,2 | 1 | 1 | 20,0 |
| P26 | 1 | 28,1 | 1 | 2,27 | 1 | 0 | | | 0 | | | | | | | |
| P27 | 1 | 53,2 | 1 | 7,00 | 0 | 0 | | 0 | 0 | | | | | | | |
| P28 | 1 | 29,9 | 1 | 6,40 | 0 | 0 | | 0 | 0 | | | | | | | |
| P30 | 1 | 67,0 | 1 | 1,73 | 2 | 1 | 1,3 | | 1 | 1 | 0 | 67,2 | 1,0 | 2 | 1 | 0,9 |
| P31 | 1 | 62,1 | 1 | 7,47 | 0 | 0 | | 0 | 0 | | | | | | | |
| P32 | 1 | 66,3 | 1 | 2,20 | 2 | 1 | 0,4 | | 1 | 1 | 0 | 66,5 | 1,2 | 1 | 0 | |
| P36 | 1 | 41,4 | 1 | 6,90 | 0 | 0 | | 0 | 0 | | | | | | | |
| P37 | 1 | 66,1 | 0 | 2,37 | 1 | 0 | | | 0 | | | | | | | |
| P40 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | |
| P41 | 1 | 26,3 | 1 | 6,87 | 0 | 0 | | 0 | 0 | | | | | | | |
| P42 | 1 | 73,7 | 1 | 0,47 | 1 | 0 | | | 0 | | | | | | | |
| P43 | 1 | 69,2 | 0 | 1,07 | 2 | 1 | 0,0 | | 1 | | | | | | | |
| P44 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | |
| P51 | 1 | 56,7 | 1 | 3,27 | 2 | 1 | 3,4 | | 1 | | | | | | | |

a) 0= não, 1= sim; b) risco IPI modificado- Ferreri et al, 2003; c) PS inicial- Oken et al, 1982; d) 0= 0%, 1= entre 1% e 25%, 2= entre 26% e 50%, 3= entre 51% e 75%, 4= entre 76% e 100%, 5= Não Avaliável; e) 0= negativo, 1= positivo, 2= Não Avaliável; f) conforme critério de Hans, 0= GCB, 1= Não-GCB, 2= Não Avaliável; g) média da expressão gênica normatizada para os genes de interesse; h) 0= Resposta Completa, 1= Resposta Parcial, 2= Progressão de Doença, 3= Não Disponível; i) valores em branco correspondem a amostras não amplificadas

Características clínico-laboratoriais por paciente

(continuação)

| | Informações sobre Terceira Linha de Tratamento | | | | | | | Informações sobre Quarta Linha de Tratamento | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pacientes | TTO 3 Linha (a) | Recebeu HD-MTX? (a) | idade no TTO3 (anos) | duração TTO3 (meses) | melhor resposta clínica (h) | Apresentou PD? (a) | tempo entre final TTO 3 e PD (meses) | TTO 4 Linha (a) | Recebeu HD-MTX? (a) | idade no TTO4 (anos) | duração TTO4 (meses) | melhor resposta clínica (h) | Apresentou PD? (a) | tempo final TTO 4 e PD (meses) |
| P1 | | | | | | | | | | | | | | |
| P2 | | | | | | | | | | | | | | |
| P3 | 1 | 1 | 79,9 | 6,2 | 1 | 1 | 6,9 | | | | | | | |
| P4 | 1 | 1 | 72,0 | 6,0 | 1 | 1 | 13,0 | 1 | 1 | 73,1 | 9,0 | 0 | 1 | 6,8 |
| P6 | | | | | | | | | | | | | | |
| P7 | | | | | | | | | | | | | | |
| P8 | 1 | 1 | 51,4 | 4,4 | 2 | 1 | 0,6 | 1 | 0 | 51,8 | 0,4 | 2 | 1 | 0,3 |
| P9 | | | | | | | | | | | | | | |
| P10 | | | | | | | | | | | | | | |
| P11 | | | | | | | | | | | | | | |
| P13 | | | | | | | | | | | | | | |
| P14 | | | | | | | | | | | | | | |
| P15 | | | | | | | | | | | | | | |
| P16 | | | | | | | | | | | | | | |
| P17 | | | | | | | | | | | | | | |
| P18 | | | | | | | | | | | | | | |
| P19 | | | | | | | | | | | | | | |
| P21 | | | | | | | | | | | | | | |
| P22 | 1 | 1 | 47,3 | 1,4 | 2 | 1 | 0,3 | | | | | | | |
| P24 | | | | | | | | | | | | | | |
| P25 | 1 | 0 | 60,3 | 8,1 | 2 | 1 | 0,2 | | | | | | | |
| P26 | | | | | | | | | | | | | | |
| P27 | | | | | | | | | | | | | | |
| P28 | | | | | | | | | | | | | | |
| P30 | | | | | | | | | | | | | | |
| P31 | | | | | | | | | | | | | | |
| P32 | | | | | | | | | | | | | | |
| P36 | | | | | | | | | | | | | | |
| P37 | | | | | | | | | | | | | | |
| P40 | | | | | | | | | | | | | | |
| P41 | | | | | | | | | | | | | | |
| P42 | | | | | | | | | | | | | | |
| P43 | | | | | | | | | | | | | | |
| P44 | | | | | | | | | | | | | | |
| P51 | | | | | | | | | | | | | | |

a) 0= não, 1= sim; b) risco IPI modificado- Ferreri et al, 2003; c) PS inicial- Oken et al, 1982; d) 0= 0%, 1= entre 1% e 25%, 2= entre 26% e 50%, 3= entre 51% e 75%, 4= entre 76% e 100%, 5= Não Avaliável; e) 0= negativo, 1= positivo, 2= Não Avaliável; f) conforme critério de Hans, 0= GCB, 1= Não-GCB, 2= Não Avaliável; g) média da expressão gênica normatizada para os genes de interesse; h) 0= Resposta Completa, 1= Resposta Parcial, 2= Progressão de Doença, 3= Não Disponível; i) valores em branco correspondem a amostras não amplificadas

Características clínico-laboratoriais por paciente

(conclusão)

| | Informações sobre Quarta Linha de Tratamento | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pacientes | TTO 5 Linha (a) | Recebeu HD-MTX? (a) | idade no TTO5 (anos) | duração TTO5 (meses) | melhor resposta clínica (h) | Recebeu algum tratamento radioterápico? (a) | TMO? (a) |
| P1 | | | | | | 1 | 0 |
| P2 | | | | | | 0 | 0 |
| P3 | | | | | | 1 | 0 |
| P4 | 1 | 1 | 74,4 | 5,0 | 0 | 1 | 0 |
| P6 | | | | | | 1 | 0 |
| P7 | | | | | | 0 | 0 |
| P8 | | | | | | 1 | 0 |
| P9 | | | | | | 0 | 0 |
| P10 | | | | | | 0 | 0 |
| P11 | | | | | | 1 | 0 |
| P13 | | | | | | 1 | 0 |
| P14 | | | | | | 0 | 0 |
| P15 | | | | | | 1 | 0 |
| P16 | | | | | | 0 | 0 |
| P17 | | | | | | 1 | 0 |
| P18 | | | | | | 0 | 0 |
| P19 | | | | | | 1 | 0 |
| P21 | | | | | | 0 | 0 |
| P22 | | | | | | 1 | 0 |
| P24 | | | | | | 0 | 0 |
| P25 | | | | | | 1 | 0 |
| P26 | | | | | | 1 | 0 |
| P27 | | | | | | 1 | 0 |
| P28 | | | | | | 1 | 0 |
| P30 | | | | | | 0 | 0 |
| P31 | | | | | | 1 | 0 |
| P32 | | | | | | 0 | 0 |
| P36 | | | | | | 1 | 0 |
| P37 | | | | | | 1 | 0 |
| P40 | | | | | | 0 | 0 |
| P41 | | | | | | 1 | 0 |
| P42 | | | | | | 0 | 0 |
| P43 | | | | | | 1 | 0 |
| P44 | | | | | | 0 | 0 |
| P51 | | | | | | 1 | 0 |

a) 0= não, 1= sim; b) risco IPI modificado- Ferreri et al, 2003; c) PS inicial- Oken et al, 1982; d) 0= 0%, 1= entre 1% e 25%, 2= entre 26% e 50%, 3= entre 51% e 75%, 4= entre 76% e 100%, 5= Não Avaliável; e) 0= negativo, 1= positivo, 2= Não Avaliável; f) conforme critério de Hans, 0= GCB, 1= Não-GCB, 2= Não Avaliável; g) média da expressão gênica normatizada para os genes de interesse; h) 0= Resposta Completa, 1= Resposta Parcial, 2= Progressão de Doença, 3= Não Disponível; i) valores em branco correspondem a amostras não amplificadas

**ANEXO B -** Informações sobre a primeira linha de tratamento oncológico

| | | |
|---|---|---|
| **Número Total de Pacientes** | | |
| | % (n) | 100% (35) |
| **Recebeu 1 linha de tratamento?** | | |
| não | (n) | 5,7% (2) |
| sim | (n) | 94,3% (33) |
| total | (n) | 100% (35) |
| **IDADE (anos)** | | |
| | n | 33 |
| | média (dp) | 59,2 ( 14,91 ) |
| | 1ºq;mediana;3ºq | 49,7 : 61,2 : 71,1 |
| | mín ; máx | 26,3 : 82,3 |
| **MTX Altas Doses** | | |
| não | (n) | 15,2% (5) |
| sim | (n) | 84,8% (28) |
| total | (n) | 100% (33) |
| **Duração TTO1 (meses)** | | |
| | n | 33 |
| | média (dp) | 4,3 ( 2,83 ) |
| | 1ºq;mediana;3ºq | 1,9 : 4,0 : 6,4 |
| | mín ; máx | 0,1 : 11,0 |
| **Melhor Resposta Clínica Durante o Tratamento** | | |
| RC | (n) | 45,5% (15) |
| RP | (n) | 27,3% (9) |
| PD | (n) | 27,3% (9) |
| total | (n) | 100% (33) |
| **Apresentou PD em algum momento?** | | |
| não | (n) | 45,5% (15) |
| sim | (n) | 54,5% (18) |
| total | (n) | 100% (33) |
| **Recaída Após RC** | | |
| não | (n) | 80% (12) |
| sim | (n) | 20% (3) |
| total | (n) | 100% (15) |
| **Refratariedade à Primeira Linha de Tratamento** | | |
| não | (n) | 72,7% (24) |
| sim | (n) | 27,3% (9) |
| total | (n) | 100% (33) |
| **Intervalo entre Final de Tratamento e PD (meses)** | | |
| | n | 18 |
| | média (dp) | 18,0 ( 20,53 ) |
| | 1ºq;mediana;3ºq | 0,8 : 6,8 : 39,1 |
| | mín ; máx | 0,0 : 60,2 |

**ANEXO C -** Valores da expressão normatizada dos genes MYC, BCL2, POU2F1, MGMT, LMO2 e PDCD1 por paciente

(continua)

| Amostra | MYC | PDCD1 | 01/out | MGMT | BCL2 | BCL6 | LMO2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| P1 | 0,1103834 | 0 | **0** | 0 | 0,09072 | 1,20327293 | 0,68923207 |
| P2† | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| P3† | 0 | 0 | 4,385562 | 0 | 0,13021 | 4,92333543 | 2,57602771 |
| P4† | 0 | 0 | 1,567702 | 0,335666 | 0,64488 | 1,70344228 | 0,15703952 |
| P6* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,19728 | 3,29719402 | 7,14032912 |
| P7#† | 0,3405111 | 0 | 1,72209 | 0 | 1,84167 | 3,27660241 | 0,13764646 |
| P8#† | 0,2351414 | 0 | 0 | 0 | 2,2052 | 0,64762351 | 0 |
| P9† | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| P10#† | 0,2017973 | 1,0351888 | 1,033221 | 1,417807 | 0,7658 | 3,787009 | 4,07845604 |
| P11† | 0,2351788 | 9,2146338 | 0 | 0 | 0,3516 | 8,3368464 | 10,9727002 |
| P13† | 0 | 0 | 3122,622 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P14† | 0,3040957 | 0 | 6,14149 | 0 | 0,08092 | 2,715904 | 1,6358415 |
| P15#† | 0,412259 | 0 | 2,783416 | 0 | 0,52765 | 2,73477377 | 0,94713051 |
| P16*† | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| P17 | 0,0301969 | 0 | 1,448191 | 0,010951 | 0,07898 | 0,63889135 | 1,99124978 |
| P18*† | 0,371486 | 0 | 0 | 0 | 1,47173 | 1,11302554 | 0,45144126 |
| P19† | NA | NA | 0 | NA | NA | 0 | NA |
| P21#† | NA | NA | 0 | NA | NA | 0 | NA |
| P22† | 0,4745787 | 1,729677 | 1,682568 | 0 | 5,56582 | 7,37556864 | 17,5060425 |
| P24† | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| P25† | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |

Valores da expressão normatizada dos genes MYC, BCL2, POU2F1, MGMT, LMO2 e PDCD1 por paciente

(conclusão)

| Amostra | MYC | PDCD1 | 01/out | MGMT | BCL2 | BCL6 | LMO2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| P26 | 0 | 6,4048083 | 6,30088 | 0 | 1,15876 | 9,09111926 | 1,05112574 |
| P27 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| P28 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| P30#† | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| P31† | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| P32#† | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| P36 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| P37† | 0,0701626 | 0 | 4,481112 | 0,218243 | 0,32391 | 1,63956511 | 0,06489237 |
| P40† | 0,214366 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,2707965 | 0,43562553 |
| P41 | 0,6413885 | 4,158813 | 0 | 0,070006 | 0,65164 | 5,446246 | 7,78468333 |
| P42 | 0,1977622 | 2,6626342 | 2,827798 | 2,524375 | 1,18919 | 3,3456055 | 13,7798915 |
| P43#† | 0,2010405 | 2,0093818 | 2,134024 | 10,07229 | 0,56432 | 3,42655195 | 6,55950292 |
| P44† | 0,1775013 | 0,5917454 | 0,567903 | 1,31804 | 1,19433 | 1,70547543 | 3,4625705 |
| P51#† | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| | | | | | | | |
| Média | 0,20085 | 1,3241373 | 137,3782 | 0,760352 | 0,90641 | 2,89908039 | 3,87721089 |
| Mediana | 0,2010405 | 0 | 1,448191 | 0 | 0,56432 | 2,715904 | 1,6358415 |

A numeração das amostras seguiu o número original atribuído para a realização desse trabalho, que partir de uma casuística de 51 pacientes.
# Casos refratários primários. *Recaída tardia (>6 meses). † Óbitos durante o tratamento. NA: corresponde a amostras não amplificadas

**ANEXO D -** Comparação entre amostra total e a subamostra (incluídos apenas pacientes com amplificações gênicas avaliáveis)

(continua)

| Variável | | População Global (%/n) | Subamostra (%/n) | Comparação entre os Grupos valor - p |
|---|---|---|---|---|
| **Número de pacientes** | | | | |
| | n | 100% (35) | 60% (21) | |
| **Idade ao diagnóstico (anos)** | | | | teste t- student** |
| | media (dp) | 60,1 ( 15,22 ) | 63,2 ( 16,87 ) | 0,493 |
| **≤ 60 anos** | (n) | 45,7% (16) | 33,3% (7) | 0,412 |
| **> 60 anos** | (n) | 54,3% (19) | 66,7% (14) | |
| **total** | (n) | 100% (35) | 100% (21) | |
| **Sexo** | | | | teste de independência * |
| | frequência | | | 0,785 |
| **masculino** | (n) | 42,9% (15) | 38,1% (8) | |
| **feminino** | (n) | 57,1% (20) | 61,9% (13) | |
| **total** | (n) | 100% (35) | 100% (21) | |
| **Anti-MYC** | | | | teste de independência * |
| | frequência | | | |
| **0%-50%** | (n) | 36,4% (12) | 45% (9) | 0,573 |
| **51%-100%** | (n) | 63,6% (21) | 55% (11) | |
| **total** | (n) | 100% (33) | 100% (20) | |
| **Anti-MGMT** | | | | |
| | frequência | | | |
| **negativo** | (n) | 88,6% (31) | 100% (21) | |
| **positivo** | (n) | 0% (0) | 0% (0) | |
| **total** | (n) | 88,6% (31) | 100% (21) | |
| **Anti-PDCD1** | | | | teste de independência * |
| | frequência | | | 0,823 |
| **negativo** | (n) | 90,9% (30) | 85,7% (18) | |
| **positivo** | (n) | 9,1% (3) | 14,3% (3) | |
| **total** | (n) | 100% (33) | 100% (21) | |
| **Anti-BCL2** | | | | teste de independência * |
| | frequência | | | |
| **0%-50%** | (n) | 15,2% (5) | 14,3% (3) | 1,000 |
| **51%-100%** | (n) | 84,8% (28) | 85,7% (18) | |
| **total** | (n) | 100% (33) | 100% (21) | |

Comparação entre amostra total e a subamostra (incluídos apenas pacientes com amplificações gênicas avaliáveis)

\(continuação

| Variável | | População Global (%/n) | Subamostra (%/n) | Comparação entre os Grupos valor - p |
|---|---|---|---|---|
| **Anti-LMO2** | | | | teste de independência * |
| frequência | | | | |
| **0%-25%** | (n) | 43,8% (14) | 47,6% (10) | 1,000 |
| **26%-100%** | (n) | 56,3% (18) | 52,4% (11) | |
| **total** | (n) | 100% (32) | 100% (21) | |
| **Anti-POU2F1** | | | | teste de independência * |
| frequência | | | | 1,000 |
| **negativo** | (n) | 0% (0) | 0% (0) | |
| **positivo** | (n) | 94,4% (33) | 100% (21) | |
| **Anti-CD20** | | | | |
| frequência | | | | |
| **negativo (0)** | (n) | 0% (0) | 0% (0) | |
| **positivo (1)** | (n) | 100% (35) | 100% (21) | |
| **total** | (n) | 100% (35) | 100% (21) | |
| **Anti-CD3** | | | | teste de independência * |
| frequência | | | | 1,000 |
| **negativo (0)** | (n) | 87,5% (28) | 89,5% (17) | |
| **positivo (1)** | (n) | 12,5% (4) | 10,5% (2) | |
| **total** | (n) | 100% (32) | 100% (19) | |
| **Anti-CD56** | | | | |
| frequência | | | | |
| **negativo (0)** | (n) | 100% (6) | 100% (3) | |
| **positivo (1)** | (n) | 0% (0) | 0% (0) | |
| **total** | (n) | 100% (6) | 100% (3) | |
| **Ki67** | | | | |
| frequência | | | | |
| **negativo (0)** | (n) | 0% (0) | 0% (0) | |
| **positivo (1)** | (n) | 100% (29) | 100% (19) | |
| **total** | (n) | 100% (29) | 100% (19) | |
| **Anti-BCL6** | | | | teste de independência * |
| frequência | | | | 1,000 |
| **negativo (0)** | (n) | 57,1% (8) | 66,7% (6) | |
| **positivo (1)** | (n) | 42,9% (6) | 33,3% (3) | |
| **total** | (n) | 100% (14) | 100% (9) | |

Comparação entre amostra total e a subamostra (incluídos apenas pacientes com amplificações gênicas avaliáveis)

(continuação)

| Variável | | População Global (%/n) | Subamostra (%/n) | Comparação entre os Grupos valor - p |
|---|---|---|---|---|
| **Anti-CD10** | | | | teste de independência * |
| | frequência | | | 1,000 |
| **negativo (0)** | (n) | 73,3% (11) | 70% (7) | |
| **positivo (1)** | (n) | 26,7% (4) | 30% (3) | |
| **total** | (n) | 100% (15) | 100% (10) | |
| **Anti-MUM1** | | | | teste de independência * |
| | frequência | | | 1,000 |
| **negativo (0)** | (n) | 25% (3) | 25% (2) | |
| **positivo (1)** | (n) | 75% (9) | 75% (6) | |
| **total** | (n) | 100% (12) | 100% (8) | |
| **COO Subtipo** | | | | teste de independência * |
| | frequência | | | 1,000 |
| **GCB** | (n) | 26,7% (4) | 30% (3) | |
| **não-GCB** | (n) | 73,3% (11) | 70% (7) | |
| **total** | (n) | 100% (15) | 100% (10) | |
| **Acometimento de regiões profundas SNC** | | | | teste de independência * |
| | frequência | | | 0,508 |
| **não** | (n) | 22,9% (8) | 14,3% (3) | |
| **sim** | (n) | 77,1% (27) | 85,7% (18) | |
| **total** | (n) | 100% (35) | 100% (21) | |
| **LCR** | | | | teste de independência * |
| | frequência | | | 0,622 |
| **citologia negativa** | (n) | 94,1% (32) | 90% (18) | |
| **sim** | (n) | 5,9% (2) | 10% (2) | |
| **total** | (n) | 100% (34) | 100% (20) | |
| **HIC** | | | | teste de independência * |
| | frequência | | | 0,558 |
| **não** | (n) | 71,4% (25) | 61,9% (13) | |
| **sim** | (n) | 28,6% (10) | 38,1% (8) | |
| **total** | (n) | 100% (35) | 100% (21) | |

Comparação entre amostra total e a subamostra (incluídos apenas pacientes com amplificações gênicas avaliáveis)

(continuação)

| Variável | | População Global (%/n) | Subamostra (%/n) | Comparação entre os Grupos valor - p |
|---|---|---|---|---|
| **Idade ao óbito (anos)** | | | | teste t- student** |
| media (dp) | | 67,5 ( 11,63 ) | 71,0 ( 12,25 ) | 0,356 |
| frequência | | | | teste de independência * |
| **≤ 50 anos** | (n) | 26,9% (7) | 20% (3) | 0,458 |
| **50 a 69 anos** | (n) | 34,6% (9) | 20% (3) | |
| **≥ 70 anos** | (n) | 38,5% (10) | 60% (9) | |
| **total** | (n) | 100% (26) | 100% (15) | |
| **Tempo entre diagnóstico e óbito (meses)** | | | | teste t- student** |
| media (dp) | | 32,2 ( 27,10 ) | 28,8 ( 28,20 ) | 0,705 |
| frequência | | | | teste de independência * |
| **≤ 12 meses** | (n) | 34,6% (9) | 40% (6) | 0,916 |
| **12 a 36 meses** | (n) | 19,2% (5) | 20% (3) | |
| **≥ 36 anos** | (n) | 46,2% (12) | 40% (6) | |
| **total** | (n) | 100% (26) | 100% (15) | |
| **Idade na última consulta (anos)** | | | | teste t- student** |
| media (dp) | | 53,2 ( 17,34 ) | 55,1 ( 19,00 ) | 0,844 |
| **Tempo entre diagnóstico e última consulta (meses)** | | | | teste t- student** |
| media (dp) | | 77,5 ( 50,11 ) | 67,9 ( 44,21 ) | 0,709 |
| **Tempo de seguimento (meses)** | | | | teste t- student** |
| media (dp) | | 43,8 ( 39,18 ) | 39,9 ( 37,06 ) | 0,715 |
| **P.S. inicial1** | | | | teste t- student** |
| frequência | | | | teste de independência * |
| **0+1+2** | (n) | 57,1% (20) | 47,6% (10) | 0,584 |
| **3+4** | (n) | 42,9% (15) | 52,4% (11) | |
| **total** | (n) | 100% (35) | 100% (21) | |
| **Risco IPI** | | | | teste de independência * |
| frequência | | | | 0,572 |
| **baixa (0+1)** | (n) | 20% (7) | 9,5% (2) | |
| **intermediário (2+3)** | (n) | 48,6% (17) | 47,6% (10) | |
| **alto (4+5)** | (n) | 31,4% (11) | 42,9% (9) | |
| **total** | (n) | 100% (35) | 100% (21) | |
| frequência | | | | teste de independência * |
| **baixa (0+1)** | (n) | 20% (7) | 9,5% (2) | 0,459 |
| **não baixa (2+3+4+5)** | (n) | 80% (28) | 90,5% (19) | |
| **total** | (n) | 100% (35) | 100% (21) | |

Comparação entre amostra total e a subamostra (incluídos apenas pacientes com amplificações gênicas avaliáveis)

(continuação)

| Variável | | População Global (%/n) | Subamostra (%/n) | Comparação entre os Grupos valor - p |
|---|---|---|---|---|
| **Tratamento com RDT** | | | | teste de independência * |
| frequência | | | | 0,777 |
| **não** | (n) | 40% (14) | 33,4 (7) | |
| **sim** | (n) | 60% (21) | 66,6% (14) | |
| **total** | (n) | 100% (35) | 100% (9) | |
| **Realização DE TMO** | | | | teste de independência * |
| frequência | | | | |
| **não** | (n) | 100% (35) | 100% (21) | |
| **sim** | (n) | 0% (0) | 0% (0) | |
| **total** | (n) | 100% (35) | 100% (21) | |
| **Neurotoxicidades?** | | | | teste de independência * |
| frequência | | | | 0,786 |
| **não** | (n) | 57,1% (20) | 52,4% (11) | |
| **sim** | (n) | 42,9% (15) | 47,6% (10) | |
| **total** | (n) | 100% (35) | 100% (21) | |
| **PRIMEIRA LINHA DE TRATAMENTO ONCOLÓGICO** | | | | |
| **RECEBEU 1ª LINHA?** | | | | teste de independência * |
| frequência | | | | 0,626 |
| **não** | (n) | 5,7% (2) | 9,5% (2) | |
| **sim** | (n) | 94,3% (33) | 90,5% (19) | |
| **total** | (n) | 100% (35) | 100% (21) | |
| **Idade TTO1 (anos)** | | | | teste t- student** |
| | n | 33 | 19 | |
| | media (dp) | 59,2 ( 14,91 ) | 61,7 ( 16,88 ) | 0,576 |
| **HD-MTX 1** | | | | teste de independência * |
| frequência | | | | 1,000 |
| **não** | (n) | 15,2% (5) | 15,8% (3) | |
| **sim** | (n) | 84,8% (28) | 84,2% (16) | |
| **total** | (n) | 100% (33) | 100% (19) | |
| **Duração TTO1 (meses)** | | | | teste t- student** |
| | n | 33 | 19 | |
| | media (dp) | 4,3 ( 2,83 ) | 4,1 ( 3,24 ) | 0,799 |
| frequência | | | | teste de independência * |
| **≤ 4 meses** | (n) | 51,5% (17) | 57,9% (11) | 0,775 |
| **> 4 meses** | (n) | 48,5% (16) | 42,1% (8) | |
| **total** | (n) | 100% (33) | 100% (19) | |

Comparação entre amostra total e a subamostra (incluídos apenas pacientes com amplificações gênicas avaliáveis)

(conclusão)

| Variável | | População Global (%/n) | Subamostra (%/n) | Comparação entre os Grupos valor - p |
|---|---|---|---|---|
| **Resposta à primeira linha de tratamento** | | | | teste de independência * |
| frequência | | | | 0,715 |
| **RC** | (n) | 45,5% (15) | 36,8% (7) | |
| **RP** | (n) | 27,3% (9) | 36,8% (7) | |
| **PD** | (n) | 27,3% (9) | 26,3% (5) | |
| **total** | (n) | 100% (33) | 100% (19) | |
| **Apresentou PD?** | | | | teste de independência * |
| frequência | | | | 1,000 |
| **não** | (n) | 45,5% (15) | 42,1% (8) | |
| **sim** | (n) | 54,5% (18) | 57,9% (11) | |
| **total** | (n) | 100% (33) | 100% (19) | |
| **Recaída?** | | | | teste de independência * |
| frequência | | | | 1,000 |
| **não** | (n) | 80% (12) | 71,4% (5) | |
| **sim** | (n) | 20% (3) | 28,6% (2) | |
| **total** | (n) | 100% (15) | 100% (7) | |
| **Refratariedade?** | | | | teste de independência * |
| frequência | | 0% () | 0% () | 1,000 |
| **não** | (n) | 72,7% (24) | 73,7% (14) | |
| **sim** | (n) | 27,3% (9) | 26,3% (5) | |
| **total** | (n) | 100% (33) | 100% (19) | |
| **Se teve pd depois tto1, tempo entre final tratamento e pd 1 (meses)** | | | | teste t- student** |
| | n | 18 | 11 | |
| | media (dp) | 18,0 ( 20,53 ) | 20,3 ( 21,29 ) | 0,774 |

1ºq med 3ºq - 1ºquartil mediana 3ºquartil ; dp - desvio padrão

*** Teste de independência (teste exato de Fisher)**

**HIPÓTESES DO TESTE** Ho: há independência entre grupo e variável
HA: há associação entre grupo e variável

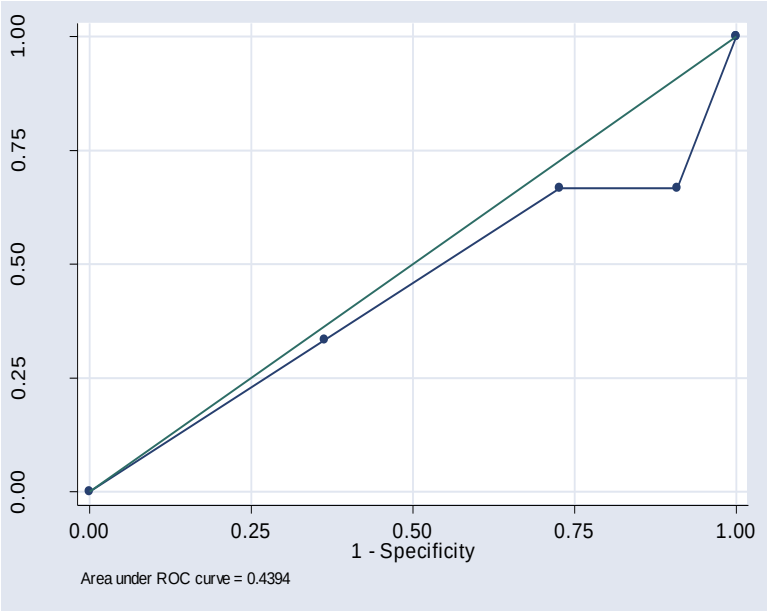
**** Teste T-student**

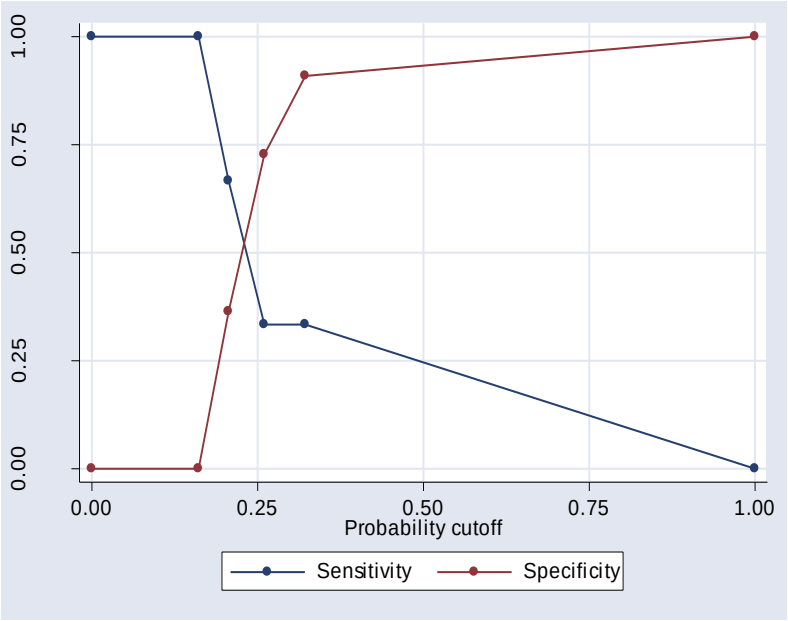
**HIPÓTESES DO TESTE** Ho: as médias dos grupos são iguais
HA: as médias dos grupos são diferentes

**ANEXO E -** Curvas de ROC para expressão da proteína MYC

*Considerando recaída*

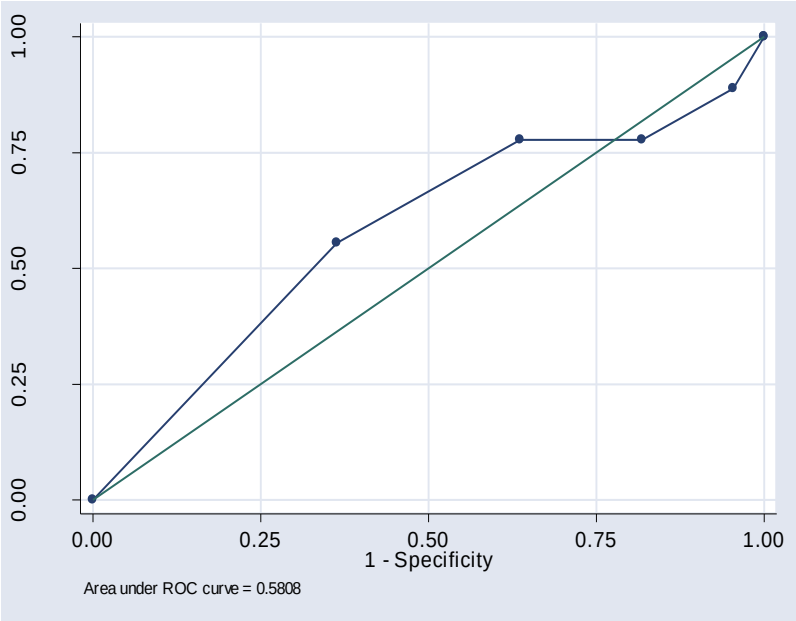
| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 1 ) | 0.00% | 100.00% | 78.57% | | 10 |
| ( >= 2 ) | 33.33% | 63.64% | 57.14% | 0.9167 | 10,476 |
| ( >= 3 ) | 66.67% | 27.27% | 35.71% | 0.9167 | 12,222 |
| ( >= 4 ) | 66.67% | 9.09% | 21.43% | 0.7333 | 36,667 |

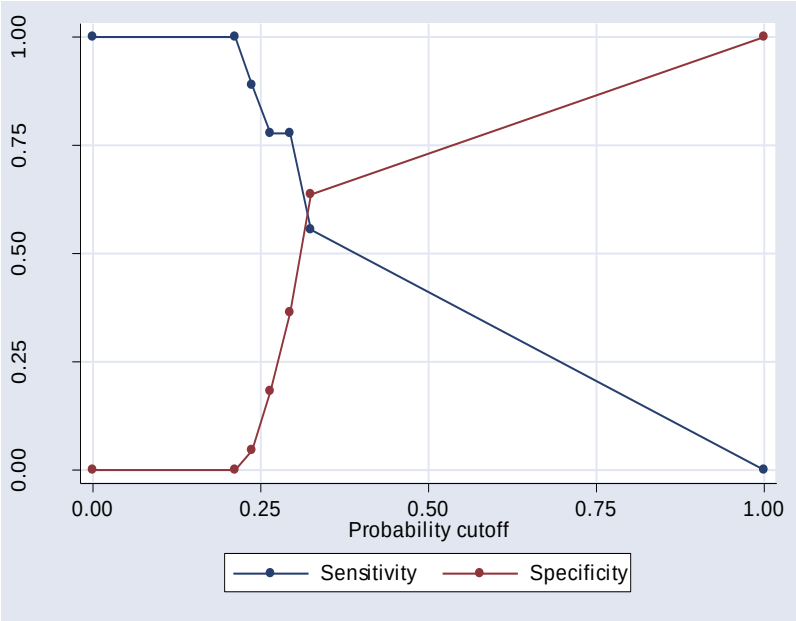


*Considerando refratariedade*

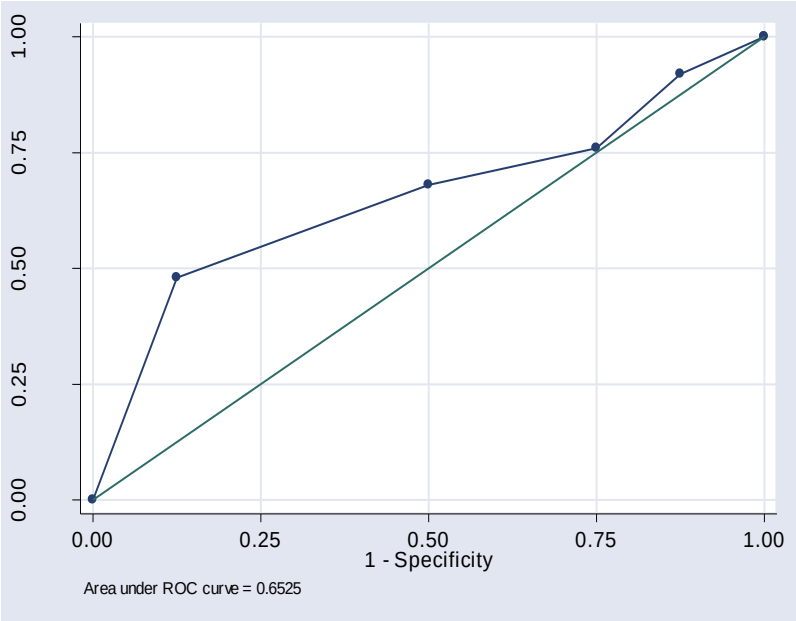
| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 100.00% | 0.00% | 29.03% | 1.0000 | |
| ( >= 1 ) | 88.89% | 4.55% | 29.03% | 0.9312 | 24,444 |
| ( >= 2 ) | 77.78% | 18.18% | 35.48% | 0.9506 | 12,222 |
| ( >= 3 ) | 77.78% | 36.36% | 48.39% | 1.2222 | 0.6111 |
| ( >= 4 ) | 55.56% | 63.64% | 61.29% | 1.5278 | 0.6984 |
| ( > 4 ) | 0.00% | 100.00% | 70.97% | | 10 |

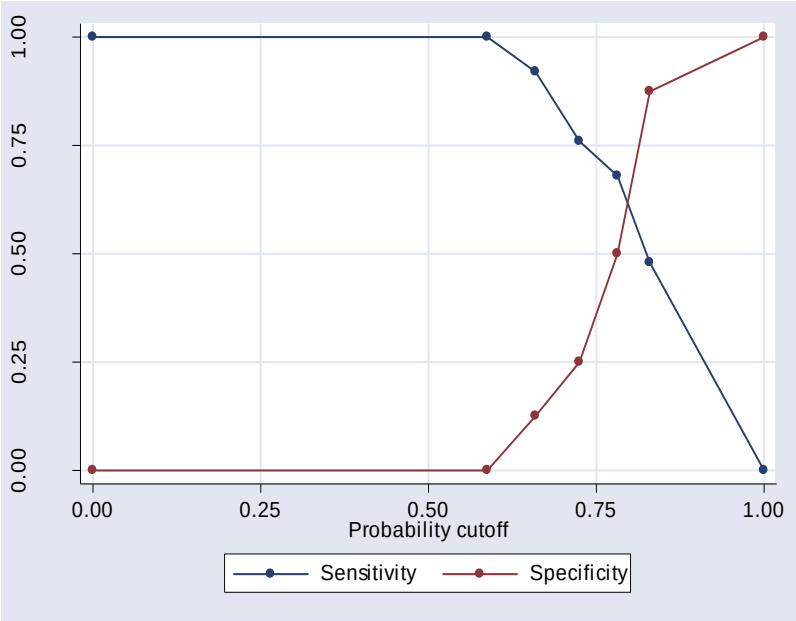


*Considerando óbito*

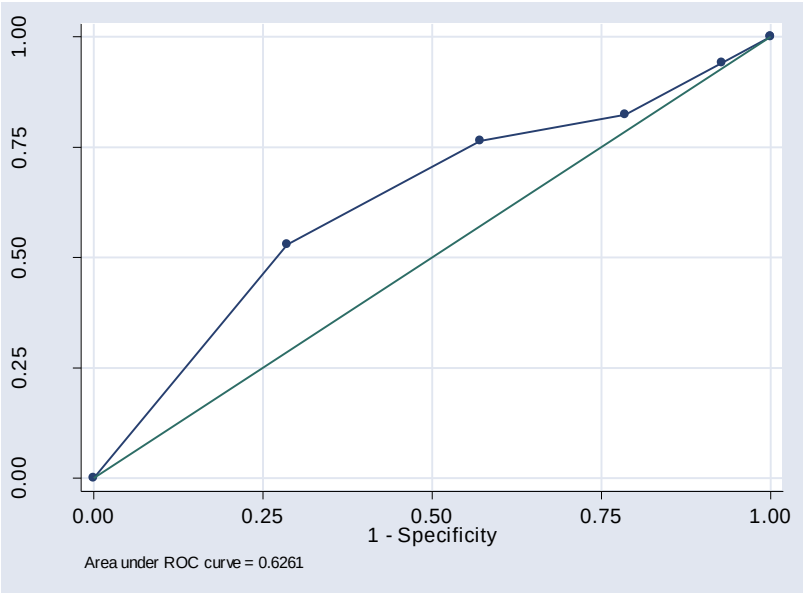
| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 100.00% | 0.00% | 75.76% | 1.0000 | |
| ( >= 1 ) | 92.00% | 12.50% | 72.73% | 1.0514 | 0.6400 |
| ( >= 2 ) | 76.00% | 25.00% | 63.64% | 1.0133 | 0.9600 |
| ( >= 3 ) | 68.00% | 50.00% | 63.64% | 1.3600 | 0.6400 |
| ( >= 4 ) | 48.00% | 87.50% | 57.58% | 3.8400 | 0.5943 |
| ( > 4 ) | 0.00% | 100.00% | 24.24% | | 1.0000 |

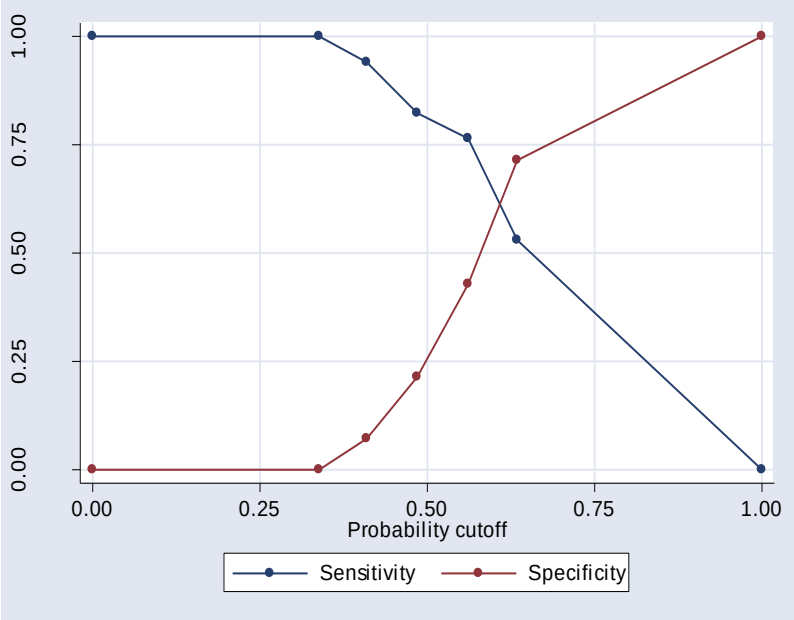


*Considerando progressão da doença*

| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 100.00% | 0.00% | 54.84% | 1.0000 | |
| ( >= 1 ) | 94.12% | 7.14% | 54.84% | 1.0136 | 0.8235 |
| ( >= 2 ) | 82.35% | 21.43% | 54.84% | 1.0481 | 0.8235 |
| ( >= 3 ) | 76.47% | 42.86% | 61.29% | 1.3382 | 0.5490 |
| ( >= 4 ) | 52.94% | 71.43% | 61.29% | 1.8529 | 0.6588 |
| ( > 4 ) | 0.00% | 100.00% | 45.16% | | 10 |

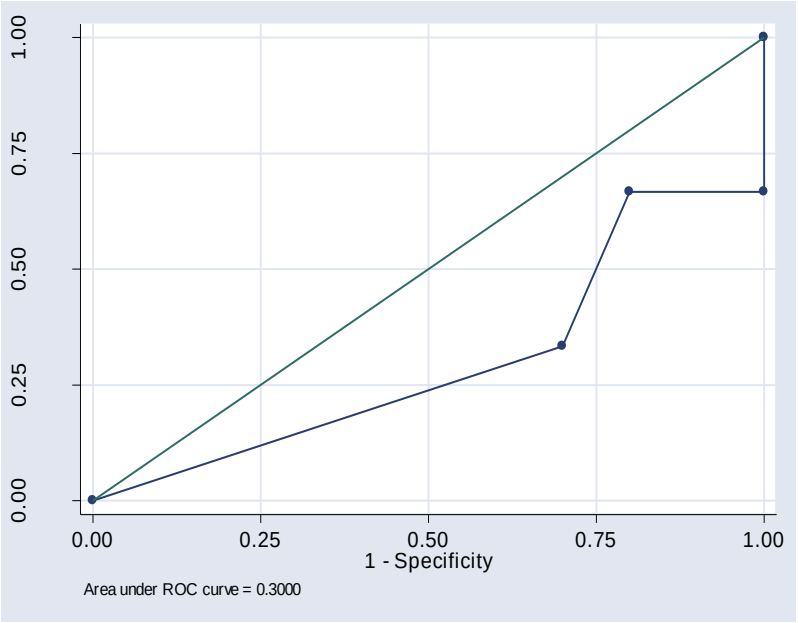


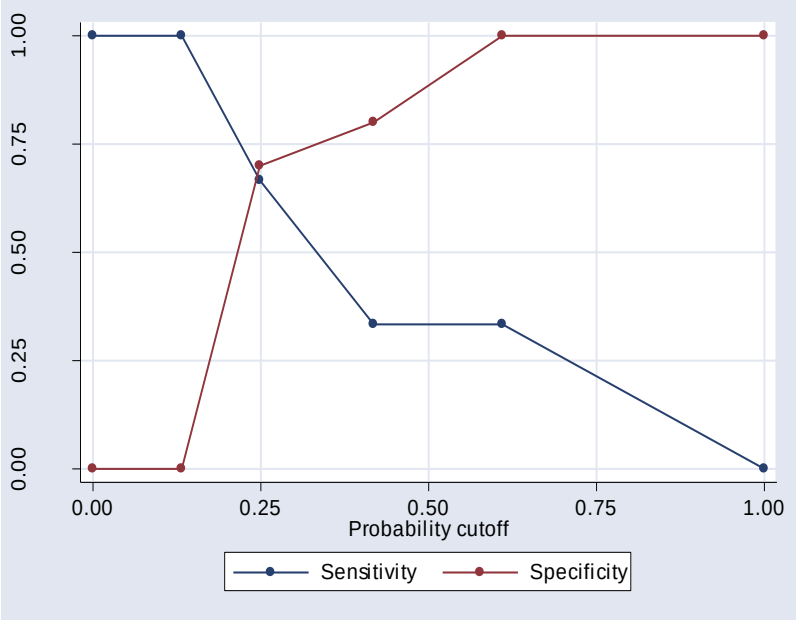



**ANEXO F -** Curva de ROC para expressão da proteína BCL2

*Considerando recaída*

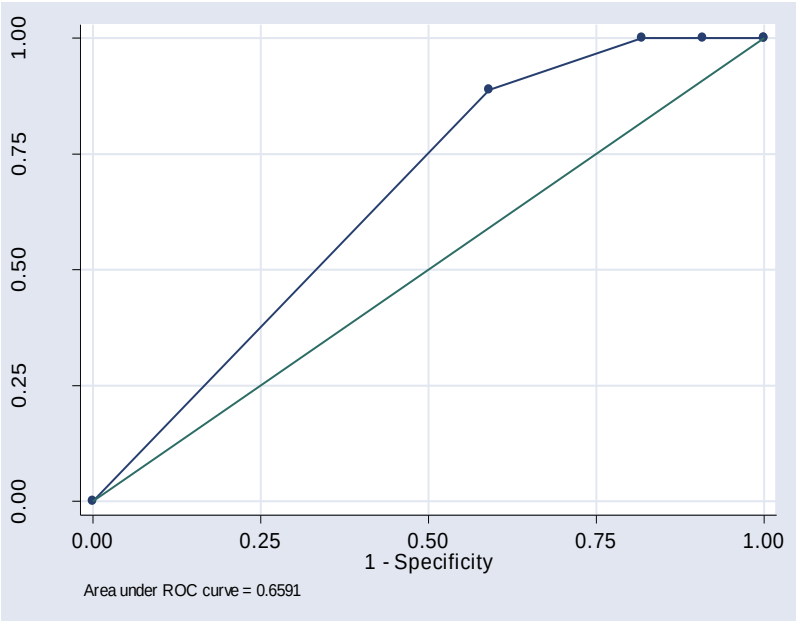
| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 1 ) | 0.00% | 100.00% | 76.92% | | 10 |
| ( >= 2 ) | 33.33% | 30.00% | 30.77% | 0.4762 | 22,222 |
| ( >= 3 ) | 66.67% | 20.00% | 30.77% | 0.8333 | 16,667 |
| ( >= 4 ) | 66.67% | 0.00% | 15.38% | 0.6667 | |
| ( > 4 ) | 100.00% | 0.00% | 23.08% | 1.0000 | |

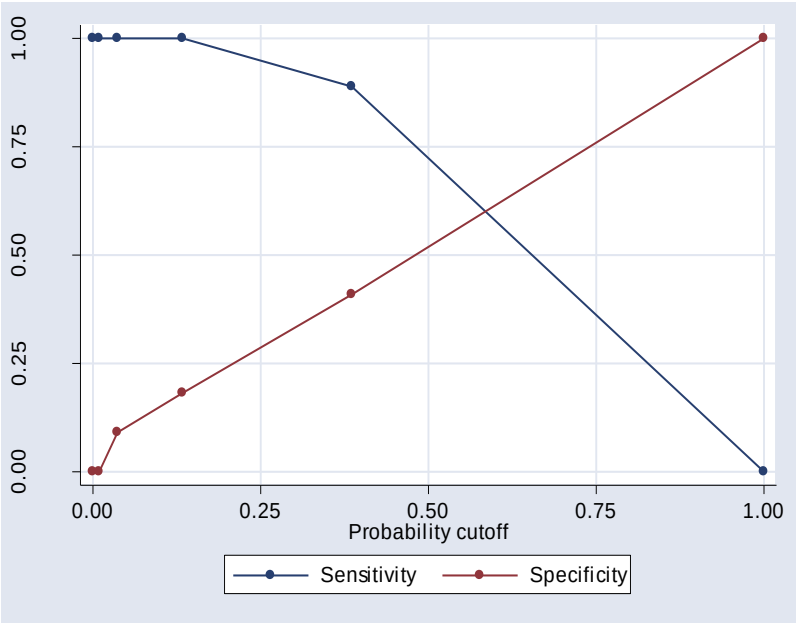


*Considerando refratariedade*

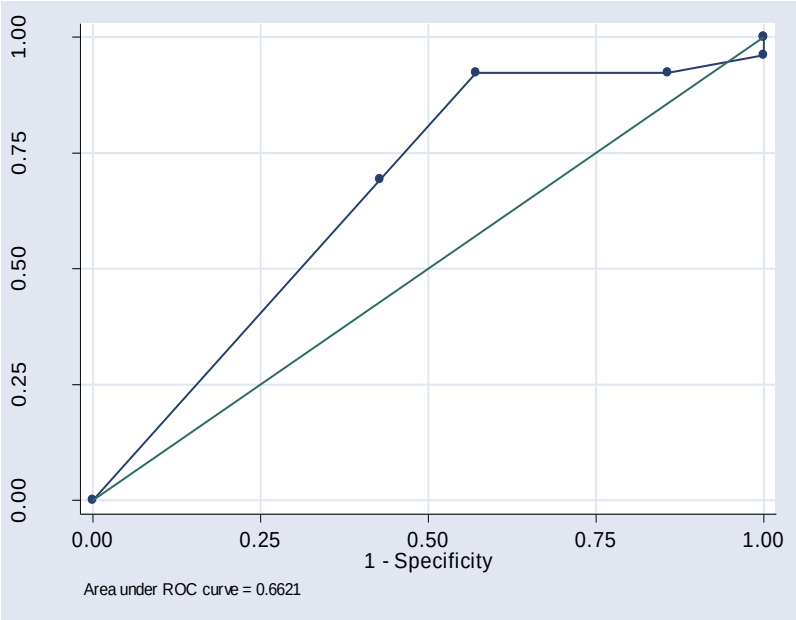
| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 1 ) | 100.00% | 0.00% | 29.03% | 1.0000 | |
| ( >= 2 ) | 100.00% | 9.09% | 35.48% | 1.1000 | 0.0000 |
| ( >= 3 ) | 100.00% | 18.18% | 41.94% | 1.2222 | 0.0000 |
| ( >= 4 ) | 88.89% | 40.91% | 54.84% | 1.5043 | 0.2716 |
| ( > 4 ) | 0.00% | 100.00% | 70.97% | 1.0000 | |

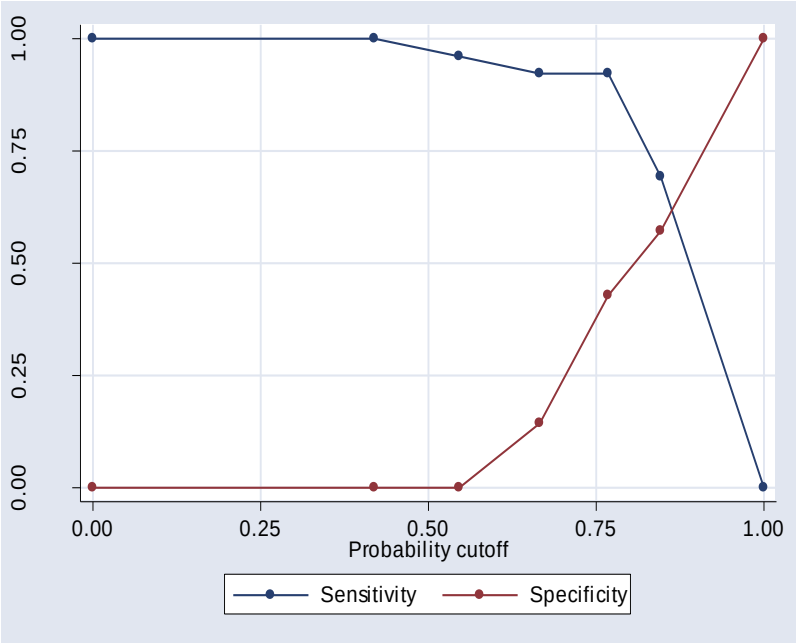


*Considerando óbito*

| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 100.00% | 0.00% | 78.79% | 1.0000 | |
| ( >= 1 ) | 96.15% | 0.00% | 75.76% | 0.9615 | |
| ( >= 2 ) | 92.31% | 14.29% | 75.76% | 1.0769 | 0.5385 |
| ( >= 3 ) | 92.31% | 42.86% | 81.82% | 1.6154 | 0.1795 |
| ( >= 4 ) | 69.23% | 57.14% | 66.67% | 1.6154 | 0.5385 |
| ( > 4 ) | 0.00% | 100.00% | 21.21% | | 10 |

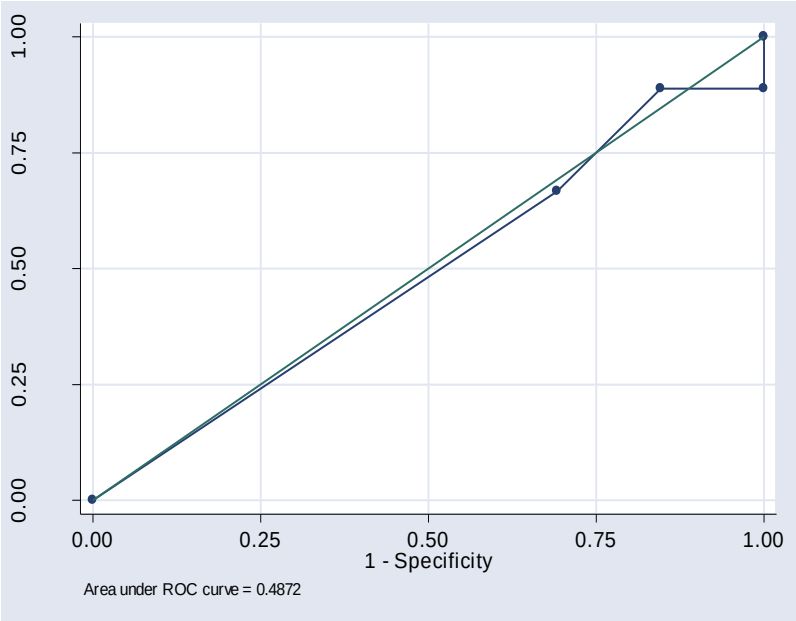


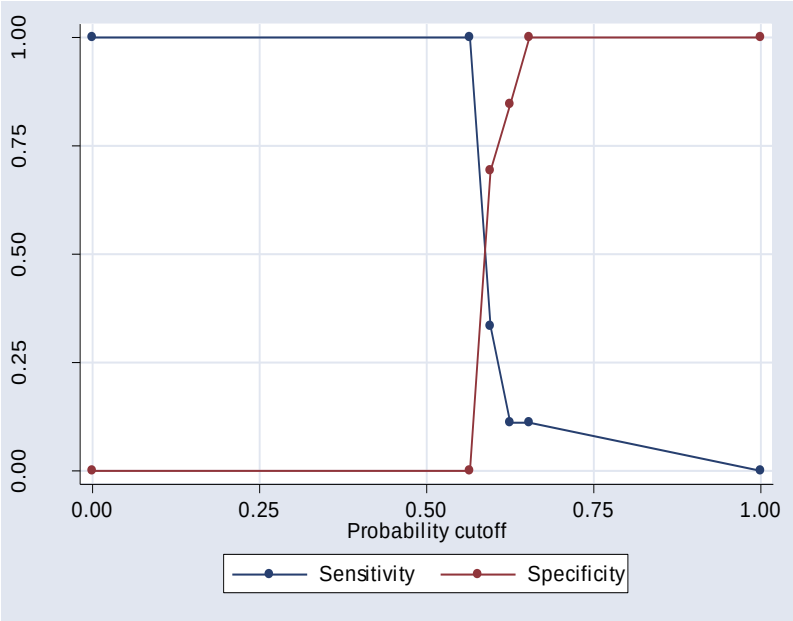




*Considerando progressão de doença*

| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 1 ) | 0.00% | 100.00% | 41.94% | | 10 |
| ( >= 2 ) | 66.67% | 30.77% | 51.61% | 0.9630 | 10.833 |
| ( >= 3 ) | 88.89% | 15.38% | 58.06% | 1.0505 | 0.7222 |
| ( >= 4 ) | 88.89% | 0.00% | 51.61% | 0.8889 | |
| ( > 4 ) | 100.00% | 0.00% | 58.06% | 1.0000 | |

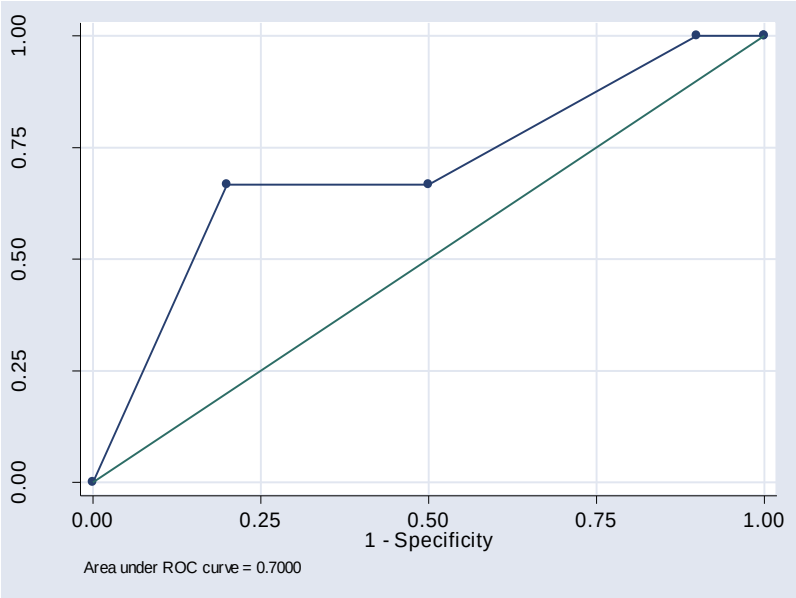


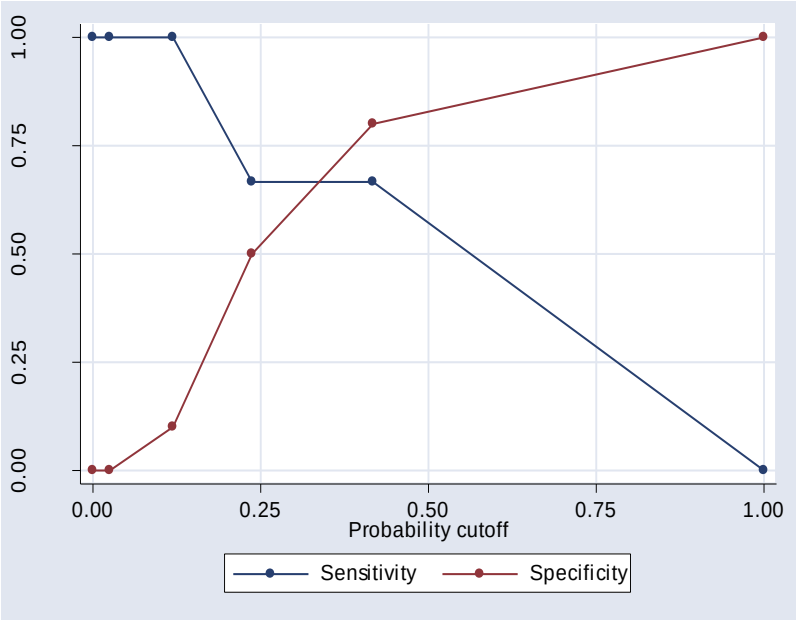



**ANEXO G -** Curva de ROC para expressão da proteína LMO2

*Considerando recaída*

| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 100.00% | 0.00% | 23.08% | 10.000 | |
| ( >= 2 ) | 100.00% | 10.00% | 30.77% | 11.111 | 0.0000 |
| ( >= 3 ) | 66.67% | 50.00% | 53.85% | 13.333 | 0.6667 |
| ( >= 4 ) | 66.67% | 80.00% | 76.92% | 33.333 | 0.4167 |
| ( >= 4 ) | 0.00% | 100.00% | 76.92% | | 10 |

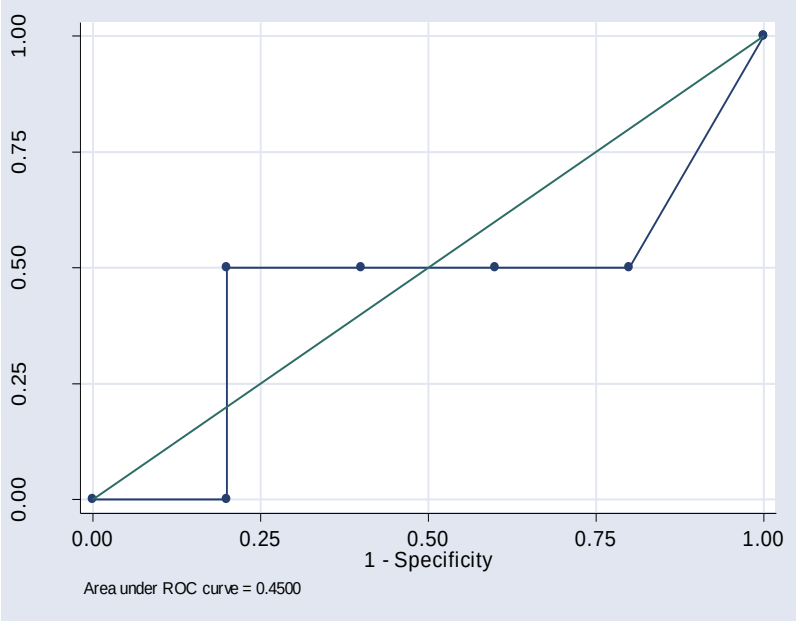


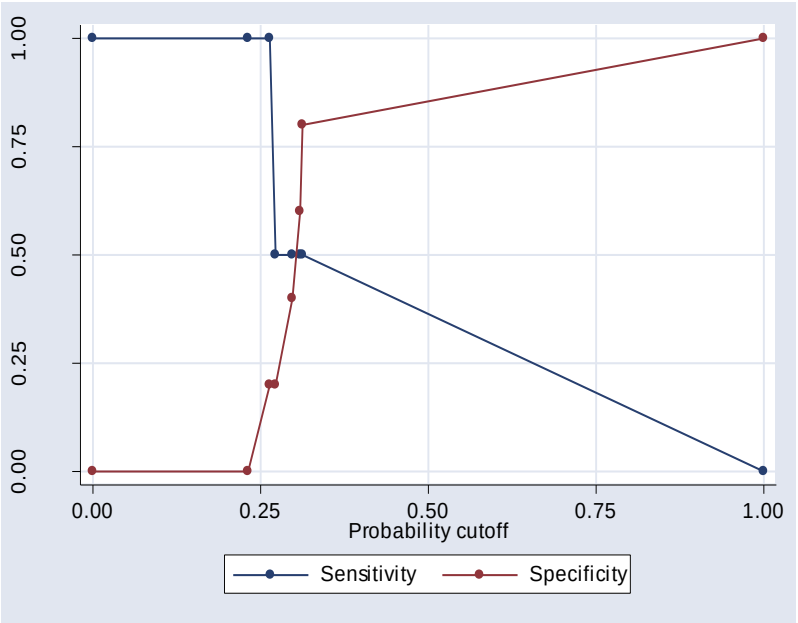



**ANEXO H -** Curvas de ROC para a expressão normatizada do gene MYC

Considerando recaída

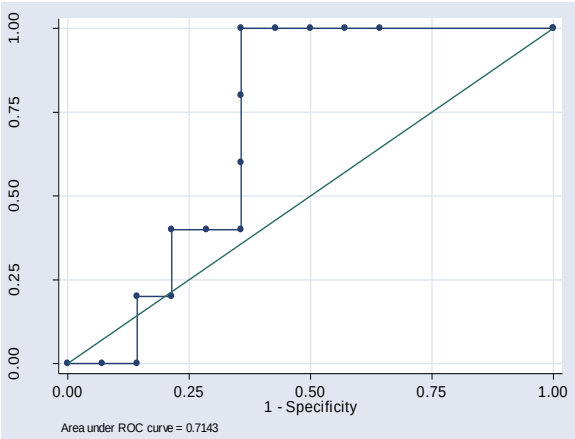
| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 0.00% | 100.00% | 71.43% | | 10.000 |
| ( >= .030197 ) | 0.00% | 80.00% | 57.14% | 0.0000 | 12.500 |
| ( >= .110383 ) | 50.00% | 80.00% | 71.43% | 2.5000 | 0.6250 |
| ( >= .304096 ) | 50.00% | 60.00% | 57.14% | 1.2500 | 0.8333 |
| ( >= .371486 ) | 50.00% | 40.00% | 42.86% | 0.8333 | 12.500 |
| ( >= .641388 ) | 50.00% | 20.00% | 28.57% | 0.6250 | 25.000 |
| ( > .641388 ) | 100.00% | 0.00% | 28.57% | 1.0000 | |

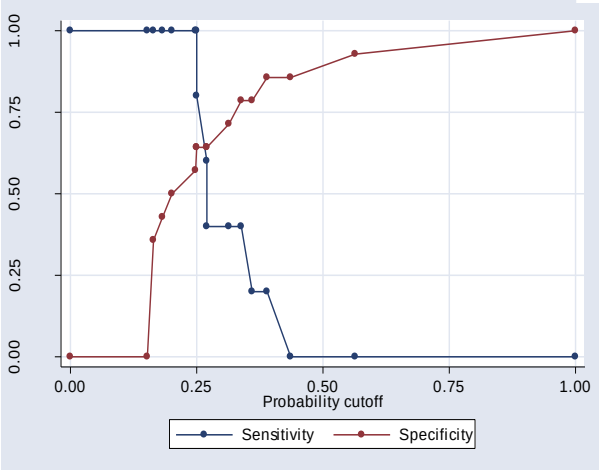


*Considerando refratariedade*

| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 100.00% | 0.00% | 26.32% | 1.0000 | |
| ( >= .030197 ) | 100.00% | 35.71% | 52.63% | 1.5556 | 0.0000 |
| ( >= .070163 ) | 100.00% | 42.86% | 57.89% | 1.7500 | 0.0000 |
| ( >= .110383 ) | 100.00% | 50.00% | 63.16% | 2.0000 | 0.0000 |
| ( >= .197762 ) | 100.00% | 57.14% | 68.42% | 2.3333 | 0.0000 |
| ( >= .201041 ) | 100.00% | 64.29% | 73.68% | 2.8000 | 0.0000 |
| ( >= .201797 ) | 80.00% | 64.29% | 68.42% | 2.2400 | 0.3111 |
| ( >= .235141 ) | 60.00% | 64.29% | 63.16% | 1.6800 | 0.6222 |
| ( >= .235179 ) | 40.00% | 64.29% | 57.89% | 1.1200 | 0.9333 |
| ( >= .304096 ) | 40.00% | 71.43% | 63.16% | 1.4000 | 0.8400 |
| ( >= .340511 ) | 40.00% | 78.57% | 68.42% | 1.8667 | 0.7636 |
| ( >= .371486 ) | 20.00% | 78.57% | 63.16% | 0.9333 | 10.182 |
| ( >= .412259 ) | 20.00% | 85.71% | 68.42% | 1.4000 | 0.9333 |
| ( >= .474579 ) | 0.00% | 85.71% | 63.16% | 0.0000 | 11.667 |
| ( >= .641388 ) | 0.00% | 92.86% | 68.42% | 0.0000 | 10.769 |
| ( > .641388 ) | 0.00% | 100.00% | 73.68% | | 10.000 |

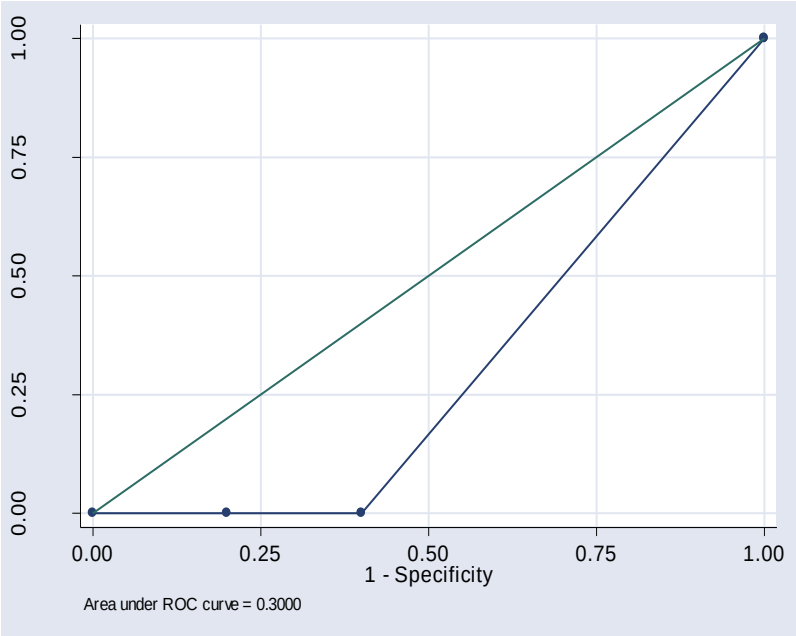


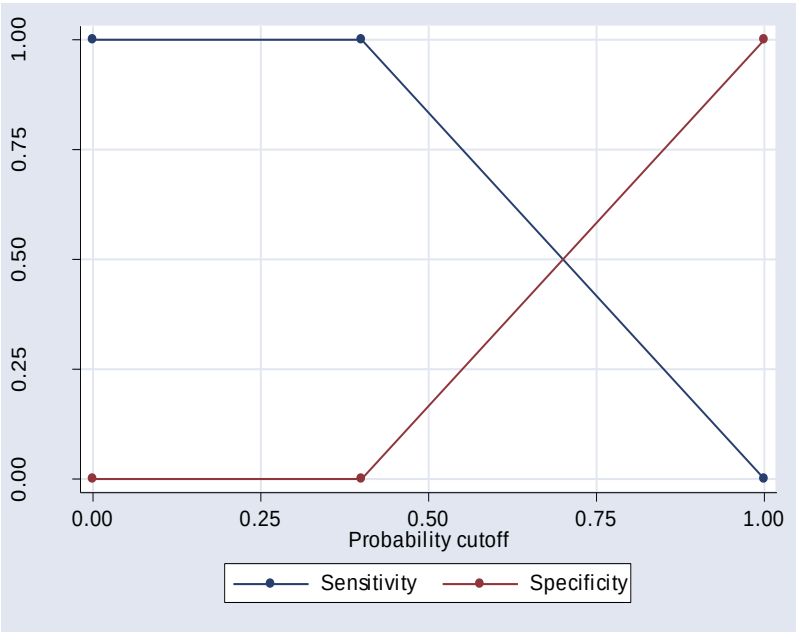



**ANEXO I -** Curvas de ROC para a expressão normatizada do gene MGMT

*Considerando recaída*

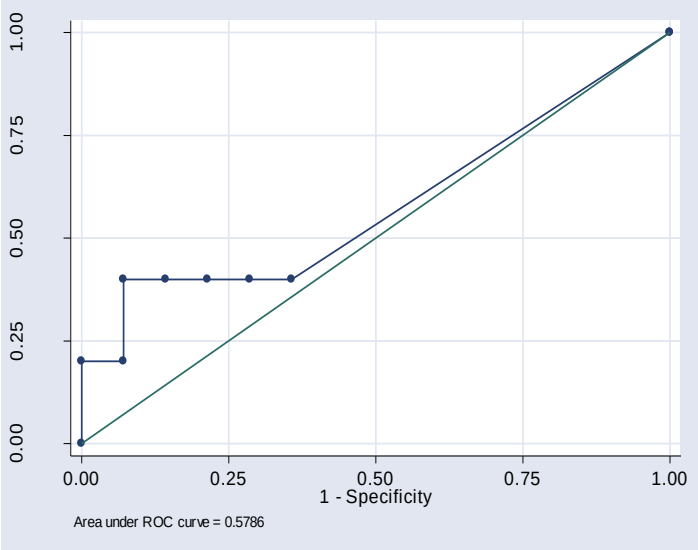
| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 0.00% | 100.00% | 71.43% | | 10.000 |
| ( >= .010951 ) | 0.00% | 80.00% | 57.14% | 0.0000 | 12.500 |
| ( >= .070006 ) | 0.00% | 60.00% | 42.86% | 0.0000 | 16.667 |
| ( > .070006 ) | 100.00% | 0.00% | 28.57% | 1.0000 | |

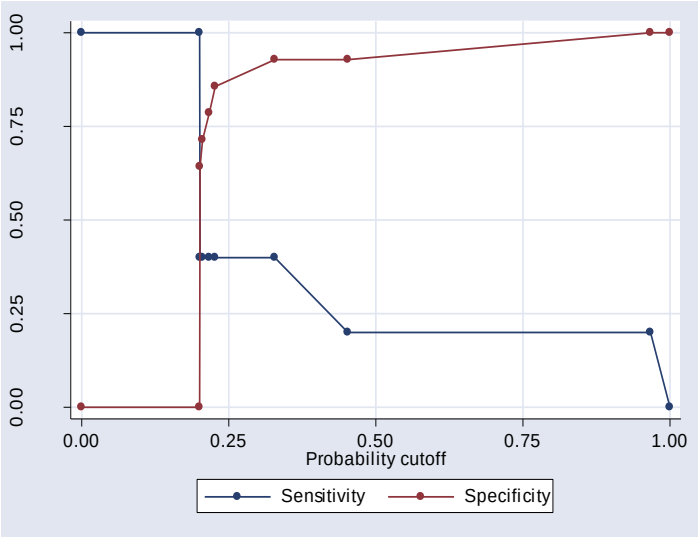


*Considerando refratariedade*

| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 100.00% | 0.00% | 26.32% | 1.0000 | |
| ( >= .010951 ) | 40.00% | 64.29% | 57.89% | 1.1200 | 0.9333 |
| ( >= .070006 ) | 40.00% | 71.43% | 63.16% | 1.4000 | 0.8400 |
| ( >= .218243 ) | 40.00% | 78.57% | 68.42% | 1.8667 | 0.7636 |
| ( >= .335666 ) | 40.00% | 85.71% | 73.68% | 2.8000 | 0.7000 |
| ( >= 1.41781 ) | 40.00% | 92.86% | 78.95% | 5.6000 | 0.6462 |
| ( >= 2.52437 ) | 20.00% | 92.86% | 73.68% | 2.8000 | 0.8615 |
| ( >= 10.0723 ) | 20.00% | 100.00% | 78.95% | | 0.8000 |
| ( > 10.0723 ) | 0.00% | 100.00% | 73.68% | | 10.000 |

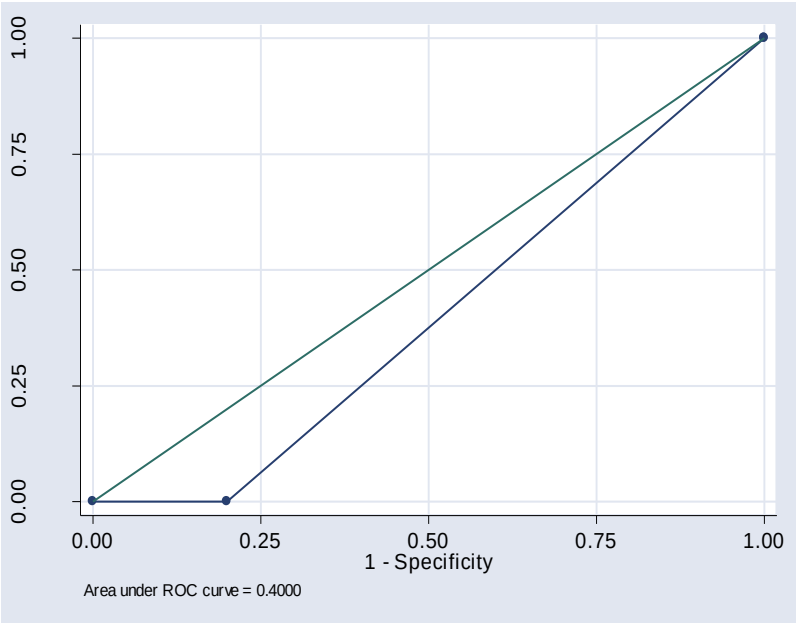


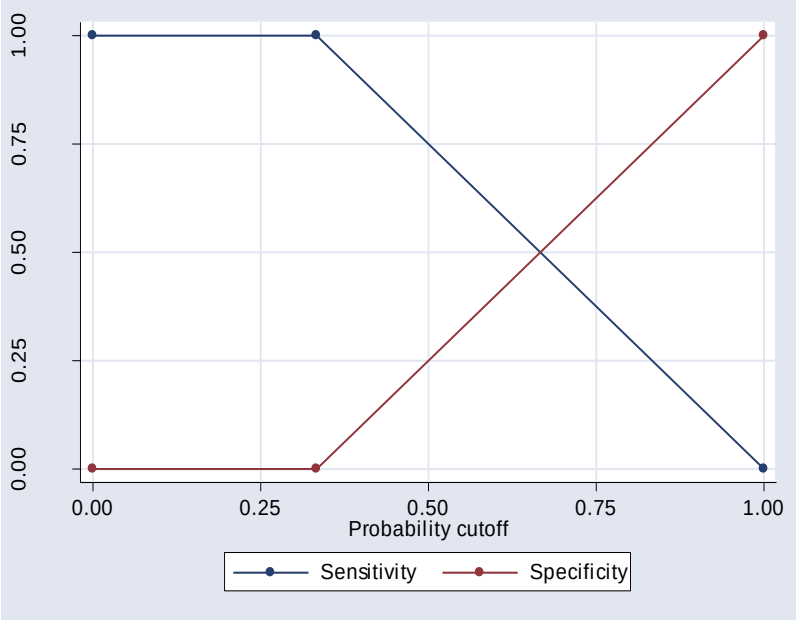



**ANEXO J -** Curvas de ROC para a expressão normatizada do gene PDCD1

*Considerando recaída*

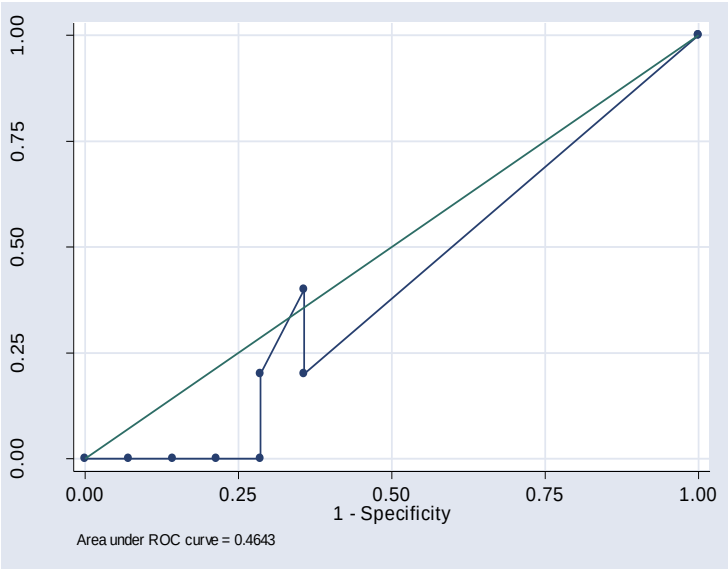
| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 0.00% | 100.00% | 71.43% | | 10.000 |
| ( >= 4.15881 ) | 0.00% | 80.00% | 57.14% | 0.0000 | 12.500 |
| ( > 4.15881 ) | 100.00% | 0.00% | 28.57% | 1.0000 | |

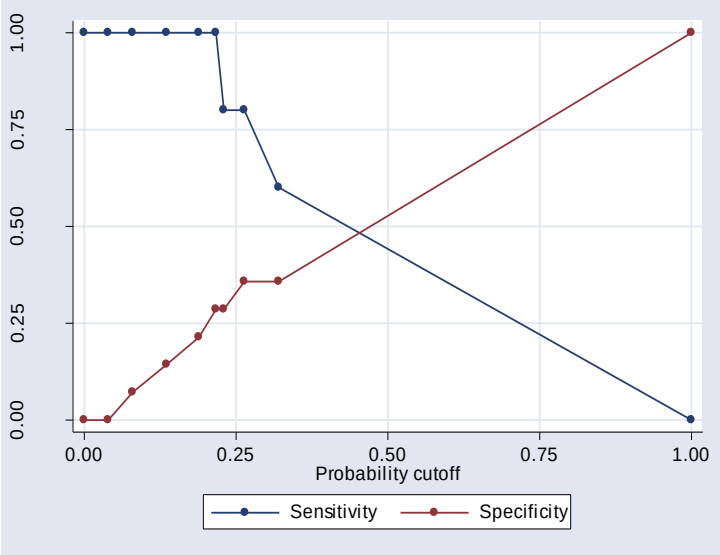



*Considerando refratariedade*

| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 0.00% | 100.00% | 73.68% | | 10.000 |
| ( >= 1.03519 ) | 0.00% | 92.86% | 68.42% | 0.0000 | 10.769 |
| ( >= 1.72968 ) | 0.00% | 85.71% | 63.16% | 0.0000 | 11.667 |
| ( >= 2.00938 ) | 0.00% | 78.57% | 57.89% | 0.0000 | 12.727 |
| ( >= 2.66263 ) | 0.00% | 71.43% | 52.63% | 0.0000 | 14.000 |
| ( >= 4.15881 ) | 20.00% | 71.43% | 57.89% | 0.7000 | 11.200 |
| ( >= 6.40481 ) | 20.00% | 64.29% | 52.63% | 0.5600 | 12.444 |
| ( >= 9.21463 ) | 40.00% | 64.29% | 57.89% | 1.1200 | 0.9333 |
| ( > 9.21463 ) | 100.00% | 0.00% | 26.32% | 1.0000 | |

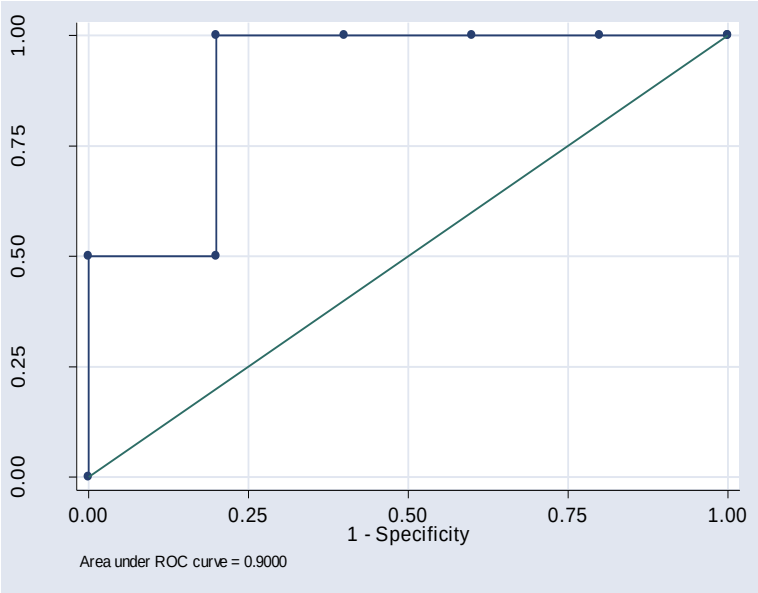


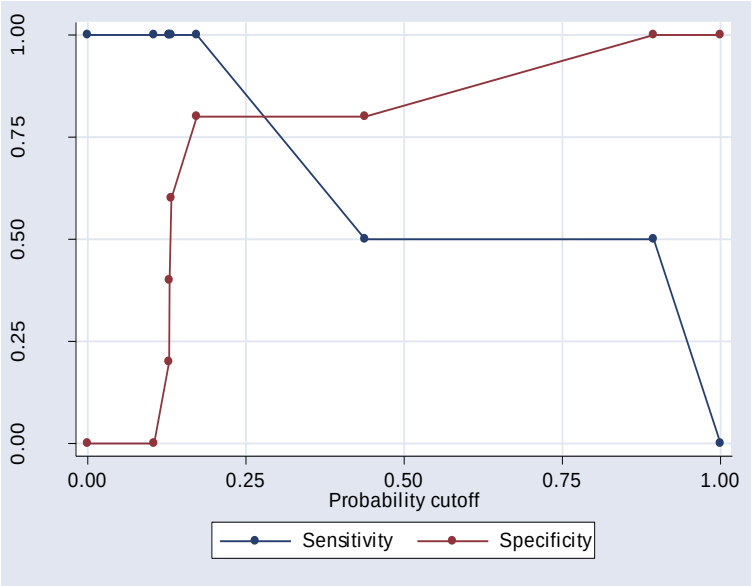




**ANEXO K -** Curvas de ROC para a expressão normatizada do gene BCL2

*Considerando recaída*

| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 100.00% | 0.00% | 28.57% | 1.0000 | |
| ( >= .078983 ) | 100.00% | 20.00% | 42.86% | 1.2500 | 0.0000 |
| ( >= .080915 ) | 100.00% | 40.00% | 57.14% | 1.6667 | 0.0000 |
| ( >= .090718 ) | 100.00% | 60.00% | 71.43% | 2.5000 | 0.0000 |
| ( >= .197275 ) | 100.00% | 80.00% | 85.71% | 5.0000 | 0.0000 |
| ( >= .651635 ) | 50.00% | 80.00% | 71.43% | 2.5000 | 0.6250 |
| ( >= 1.47173 ) | 50.00% | 100.00% | 85.71% | | 0.5000 |
| ( > 1.47173 ) | 0.00% | 100.00% | 71.43% | | 10.000 |

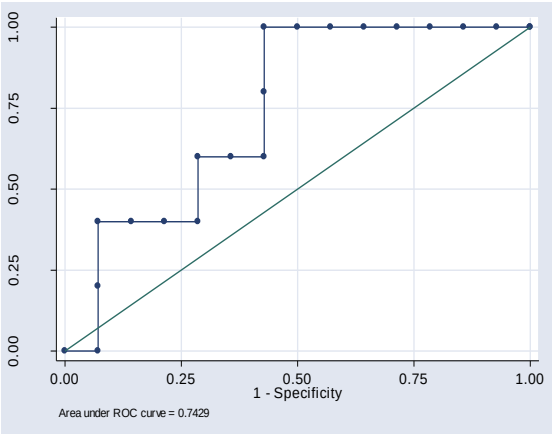


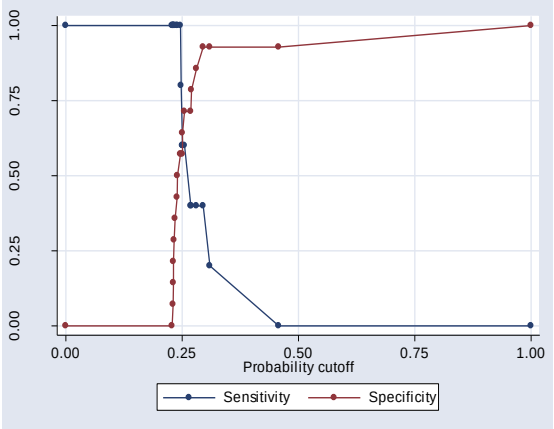




*Considerando refratariedade*

| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 100.00% | 0.00% | 26.32% | 1.0000 | |
| ( >= .078983 ) | 100.00% | 7.14% | 31.58% | 1.0769 | 0.0000 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= .080915 ) | 100.00% | 14.29% | 36.84% | 1.1667 | 0.0000 |
| ( >= .090718 ) | 100.00% | 21.43% | 42.11% | 1.2727 | 0.0000 |
| ( >= .130212 ) | 100.00% | 28.57% | 47.37% | 1.4000 | 0.0000 |
| ( >= .197275 ) | 100.00% | 35.71% | 52.63% | 1.5556 | 0.0000 |
| ( >= .32391 ) | 100.00% | 42.86% | 57.89% | 1.7500 | 0.0000 |
| ( >= .3516 ) | 100.00% | 50.00% | 63.16% | 2.0000 | 0.0000 |
| ( >= .527652 ) | 100.00% | 57.14% | 68.42% | 2.3333 | 0.0000 |
| ( >= .564317 ) | 80.00% | 57.14% | 63.16% | 1.8667 | 0.3500 |
| ( >= .64488 ) | 60.00% | 57.14% | 57.89% | 1.4000 | 0.7000 |
| ( >= .651635 ) | 60.00% | 64.29% | 63.16% | 1.6800 | 0.6222 |
| ( >= .7658 ) | 60.00% | 71.43% | 68.42% | 2.1000 | 0.5600 |
| ( >= 1.15876 ) | 40.00% | 71.43% | 63.16% | 1.4000 | 0.8400 |
| ( >= 1.18919 ) | 40.00% | 78.57% | 68.42% | 1.8667 | 0.7636 |
| ( >= 1.47173 ) | 40.00% | 85.71% | 73.68% | 2.8000 | 0.7000 |
| ( >= 1.84167 ) | 40.00% | 92.86% | 78.95% | 5.6000 | 0.6462 |
| ( >= 2.2052 ) | 20.00% | 92.86% | 73.68% | 2.8000 | 0.8615 |
| ( >= 5.56582 ) | 0.00% | 92.86% | 68.42% | 0.0000 | 10.769 |
| ( > 5.56582 ) | 0.00% | 100.00% | 73.68% | | 10.000 |

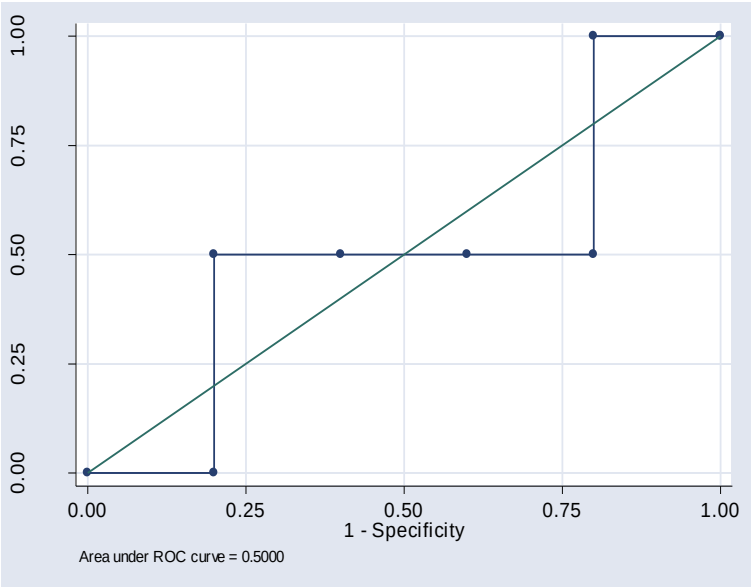


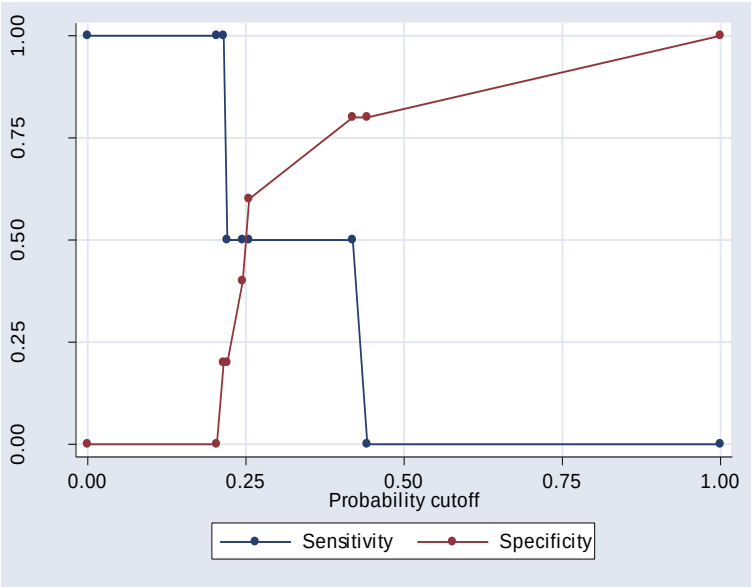



**ANEXO L -** Curvas de ROC para a expressão normatizada do gene LMO2

*Considerando recaída*

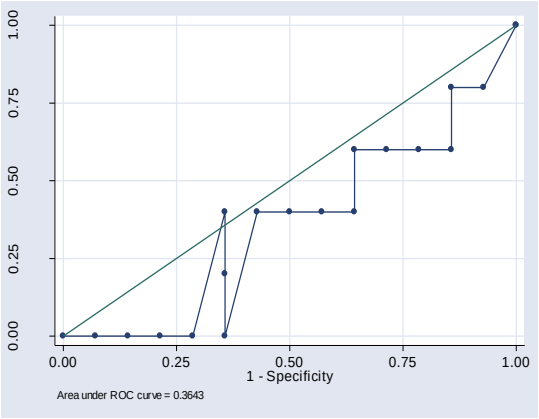
| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 100.00% | 0.00% | 28.57% | 1.0000 | |
| ( >= .451441 ) | 100.00% | 20.00% | 42.86% | 1.2500 | 0.0000 |
| ( >= .689232 ) | 50.00% | 20.00% | 28.57% | 0.6250 | 25.000 |
| ( >= 1.63584 ) | 50.00% | 40.00% | 42.86% | 0.8333 | 12.500 |
| ( >= 1.99125 ) | 50.00% | 60.00% | 57.14% | 1.2500 | 0.8333 |
| ( >= 7.14033 ) | 50.00% | 80.00% | 71.43% | 2.5000 | 0.6250 |
| ( >= 7.78468 ) | 0.00% | 80.00% | 57.14% | 0.0000 | 12.500 |
| ( > 7.78468 ) | 0.00% | 100.00% | 71.43% | | 10.000 |

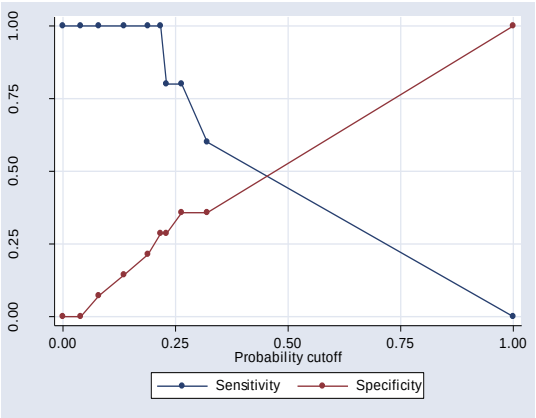


*Considerando refratariedade*

| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 0.00% | 100.00% | 73.68% | | 10.000 |
| ( >= .064892 ) | 0.00% | 92.86% | 68.42% | 0.0000 | 10.769 |
| ( >= .137646 ) | 0.00% | 85.71% | 63.16% | 0.0000 | 11.667 |
| ( >= .15704 ) | 0.00% | 78.57% | 57.89% | 0.0000 | 12.727 |
| ( >= .451441 ) | 0.00% | 71.43% | 52.63% | 0.0000 | 14.000 |
| ( >= .689232 ) | 0.00% | 64.29% | 47.37% | 0.0000 | 15.556 |
| ( >= .947131 ) | 20.00% | 64.29% | 52.63% | 0.5600 | 12.444 |
| ( >= 1.05113 ) | 40.00% | 64.29% | 57.89% | 1.1200 | 0.9333 |
| ( >= 1.63584 ) | 40.00% | 57.14% | 52.63% | 0.9333 | 10.500 |
| ( >= 1.99125 ) | 40.00% | 50.00% | 47.37% | 0.8000 | 12.000 |
| ( >= 2.57603 ) | 40.00% | 42.86% | 42.11% | 0.7000 | 14.000 |
| ( >= 4.07846 ) | 40.00% | 35.71% | 36.84% | 0.6222 | 16.800 |
| ( >= 6.5595 ) | 60.00% | 35.71% | 42.11% | 0.9333 | 11.200 |
| ( >= 7.14033 ) | 60.00% | 28.57% | 36.84% | 0.8400 | 14.000 |
| ( >= 7.78468 ) | 60.00% | 21.43% | 31.58% | 0.7636 | 18.667 |
| ( >= 10.9727 ) | 60.00% | 14.29% | 26.32% | 0.7000 | 28.000 |
| ( >= 13.7799 ) | 80.00% | 14.29% | 31.58% | 0.9333 | 14.000 |
| ( >= 17.506 ) | 80.00% | 7.14% | 26.32% | 0.8615 | 28.000 |
| ( > 17.506 ) | 100.00% | 0.00% | 26.32% | 1.0000 | |

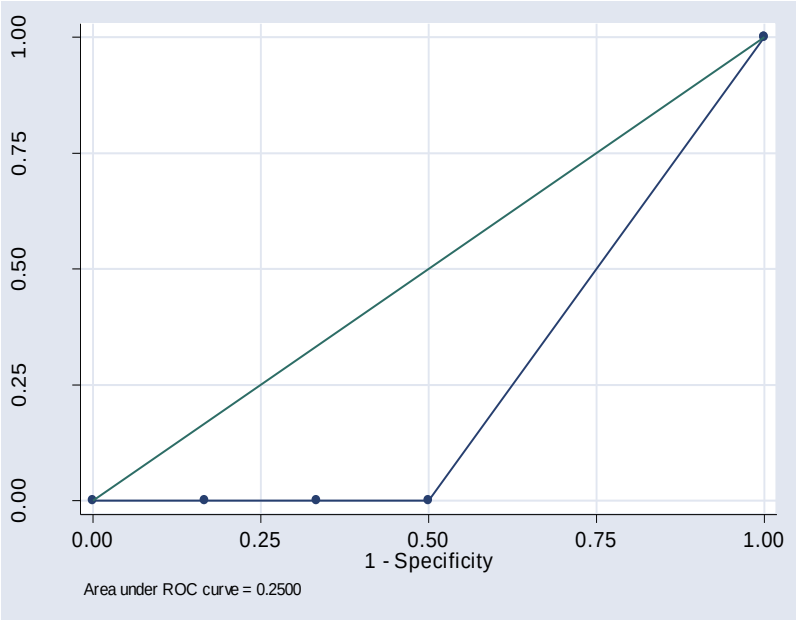


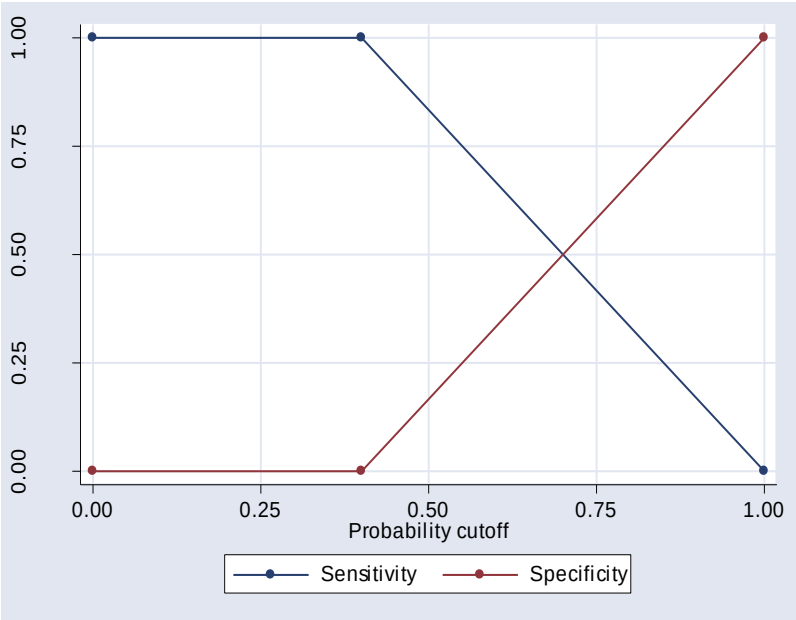



**ANEXO M -** Curvas de ROC para a expressão normatizada do gene POU2F1

*Considerando recaída*

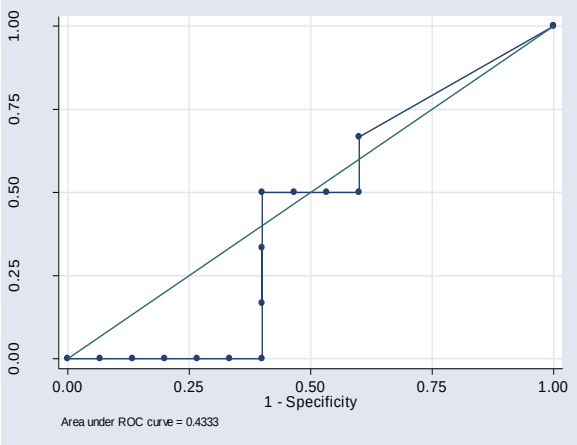
| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 0.00% | 100.00% | 75.00% | | 10.000 |
| ( >= 1.44819 ) | 0.00% | 83.33% | 62.50% | 0.0000 | 12.000 |
| ( >= 3.122 ) | 0.00% | 66.67% | 50.00% | 0.0000 | 15.000 |
| ( >= 6.14149 ) | 0.00% | 50.00% | 37.50% | 0.0000 | 20.000 |
| ( > 6.14149 ) | 100.00% | 0.00% | 25.00% | 1.0000 | |

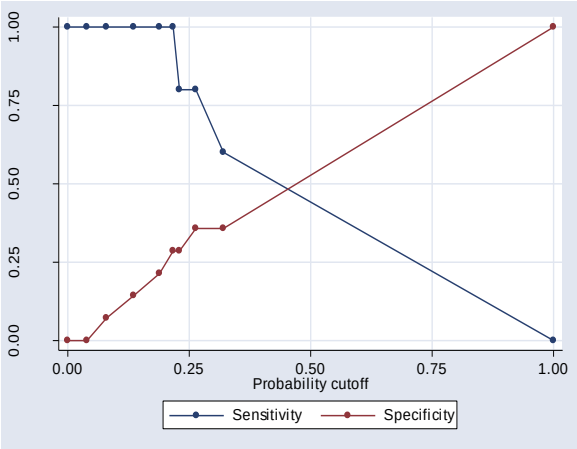


*Considerando refratariedade*

| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 0.00% | 100.00% | 71.43% | | 10.000 |
| ( >= 1.03322 ) | 0.00% | 93.33% | 66.67% | 0.0000 | 10.714 |
| ( >= 1.44819 ) | 0.00% | 86.67% | 61.90% | 0.0000 | 11.538 |
| ( >= 1.5677 ) | 0.00% | 80.00% | 57.14% | 0.0000 | 12.500 |
| ( >= 1.68257 ) | 0.00% | 73.33% | 52.38% | 0.0000 | 13.636 |
| ( >= 1.72209 ) | 0.00% | 66.67% | 47.62% | 0.0000 | 15.000 |
| ( >= 2.13402 ) | 0.00% | 60.00% | 42.86% | 0.0000 | 16.667 |
| ( >= 2.78342 ) | 16.67% | 60.00% | 47.62% | 0.4167 | 13.889 |
| ( >= 2.8278 ) | 33.33% | 60.00% | 52.38% | 0.8333 | 11.111 |
| ( >= 3.122 ) | 50.00% | 60.00% | 57.14% | 1.2500 | 0.8333 |
| ( >= 4.38556 ) | 50.00% | 53.33% | 52.38% | 1.0714 | 0.9375 |
| ( >= 4.48111 ) | 50.00% | 46.67% | 47.62% | 0.9375 | 10.714 |
| ( >= 6.14149 ) | 50.00% | 40.00% | 42.86% | 0.8333 | 12.500 |
| ( >= 6.30088 ) | 66.67% | 40.00% | 47.62% | 1.1111 | 0.8333 |
| ( > 6.30088 ) | 100.00% | 0.00% | 28.57% | 1.0000 | |

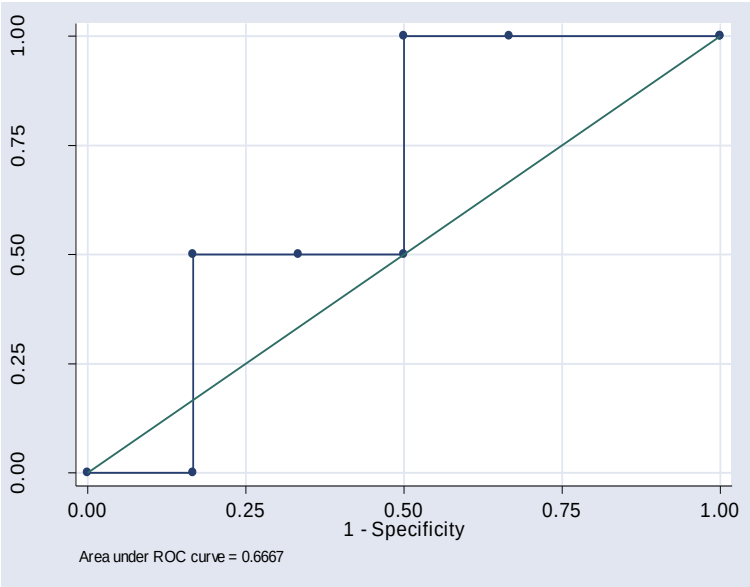


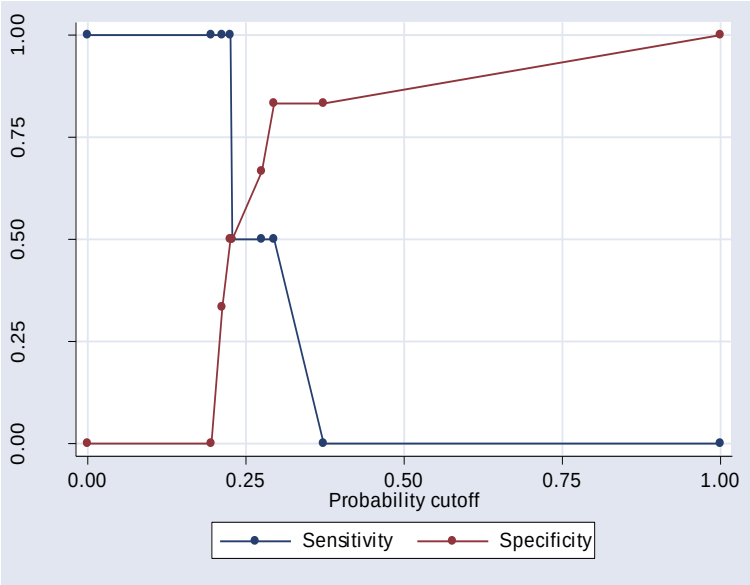



**ANEXO N -** Curvas de ROC para a expressão normatizada do gene BCL6

*Considerando recaída*

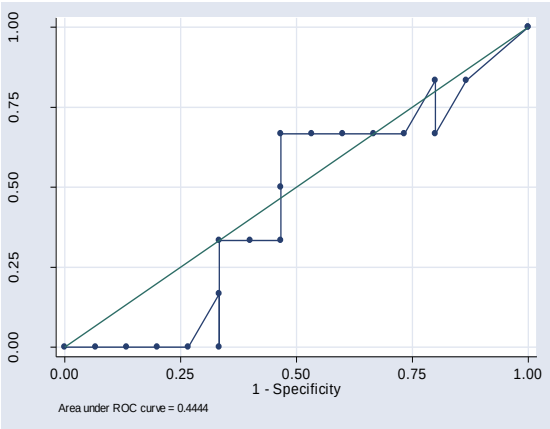
| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 100.00% | 0.00% | 25.00% | 1.0000 | |
| ( >= .638891 ) | 100.00% | 33.33% | 50.00% | 1.5000 | 0.0000 |
| ( >= 1.11303 ) | 100.00% | 50.00% | 62.50% | 2.0000 | 0.0000 |
| ( >= 1.20327 ) | 50.00% | 50.00% | 50.00% | 1.0000 | 10.000 |
| ( >= 2.7159 ) | 50.00% | 66.67% | 62.50% | 1.5000 | 0.7500 |
| ( >= 3.29719 ) | 50.00% | 83.33% | 75.00% | 3.0000 | 0.6000 |
| ( >= 5.44625 ) | 0.00% | 83.33% | 62.50% | 0.0000 | 12.000 |
| ( > 5.44625 ) | 0.00% | 100.00% | 75.00% | | 10.000 |

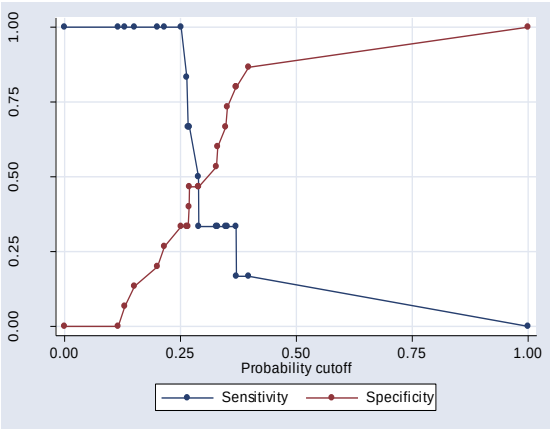


*Considerando refratariedade*

| Cut point | Sensitivity | Specificity | Classified | RV+ | RV- |
|---|---|---|---|---|---|
| ( >= 0 ) | 0.00% | 100.00% | 71.43% | | 10.000 |
| ( >= .638891 ) | 0.00% | 93.33% | 66.67% | 0.0000 | 10.714 |
| ( >= .647623 ) | 0.00% | 86.67% | 61.90% | 0.0000 | 11.538 |
| ( >= 1.11303 ) | 0.00% | 80.00% | 57.14% | 0.0000 | 12.500 |
| ( >= 1.20327 ) | 0.00% | 73.33% | 52.38% | 0.0000 | 13.636 |
| ( >= 1.63957 ) | 0.00% | 66.67% | 47.62% | 0.0000 | 15.000 |
| ( >= 1.70344 ) | 16.67% | 66.67% | 52.38% | 0.5000 | 12.500 |
| ( >= 2.7159 ) | 33.33% | 66.67% | 57.14% | 1.0000 | 10.000 |
| ( >= 2.73477 ) | 33.33% | 60.00% | 52.38% | 0.8333 | 11.111 |
| ( >= 3.2766 ) | 33.33% | 53.33% | 47.62% | 0.7143 | 12.500 |
| ( >= 3.29719 ) | 50.00% | 53.33% | 52.38% | 1.0714 | 0.9375 |
| ( >= 3.34561 ) | 66.67% | 53.33% | 57.14% | 1.4286 | 0.6250 |
| ( >= 3.42655 ) | 66.67% | 46.67% | 52.38% | 1.2500 | 0.7143 |
| ( >= 3.78701 ) | 66.67% | 40.00% | 47.62% | 1.1111 | 0.8333 |
| ( >= 4.92334 ) | 66.67% | 33.33% | 42.86% | 1.0000 | 10.000 |
| ( >= 5.44625 ) | 66.67% | 26.67% | 38.10% | 0.9091 | 12.500 |
| ( >= 7.37557 ) | 66.67% | 20.00% | 33.33% | 0.8333 | 16.667 |
| ( >= 8.33685 ) | 83.33% | 20.00% | 38.10% | 1.0417 | 0.8333 |
| ( >= 9.09112 ) | 83.33% | 13.33% | 33.33% | 0.9615 | 12.500 |
| ( > 9.09112 ) | 100.00% | 0.00% | 28.57% | 1.0000 | |



**ANEXO O -** Construção das curvas de SG, SLP e SLD (método de Kaplan-Meier)

| Variável | SG (meses) | SLP (meses) | SLD (meses) |
|---|---|---|---|
| **Número de pacientes** | | | |
| n | 100% (35) | 100% (33) | 100% (15) |
| **Tempo de sobrevida depois diagnóstico *** | | | |
| média (ep) | 56,8 ( 10,34 ) | 53,8 ( 10,71 ) | 76,86 ( 16,58 ) |
| IC95% média | 36,5 ; 77,0 | 32,8 ; 74,8 | 44,36 ; 109,36 |
| mediana (ep) | **42,6 ( 8,18 )** | **41,0 ( 10,90 )** | **59,2 ( 13,93 )** |
| IC95% mediana | 26,6 ; 58,6 | 19,7 ; 62,4 | 31,94 ; 86,58 |
| limitado por | 171,8 | 171,8 | 163,4 |
| frequência | | | |
| **óbito** (n) | 74,3% ( 26 ) | 75,8% ( 25 ) | 53,3% ( 8 ) |
| **vivos** (n) | 25,7% ( 9 ) | 24,2% ( 8 ) | 46,6% ( 7 ) |
| **total** | 100,0% ( 35 ) | 100,0% ( 33 ) | 100,0% ( 15 ) |
| **Probabilidade de sobrevida** | | | |
| em 1 meses | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| em 2 meses | 0,971 | 0,970 | 1,000 |
| em 4 meses | 0,857 | 0,848 | 0,933 |
| em 6 meses | 0,829 | 0,818 | 0,933 |
| em 8 meses | 0,743 | 0,697 | 0,933 |
| em 12 meses | 0,734 | 0,697 | 0,933 |
| em 18 meses | 0,685 | 0,636 | 0,933 |
| em 24 meses | 0,655 | 0,636 | 0,933 |
| em 36 meses | 0,579 | 0,573 | 0,790 |
| em 48 meses | 0,438 | 0,371 | 0,565 |
| em 60 meses | 0,404 | 0,259 | 0,485 |
| em 90 meses | 0,215 | 0,162 | 0,258 |
| em150 meses | 0,144 | 0,162 | 0,258 |
| em 170 meses | 0,144 | 0,162 | |

**ANEXO P -** Expressão dos genes de interesse em relação à sua respectiva expressão proteica

(continua)

| Gene/Proteína de Interesse | IHQ 0% | IHQ 1%-25% | IHQ 26%-50% | IHQ 51%-75% | IHQ 76%-100% |
|---|---|---|---|---|---|
| **MYC** | | | | | |
| n | 3 | 2 | 4 | 5 | 6 |
| média (dp) | 0,205 ( 0,0087 ) | 0,089 ( 0,1255 ) | 0,053 ( 0,0480 ) | 0,291 ( 0,2865 ) | 0,293 ( 0,0844 ) |
| mediana | 0,202 | 0,089 | 0,050 | 0,341 | 0,270 |
| min ; max | 0,198 : 0,214 | 0,000 : 0,178 | 0,000 : 0,110 | 0,000 : 0,641 | 0,201 : 0,412 |
| **MGMT** | | | | | |
| n | 21 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| média (dp) | 0,760 ( 2,2315 ) | | | | |
| mediana | 0,000 | | | | |
| min ; max | 0,000 : 10,072 | | | | |
| **PDCD1** | | | | | |
| n | 18 | 2 | 0 | 0 | 1 |
| média (dp) | 1,545 ( 2,6101 ) | 0,000 ( 0,0000 ) | | | 0,000 ( . ) |
| mediana | 0,000 | 0,000 | | | |
| min ; max | 0,000 : 9,215 | 0,000 : 0,000 | | | |
| **BCL2** | | | | | |
| n | 1 | 1 | 1 | 4 | 14 |
| média (dp) | 0,000 ( . ) | 0,197 ( . ) | 0,079 ( . ) | 0,716 ( 0,5564 ) | 1,135 ( 1,4370 ) |
| mediana | | | | 0,770 | 0,648 |
| min ; max | | | | 0,130 : 1,194 | 0,000 : 5,566 |

**ANEXO P -** Expressão dos genes de interesse em relação à sua respectiva expressão proteica

(conclusão)

| Gene/Proteína de Interesse | IHQ 0% | IHQ 1%-25% | IHQ 26%-50% | IHQ 51%-75% | IHQ 76%-100% |
|---|---|---|---|---|---|
| **LMO2** | | | | | |
| n | 9 | 1 | 4 | 3 | 4 |
| média (dp) | 2,940 ( 4,6009 ) | 0,138 ( . ) | 0,783 ( 0,8547 ) | 5,062 ( 5,1408 ) | 9,127 ( 5,8151 ) |
| mediana | 0,947 | | 0,570 | 2,576 | 7,463 |
| min ; max | 0,000 : 13,780 | | 0,000 : 1,991 | 1,636 : 10,973 | 4,078 : 17,506 |
| **POU2F1** | | | | | |
| n | 0 | 1 | 0 | 0 | 22 |
| média (dp) | | 1,568 ( . ) | | | 1,756 ( 2,0497 ) |
| mediana | | | | | 1,241 |
| min ; max | | | | | 0,000 : 6,301 |

dp - desvio padrão

## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


1. Foon KA, Litchman MA. General considerations of lymphoma: epidemiology, etiology, heterogeneity and primary extranodal disease. Williams Hematology. 8th ed: McGraw Hill Medical; 2010. p. 1497-507.
2. Surveillance EaERP. Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) program. http://seer.cancer.gov/statfacts/html/nhl/html2015 [cited 2015 06/16].
3. Noone AM HN, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2015,. https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/: National Cancer Institute; 2018 [cited November 2017 10/27/2018]; Available from: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/.
4. Rizvi MA, Evens AM, Nelson BP. T-cell lymphoma. In: Marcus R, editor. Lymphoma: Pathology, Diagnosis and Treatment. 1st ed: Cambridge; 2007. p. 215-32.
5. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.
6. Swerdlow SH CE, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised Fourth Edition. WHO Classification of Tumours V, editor: IARC/WHO; 2017. 586 p.
7. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil Rio de Janeiro: Fox Print; 2018. 130 p.
8. Quintanilla-Martinez L. The 2016 updated WHO classification of lymphoid neoplasias. Hematol Oncol. 2017;35 Suppl 1:37-45.
9. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature. 2000;403(6769):503-11.
10. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. Blood. 2004;103(1):275-82.
11. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. N Engl J Med. 2002;346(25):1937-47.
12. Hattab EM, Martin SE, Al-Khatib SM, Kupsky WJ, Vance GH, Stohler RA, et al. Most primary central nervous system diffuse large B-cell lymphomas occurring in immunocompetent individuals belong to the nongerminal center subtype: a retrospective analysis of 31 cases. Mod Pathol. 2010;23(2):235-43.

13. Deckert M, Brunn A, Montesinos-Rongen M, Terreni MR, Ponzoni M. Primary lymphoma of the central nervous system--a diagnostic challenge. Hematol Oncol. 2014;32(2):57-67.
14. Mahadevan A, Rao CR, Shanmugham M, Shankar SK. Primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma in the immunocompetent: Immunophenotypic subtypes and Epstein-Barr virus association. J Neurosci Rural Pract. 2015;6(1):8-14.
15. Shan Y, Hu Y. Prognostic Factors and Survival in Primary Central Nervous System Lymphoma: A Population-Based Study. Dis Markers. 2018;2018:7860494.
16. Korfel A, Schlegel U. Diagnosis and treatment of primary CNS lymphoma. Nat Rev Neurol. 2013;9(6):317-27.
17. Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. Neuro Oncol. 2012;14 Suppl 5:v1-49.
18. O'Neill BP, Decker PA, Tieu C, Cerhan JR. The changing incidence of primary central nervous system lymphoma is driven primarily by the changing incidence in young and middle-aged men and differs from time trends in systemic diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma. Am J Hematol. 2013;88(12):997-1000.
19. Shiels MS, Pfeiffer RM, Besson C, Clarke CA, Morton LM, Nogueira L, et al. Trends in primary central nervous system lymphoma incidence and survival in the U.S. Br J Haematol. 2016;174(3):417-24.
20. Citterio G, Reni M, Gatta G, Ferreri AJM. Primary central nervous system lymphoma. Crit Rev Oncol Hematol. 2017;113:97-110.
21. Hoang-Xuan K, Bessell E, Bromberg J, Hottinger AF, Preusser M, Ruda R, et al. Diagnosis and treatment of primary CNS lymphoma in immunocompetent patients: guidelines from the European Association for Neuro-Oncology. Lancet Oncol. 2015;16(7):e322-32.
22. Thiel E, Korfel A, Martus P, Kanz L, Griesinger F, Rauch M, et al. High-dose methotrexate with or without whole brain radiotherapy for primary CNS lymphoma (G-PCNSL-SG-1): a phase 3, randomised, non-inferiority trial. Lancet Oncol. 2010;11(11):1036-47.
23. Rubenstein JL, Hsi ED, Johnson JL, Jung SH, Nakashima MO, Grant B, et al. Intensive chemotherapy and immunotherapy in patients with newly diagnosed primary CNS lymphoma: CALGB 50202 (Alliance 50202). J Clin Oncol. 2013;31(25):3061-8.
24. Rubenstein JL. Biology of CNS lymphoma and the potential of novel agents. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2017;2017(1):556-64.
25. Vaux DL. Immunology. Ways around rejection. Nature. 1998;394(6689):133.
26. Otake Y, Soundararajan S, Sengupta TK, Kio EA, Smith JC, Pineda-Roman M, et al. Overexpression of nucleolin in chronic lymphocytic leukemia cells induces stabilization of bcl2 mRNA. Blood. 2007;109(7):3069-75.

27. Stine ZE, Walton ZE, Altman BJ, Hsieh AL, Dang CV. MYC, Metabolism, and Cancer. Cancer Discov. 2015;5(10):1024-39.
28. Cubedo E, Gentles AJ, Huang C, Natkunam Y, Bhatt S, Lu X, et al. Identification of LMO2 transcriptome and interactome in diffuse large B-cell lymphoma. Blood. 2012;119(23):5478-91.
29. Toffolatti L, Scquizzato E, Cavallin S, Canal F, Scarpa M, Stefani PM, et al. MGMT promoter methylation and correlation with protein expression in primary central nervous system lymphoma. Virchows Arch. 2014;465(5):579-86.
30. Gupta S, Wulf G, Henjakovic M, Koepsell H, Burckhardt G, Hagos Y. Human organic cation transporter 1 is expressed in lymphoma cells and increases susceptibility to irinotecan and paclitaxel. J Pharmacol Exp Ther. 2012;341(1):16-23.
31. Andreev E, Brosseau N, Carmona E, Mes-Masson AM, Ramotar D. The human organic cation transporter OCT1 mediates high affinity uptake of the anticancer drug daunorubicin. Sci Rep. 2016;6:20508.
32. Vazquez-Arreguin K, Tantin D. The Oct1 transcription factor and epithelial malignancies: Old protein learns new tricks. Biochim Biophys Acta. 2016;1859(6):792-804.
33. Nayak L, Iwamoto FM, LaCasce A, Mukundan S, Roemer MGM, Chapuy B, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed/refractory primary central nervous system and testicular lymphoma. Blood. 2017;129(23):3071-3.
34. Chapuy B, Roemer MG, Stewart C, Tan Y, Abo RP, Zhang L, et al. Targetable genetic features of primary testicular and primary central nervous system lymphomas. Blood. 2016;127(7):869-81.
35. Pasqualucci L, Dalla-Favera R. Genetics of diffuse large B-cell lymphoma. Blood. 2018;131(21):2307-19.
36. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. Blood. 2016;127(20):2375-90.
37. Deckert M, Montesinos-Rongen M, Brunn A, Siebert R. Systems biology of primary CNS lymphoma: from genetic aberrations to modeling in mice. Acta Neuropathol. 2014;127(2):175-88.
38. Chan CC, Rubenstein JL, Coupland SE, Davis JL, Harbour JW, Johnston PB, et al. Primary vitreoretinal lymphoma: a report from an International Primary Central Nervous System Lymphoma Collaborative Group symposium. Oncologist. 2011;16(11):1589-99.
39. Phillips EH, Fox CP, Cwynarski K. Primary CNS lymphoma. Curr Hematol Malig Rep. 2014;9(3):243-53.
40. Grimm SA, Pulido JS, Jahnke K, Schiff D, Hall AJ, Shenkier TN, et al. Primary intraocular lymphoma: an International Primary Central Nervous System Lymphoma Collaborative Group Report. Ann Oncol. 2007;18(11):1851-5.

41. Braaten KM, Betensky RA, de Leval L, Okada Y, Hochberg FH, Louis DN, et al. BCL-6 expression predicts improved survival in patients with primary central nervous system lymphoma. Clin Cancer Res. 2003;9(3):1063-9.
42. Riemersma SA, Jordanova ES, Schop RF, Philippo K, Looijenga LH, Schuuring E, et al. Extensive genetic alterations of the HLA region, including homozygous deletions of HLA class II genes in B-cell lymphomas arising in immune-privileged sites. Blood. 2000;96(10):3569-77.
43. Wong SF, Gan HK, Cher L. A single centre study of the treatment of relapsed primary central nervous system lymphoma (PCNSL) with single agent temozolomide. J Clin Neurosci. 2012;19(11):1501-5.
44. Bromberg JE, Doorduijn JK, Illerhaus G, Jahnke K, Korfel A, Fischer L, et al. Central nervous system recurrence of systemic lymphoma in the era of stem cell transplantation--an International Primary Central Nervous System Lymphoma Study Group project. Haematologica. 2013;98(5):808-13.
45. Mappa S, Marturano E, Licata G, Frezzato M, Frungillo N, Ilariucci F, et al. Salvage chemoimmunotherapy with rituximab, ifosfamide and etoposide (R-IE regimen) in patients with primary CNS lymphoma relapsed or refractory to high-dose methotrexate-based chemotherapy. Hematol Oncol. 2013;31(3):143-50.
46. Mendez JS, Ostrom QT, Gittleman H, Kruchko C, DeAngelis LM, Barnholtz-Sloan JS, et al. The elderly left behind-changes in survival trends of primary central nervous system lymphoma over the past 4 decades. Neuro Oncol. 2018;20(5):687-94.
47. Batchelor T, Loeffler JS. Primary CNS lymphoma. J Clin Oncol. 2006;24(8):1281-8.
48. Villano JL, Koshy M, Shaikh H, Dolecek TA, McCarthy BJ. Age, gender, and racial differences in incidence and survival in primary CNS lymphoma. Br J Cancer. 2011;105(9):1414-8.
49. Abrey LE. Primary central nervous system lymphoma. Curr Opin Neurol. 2009;22(6):675-80.
50. Pitelle JEH. Stereotactic biopsy in the diagnosis of brain tumors and non-neoplastic lesions: prescription, accuracy and diagnostic difficulties. J Bras Patol Med Lab. 2008;44(5):11.
51. Abrey LE, Batchelor TT, Ferreri AJ, Gospodarowicz M, Pulczynski EJ, Zucca E, et al. Report of an international workshop to standardize baseline evaluation and response criteria for primary CNS lymphoma. J Clin Oncol. 2005;23(22):5034-43.
52. Sabattini E, Bacci F, Sagramoso C, Pileri SA. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview. Pathologica. 2010;102(3):83-7.
53. Camilleri-Broet S, Criniere E, Broet P, Delwail V, Mokhtari K, Moreau A, et al. A uniform activated B-cell-like immunophenotype might explain the poor prognosis of primary central nervous system lymphomas: analysis of 83 cases. Blood. 2006;107(1):190-6.

54. Ponzoni M, Issa S, Batchelor TT, Rubenstein JL. Beyond high-dose methotrexate and brain radiotherapy: novel targets and agents for primary CNS lymphoma. Ann Oncol. 2014;25(2):316-22.
55. Rubenstein JL, Wong VS, Kadoch C, Gao HX, Barajas R, Chen L, et al. CXCL13 plus interleukin 10 is highly specific for the diagnosis of CNS lymphoma. Blood. 2013;121(23):4740-8.
56. Ponzoni M, Berger F, Chassagne-Clement C, Tinguely M, Jouvet A, Ferreri AJ, et al. Reactive perivascular T-cell infiltrate predicts survival in primary central nervous system B-cell lymphomas. Br J Haematol. 2007;138(3):316-23.
57. Batchelor TT. Primary central nervous system lymphoma. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2016;2016(1):379-85.
58. Maza S, Buchert R, Brenner W, Munz DL, Thiel E, Korfel A, et al. Brain and whole-body FDG-PET in diagnosis, treatment monitoring and long-term follow-up of primary CNS lymphoma. Radiol Oncol. 2013;47(2):103-10.
59. Kuker W, Nagele T, Korfel A, Heckl S, Thiel E, Bamberg M, et al. Primary central nervous system lymphomas (PCNSL): MRI features at presentation in 100 patients. J Neurooncol. 2005;72(2):169-77.
60. Zou Y, Tong J, Leng H, Jiang J, Pan M, Chen Z. Diagnostic value of using 18F-FDG PET and PET/CT in immunocompetent patients with primary central nervous system lymphoma: A systematic review and meta-analysis. Oncotarget. 2017;8(25):41518-28.
61. Tabouret E, Houillier C, Martin-Duverneuil N, Blonski M, Soussain C, Ghesquieres H, et al. Patterns of response and relapse in primary CNS lymphomas after first-line chemotherapy: imaging analysis of the ANOCEF-GOELAMS prospective randomized trial. Neuro Oncol. 2017;19(3):422-9.
62. Wieduwilt MJ, Valles F, Issa S, Behler CM, Hwang J, McDermott M, et al. Immunochemotherapy with intensive consolidation for primary CNS lymphoma: a pilot study and prognostic assessment by diffusion-weighted MRI. Clin Cancer Res. 2012;18(4):1146-55.
63. Zhang Y, Zhang Q, Wang XX, Deng XF, Zhu YZ. Value of pretherapeutic DWI in evaluating prognosis and therapeutic effect in immunocompetent patients with primary central nervous system lymphoma given high-dose methotrexate-based chemotherapy: ADC-based assessment. Clin Radiol. 2016.
64. Isasi CR, Lu P, Blaufox MD. A metaanalysis of 18F-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose positron emission tomography in the staging and restaging of patients with lymphoma. Cancer. 2005;104(5):1066-74.
65. Soares Jr J, Fonseca RP, Cerci JJ, Buchpigue CA, Cunha MLd, Mamed M, et al. Recommendations on the use of 18F-FDG PET/CT in Oncology. Consensus between the Brazilian Society of Cancerology and the Brazilian Society of Biology, Nuclear Medicine and Molecular Imaging. Radiol Bras. 2010;43(4):255-9.
66. Kosaka N, Tsuchida T, Uematsu H, Kimura H, Okazawa H, Itoh H. 18F-FDG PET of common enhancing malignant brain tumors. AJR Am J Roentgenol. 2008;190(6):W365-9.

67. Fallah J, Qunaj L, Olszewski AJ. Therapy and outcomes of primary central nervous system lymphoma in the United States: analysis of the National Cancer Database. Blood Adv. 2016;1(2):112-21.
68. Ferreri AJ, Abrey LE, Blay JY, Borisch B, Hochman J, Neuwelt EA, et al. Summary statement on primary central nervous system lymphomas from the Eighth International Conference on Malignant Lymphoma, Lugano, Switzerland, June 12 to 15, 2002. J Clin Oncol. 2003;21(12):2407-14.
69. Cady FM, O'Neill BP, Law ME, Decker PA, Kurtz DM, Giannini C, et al. Del(6)(q22) and BCL6 rearrangements in primary CNS lymphoma are indicators of an aggressive clinical course. J Clin Oncol. 2008;26(29):4814-9.
70. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Oncol. 1982;5(6):649-55.
71. Kasenda B, Ferreri AJ, Marturano E, Forst D, Bromberg J, Ghesquieres H, et al. First-line treatment and outcome of elderly patients with primary central nervous system lymphoma (PCNSL)--a systematic review and individual patient data meta-analysis. Ann Oncol. 2015;26(7):1305-13.
72. Nayak L, Batchelor TT. Recent advances in treatment of primary central nervous system lymphoma. Curr Treat Options Oncol. 2013;14(4):539-52.
73. Ferreri AJ, Cwynarski K, Pulczynski E, Ponzoni M, Deckert M, Politi LS, et al. Chemoimmunotherapy with methotrexate, cytarabine, thiotepa, and rituximab (MATRix regimen) in patients with primary CNS lymphoma: results of the first randomisation of the International Extranodal Lymphoma Study Group-32 (IELSG32) phase 2 trial. Lancet Haematol. 2016;3(5):e217-27.
74. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. J Clin Oncol. 2012;30(28):3452-9.
75. Four M, Cacheux V, Tempier A, Platero D, Fabbro M, Marin G, et al. PD1 and PDL1 expression in primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma are frequent and expression of PD1 predicts poor survival. Hematol Oncol. 2017;35(4):487-96.
76. Scott DW, Wright GW, Williams PM, Lih CJ, Walsh W, Jaffe ES, et al. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. Blood. 2014;123(8):1214-7.
77. Bodor C, Alpár D, Marosvári D, Rajnai H, Dudela B, Kajtár B, et al. Cell of origin and genomic profile of primary central nervous system lymphoma determined using the nanostring lst assay and ultra deep targeted next generation sequencing. Blood. 2017;130(Suppl 1):4009-.
78. Wilson WH, Young RM, Schmitz R, Yang Y, Pittaluga S, Wright G, et al. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. Nat Med. 2015;21(8):922-6.

79. Villa D, Slack GW, Al-Moosawi M, Ben-Neriah S, Shenkier T, Connors JM, et al. Molecular Features of Primary Central Nervous System Lymphoma in a Large Tissue Microarray. Blood. 2018;132(Suppl 1):348.
80. Maguire A, Hilal T, Chen X, Rosenthal AC, Rimsza LM. Enhanced Expression of FGF Signaling in Primary Central Nervous System Lymphoma. Blood. 2018;132(suppl 1):2847.
81. Kreher S, Johrens K, Strehlow F, Martus P, Borowiec K, Radke J, et al. Prognostic impact of B-cell lymphoma 6 in primary CNS lymphoma. Neuro Oncol. 2015;17(7):1016-21.
82. Oliveira JL, Grogg KL, Macon WR, Dogan A, Feldman AL. Clinicopathologic features of B-Cell lineage neoplasms with aberrant expression of CD3: a study of 21 cases. Am J Surg Pathol. 2012;36(9):1364-70.
83. Wang J, Chen C, Lau S, Raghavan RI, Rowsell EH, Said J, et al. CD3-positive large B-cell lymphoma. Am J Surg Pathol. 2009;33(4):505-12.
84. Lazzi S, Bellan C, Onnis A, De Falco G, Sayed S, Kostopoulos I, et al. Rare lymphoid neoplasms coexpressing B- and T-cell antigens. The role of PAX-5 gene methylation in their pathogenesis. Hum Pathol. 2009;40(9):1252-61.
85. Campana D, Thompson JS, Amlot P, Brown S, Janossy G. The cytoplasmic expression of CD3 antigens in normal and malignant cells of the T lymphoid lineage. J Immunol. 1987;138(2):648-55.
86. Chetty R, Gatter K. CD3: structure, function, and role of immunostaining in clinical practice. J Pathol. 1994;173(4):303-7.
87. Rathore AS, Kumar S, Konwar R, Makker A, Negi MP, Goel MM. CD3+, CD4+ & CD8+ tumour infiltrating lymphocytes (TILs) are predictors of favourable survival outcome in infiltrating ductal carcinoma of breast. Indian J Med Res. 2014;140(3):361-9.
88. Tomsova M, Melichar B, Sedlakova I, Steiner I. Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma. Gynecol Oncol. 2008;108(2):415-20.
89. Cermakova P, Melichar B, Tomsova M, Zoul Z, Kalabova H, Spacek J, et al. Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in patients with endometrial carcinoma. Anticancer Res. 2014;34(10):5555-61.
90. He M, Zuo C, Wang J, Liu J, Jiao B, Zheng J, et al. Prognostic significance of the aggregative perivascular growth pattern of tumor cells in primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma. Neuro Oncol. 2013;15(6):727-34.
91. Kumari N, Krishnani N, Rawat A, Agarwal V, Lal P. Primary central nervous system lymphoma: prognostication as per international extranodal lymphoma study group score and reactive CD3 collar. J Postgrad Med. 2009;55(4):247-51.
92. Ferreri AJM. Therapy of primary CNS lymphoma: role of intensity, radiation, and novel agents. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2017;2017(1):565-77.

93. Langner-Lemercier S, Houillier C, Soussain C, Ghesquieres H, Chinot O, Taillandier L, et al. Primary CNS lymphoma at first relapse/progression: characteristics, management, and outcome of 256 patients from the French LOC network. Neuro Oncol. 2016;18(9):1297-303.
94. Correa DD, Maron L, Harder H, Klein M, Armstrong CL, Calabrese P, et al. Cognitive functions in primary central nervous system lymphoma: literature review and assessment guidelines. Ann Oncol. 2007;18(7):1145-51.
95. Nelson DF, Martz KL, Bonner H, Nelson JS, Newall J, Kerman HD, et al. Non-Hodgkin's lymphoma of the brain: can high dose, large volume radiation therapy improve survival? Report on a prospective trial by the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG): RTOG 8315. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1992;23(1):9-17.
96. Alvarez-Pinzon AM, Wolf AL, Swedberg H, Coy SR, Valerio JE. Primary Central Nervous System Lymphoma (PCNSL): Analysis of Treatment by Gamma Knife Radiosurgery and Chemotherapy in a Prospective, Observational Study. Cureus. 2016;8(7):e697.
97. Morris PG, Correa DD, Yahalom J, Raizer JJ, Schiff D, Grant B, et al. Rituximab, methotrexate, procarbazine, and vincristine followed by consolidation reduced-dose whole-brain radiotherapy and cytarabine in newly diagnosed primary CNS lymphoma: final results and long-term outcome. J Clin Oncol. 2013;31(31):3971-9.
98. Doolittle ND, Korfel A, Lubow MA, Schorb E, Schlegel U, Rogowski S, et al. Long-term cognitive function, neuroimaging, and quality of life in primary CNS lymphoma. Neurology. 2013;81(1):84-92.
99. Lai R, Abrey LE, Rosenblum MK, DeAngelis LM. Treatment-induced leukoencephalopathy in primary CNS lymphoma: a clinical and autopsy study. Neurology. 2004;62(3):451-6.
100. Correa DD, DeAngelis LM, Shi W, Thaler HT, Lin M, Abrey LE. Cognitive functions in low-grade gliomas: disease and treatment effects. J Neurooncol. 2007;81(2):175-84.
101. Ferreri AJ. How I treat primary CNS lymphoma. Blood. 2011;118(3):510-22.
102. Batchelor T, Carson K, O'Neill A, Grossman SA, Alavi J, New P, et al. Treatment of primary CNS lymphoma with methotrexate and deferred radiotherapy: a report of NABTT 96-07. J Clin Oncol. 2003;21(6):1044-9.
103. Zhu JJ, Gerstner ER, Engler DA, Mrugala MM, Nugent W, Nierenberg K, et al. High-dose methotrexate for elderly patients with primary CNS lymphoma. Neuro Oncol. 2009;11(2):211-5.
104. Ferreri AJ, Reni M, Foppoli M, Martelli M, Pangalis GA, Frezzato M, et al. High-dose cytarabine plus high-dose methotrexate versus high-dose methotrexate alone in patients with primary CNS lymphoma: a randomised phase 2 trial. Lancet. 2009;374(9700):1512-20.
105. Batchelor TT, Grossman SA, Mikkelsen T, Ye X, Desideri S, Lesser GJ. Rituximab monotherapy for patients with recurrent primary CNS lymphoma. Neurology. 2011;76(10):929-30.

106. Song Y, Wen Y, Xue W, Zhang Y, Zhang M. Effect of rituximab on primary central nervous system lymphoma: a meta-analysis. Int J Hematol. 2017;106(5):612-21.
107. Omuro A, Correa DD, DeAngelis LM, Moskowitz CH, Matasar MJ, Kaley TJ, et al. R-MPV followed by high-dose chemotherapy with TBC and autologous stem-cell transplant for newly diagnosed primary CNS lymphoma. Blood. 2015;125(9):1403-10.
108. Glass J, Won M, Schultz CJ, Brat D, Bartlett NL, Suh JH, et al. Phase I and II Study of Induction Chemotherapy With Methotrexate, Rituximab, and Temozolomide, Followed By Whole-Brain Radiotherapy and Postirradiation Temozolomide for Primary CNS Lymphoma: NRG Oncology RTOG 0227. J Clin Oncol. 2016;34(14):1620-5.
109. Omuro A, Chinot O, Taillandier L, Ghesquieres H, Soussain C, Delwail V, et al. Methotrexate and temozolomide versus methotrexate, procarbazine, vincristine, and cytarabine for primary CNS lymphoma in an elderly population: an intergroup ANOCEF-GOELAMS randomised phase 2 trial. Lancet Haematol. 2015;2(6):e251-9.
110. Rubenstein JL, Li J, Chen L, Advani R, Drappatz J, Gerstner E, et al. Multicenter phase 1 trial of intraventricular immunochemotherapy in recurrent CNS lymphoma. Blood. 2013;121(5):745-51.
111. Khan RB, Shi W, Thaler HT, DeAngelis LM, Abrey LE. Is intrathecal methotrexate necessary in the treatment of primary CNS lymphoma? J Neurooncol. 2002;58(2):175-8.
112. Rubenstein JL, Fridlyand J, Abrey L, Shen A, Karch J, Wang E, et al. Phase I study of intraventricular administration of rituximab in patients with recurrent CNS and intraocular lymphoma. J Clin Oncol. 2007;25(11):1350-6.
113. Sierra Del Rio M, Ricard D, Houillier C, Navarro S, Gonzalez-Aguilar A, Idbaih A, et al. Prophylactic intrathecal chemotherapy in primary CNS lymphoma. J Neurooncol. 2012;106(1):143-6.
114. Ferreri AJ, Sassone M, Zaja F, Re A, Spina M, Rocco AD, et al. Lenalidomide maintenance in patients with relapsed diffuse large B-cell lymphoma who are not eligible for autologous stem cell transplantation: an open label, single-arm, multicentre phase 2 trial. Lancet Haematol. 2017;4(3):e137-e46.
115. Houillier C, Taillandier L, Lamy T, Chinot O, Molucon-Chabrot C, Soubeyran P, et al. Whole Brain Radiotherapy (WBRT) Versus Intensive Chemotherapy with Haematopoietic Stem Cell Rescue (IC + HCR) for Primary Central Nervous System Lymphoma (PCNSL) in Young Patients: An Intergroup Anocef-Goelams Randomized Phase II Trial (PRECIS). Blood. 2016;128(22):782.
116. Ferreri AJ, Illerhaus G. The role of autologous stem cell transplantation in primary central nervous system lymphoma. Blood. 2016;127(13):1642-9.
117. Kasenda B, Ihorst G, Schroers R, Korfel A, Schmidt-Wolf I, Egerer G, et al. High-dose chemotherapy with autologous haematopoietic stem cell support for relapsed or refractory primary CNS lymphoma: a prospective

multicentre trial by the German Cooperative PCNSL study group. Leukemia. 2017;31(12):2623-9.

118. Illerhaus G, Kasenda B, Ihorst G, Egerer G, Lamprecht M, Keller U, et al. High-dose chemotherapy with autologous haemopoietic stem cell transplantation for newly diagnosed primary CNS lymphoma: a prospective, single-arm, phase 2 trial. Lancet Haematol. 2016;3(8):e388-97.
119. Plotkin SR, Betensky RA, Hochberg FH, Grossman SA, Lesser GJ, Nabors LB, et al. Treatment of relapsed central nervous system lymphoma with high-dose methotrexate. Clin Cancer Res. 2004;10(17):5643-6.
120. Soussain C, Hoang-Xuan K, Taillandier L, Fourme E, Choquet S, Witz F, et al. Intensive chemotherapy followed by hematopoietic stem-cell rescue for refractory and recurrent primary CNS and intraocular lymphoma: Societe Francaise de Greffe de Moelle Osseuse-Therapie Cellulaire. J Clin Oncol. 2008;26(15):2512-8.
121. Nguyen PL, Chakravarti A, Finkelstein DM, Hochberg FH, Batchelor TT, Loeffler JS. Results of whole-brain radiation as salvage of methotrexate failure for immunocompetent patients with primary CNS lymphoma. J Clin Oncol. 2005;23(7):1507-13.
122. Sagiv-Barfi I, Kohrt HE, Czerwinski DK, Ng PP, Chang BY, Levy R. Therapeutic antitumor immunity by checkpoint blockade is enhanced by ibrutinib, an inhibitor of both BTK and ITK. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(9):E966-72.
123. Grommes C, Pastore A, Palaskas N, Tang SS, Campos C, Schartz D, et al. Ibrutinib Unmasks Critical Role of Bruton Tyrosine Kinase in Primary CNS Lymphoma. Cancer Discov. 2017;7(9):1018-29.
124. Grommes C, Younes A. Ibrutinib in PCNSL: The Curious Cases of Clinical Responses and Aspergillosis. Cancer Cell. 2017;31(6):731-3.
125. Lionakis MS, Dunleavy K, Roschewski M, Widemann BC, Butman JA, Schmitz R, et al. Inhibition of B Cell Receptor Signaling by Ibrutinib in Primary CNS Lymphoma. Cancer Cell. 2017;31(6):833-43 e5.
126. Hendriks RW, Yuvaraj S, Kil LP. Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. Nat Rev Cancer. 2014;14(4):219-32.
127. Korfel A, Schlegel U, Herrlinger U, Dreyling M, Schmidt C, von Baumgarten L, et al. Phase II Trial of Temsirolimus for Relapsed/Refractory Primary CNS Lymphoma. J Clin Oncol. 2016;34(15):1757-63.
128. Lopez-Girona A, Mendy D, Ito T, Miller K, Gandhi AK, Kang J, et al. Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide. Leukemia. 2012;26(11):2326-35.
129. Kronke J, Udeshi ND, Narla A, Grauman P, Hurst SN, McConkey M, et al. Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells. Science. 2014;343(6168):301-5.
130. Rubenstein JL, Fraser E, Formaker P, Lee JC-C, Chen N, Kock M, et al. Phase I investigation of lenalidomide plus rituximab and outcomes of lenalidomide

maintenance in recurrent CNS lymphoma. In: American Society of Clinical O, editor. ASCO 2016; Chicago, IL2016.

131. Braggio E, Van Wier S, Ojha J, McPhail E, Asmann YW, Egan J, et al. Genome-Wide Analysis Uncovers Novel Recurrent Alterations in Primary Central Nervous System Lymphomas. Clin Cancer Res. 2015;21(17):3986-94.
132. Rubenstein JL, Fridlyand J, Shen A, Aldape K, Ginzinger D, Batchelor T, et al. Gene expression and angiotropism in primary CNS lymphoma. Blood. 2006;107(9):3716-23.
133. Barakat M, Albitar M, Whitney RL, Chen C, Kuo Y-H, Silveira W, et al. Diversity of genetic alterations of primary central nervous system lymphoma in Hispanic versus non-Hispanic population. J Clin Oncol. 2019;37(15_suppl):7535-.
134. Knittel G, Liedgens P, Korovkina D, Seeger JM, Al-Baldawi Y, Al-Maarri M, et al. B-cell-specific conditional expression of Myd88p.L252P leads to the development of diffuse large B-cell lymphoma in mice. Blood. 2016;127(22):2732-41.
135. Bonzheim I, Giese S, Deuter C, Susskind D, Zierhut M, Waizel M, et al. High frequency of MYD88 mutations in vitreoretinal B-cell lymphoma: a valuable tool to improve diagnostic yield of vitreous aspirates. Blood. 2015;126(1):76-9.
136. Kersten MJ, Kraan W, Doorduijn J, Bromberg J, Lam K, Kluin PM, et al. Diffuse large B cell lymphomas relapsing in the CNS lack oncogenic MYD88 and CD79B mutations. Blood Cancer J. 2014;4:e266.
137. Montesinos-Rongen M, Schmitz R, Brunn A, Gesk S, Richter J, Hong K, et al. Mutations of CARD11 but not TNFAIP3 may activate the NF-kappaB pathway in primary CNS lymphoma. Acta Neuropathol. 2010;120(4):529-35.
138. Schwindt H, Vater I, Kreuz M, Montesinos-Rongen M, Brunn A, Richter J, et al. Chromosomal imbalances and partial uniparental disomies in primary central nervous system lymphoma. Leukemia. 2009;23(10):1875-84.
139. Grommes C, DeAngelis LM. Primary CNS Lymphoma. J Clin Oncol. 2017;35(21):2410-8.
140. (NCBI) BdDdNCfBI. MYC MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor. 2018 [cited 2018 02/10/2018]; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4609.
141. Knoepfler PS. Myc goes global: new tricks for an old oncogene. Cancer Res. 2007;67(11):5061-3.
142. Pfreundschuh M. Growing importance of MYC/BCL2 immunohistochemistry in diffuse large B-cell lymphomas. J Clin Oncol. 2012;30(28):3433-5.
143. Brunn A, Nagel I, Montesinos-Rongen M, Klapper W, Vater I, Paulus W, et al. Frequent triple-hit expression of MYC, BCL2, and BCL6 in primary lymphoma of the central nervous system and absence of a favorable MYC(low)BCL2 (low) subgroup may underlie the inferior prognosis as

compared to systemic diffuse large B cell lymphomas. Acta Neuropathol. 2013;126(4):603-5.

144. Gill KZ, Iwamoto F, Allen A, Hoehn D, Murty VV, Alobeid B, et al. MYC protein expression in primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system. PLoS One. 2014;9(12):e114398.
145. Vater I, Montesinos-Rongen M, Schlesner M, Haake A, Purschke F, Sprute R, et al. The mutational pattern of primary lymphoma of the central nervous system determined by whole-exome sequencing. Leukemia. 2015;29(3):677-85.
146. Gonzalez-Aguilar A, Idbaih A, Boisselier B, Habbita N, Rossetto M, Laurenge A, et al. Recurrent mutations of MYD88 and TBL1XR1 in primary central nervous system lymphomas. Clin Cancer Res. 2012;18(19):5203-11.
147. Bruno A, Boisselier B, Labreche K, Marie Y, Polivka M, Jouvet A, et al. Mutational analysis of primary central nervous system lymphoma. Oncotarget. 2014;5(13):5065-75.
148. National Institute of Health. 2019 [cited 2019 06/24/2019]; Available from: https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MYC#normalfunction
149. Bhatia K, Huppi K, Spangler G, Siwarski D, Iyer R, Magrath I. Point mutations in the c-Myc transactivation domain are common in Burkitt's lymphoma and mouse plasmacytomas. Nat Genet. 1993;5(1):56-61.
150. Nguyen L, Papenhausen P, Shao H. The Role of c-MYC in B-Cell Lymphomas: Diagnostic and Molecular Aspects. Genes (Basel). 2017;8(4).
151. Fischer L, Hummel M, Korfel A, Lenze D, Joehrens K, Thiel E. Differential micro-RNA expression in primary CNS and nodal diffuse large B-cell lymphomas. Neuro Oncol. 2011;13(10):1090-8.
152. (NCBI) BdDdNCfBI. BCL2 BCL2, apoptosis regulator [ Homo sapiens (human) ]. 2018 [cited 2018 02/10/2018]; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/596.
153. Hill ME, MacLennan KA, Cunningham DC, Vaughan Hudson B, Burke M, Clarke P, et al. Prognostic significance of BCL-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. Blood. 1996;88(3):1046-51.
154. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, Krajewska M, Horsman DE, Tolcher AW, et al. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Blood. 1997;90(1):244-51.
155. Alizadeh AA, Staudt LM. Genomic-scale gene expression profiling of normal and malignant immune cells. Curr Opin Immunol. 2000;12(2):219-25.
156. Yang Y, Shaffer AL, 3rd, Emre NC, Ceribelli M, Zhang M, Wright G, et al. Exploiting synthetic lethality for the therapy of ABC diffuse large B cell lymphoma. Cancer Cell. 2012;21(6):723-37.

157. Wang JQ, Jeelall YS, Beutler B, Horikawa K, Goodnow CC. Consequences of the recurrent MYD88(L265P) somatic mutation for B cell tolerance. J Exp Med. 2014;211(3):413-26.
158. Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, Rives S, Martinez A, Bosch F, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. Blood. 2003;101(1):78-84.
159. Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, Reyes F, Gaulard P, Coiffier B, et al. Estimating the impact of rituximab on bcl-2-associated resistance to CHOP in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma. Haematologica. 2006;91(5):715-6.
160. Fu K, Weisenburger DD, Choi WW, Perry KD, Smith LM, Shi X, et al. Addition of rituximab to standard chemotherapy improves the survival of both the germinal center B-cell-like and non-germinal center B-cell-like subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. J Clin Oncol. 2008;26(28):4587-94.
161. Wilson WH, Dunleavy K, Pittaluga S, Hegde U, Grant N, Steinberg SM, et al. Phase II study of dose-adjusted EPOCH and rituximab in untreated diffuse large B-cell lymphoma with analysis of germinal center and post-germinal center biomarkers. J Clin Oncol. 2008;26(16):2717-24.
162. Amoroso A, Hafsi S, Militello L, Russo AE, Soua Z, Mazzarino MC, et al. Understanding rituximab function and resistance: implications for tailored therapy. Front Biosci (Landmark Ed). 2011;16:770-82.
163. (NCBI) BdDdNCfBI. LMO2 LIM domain only 2 [ Homo sapiens (human) ]. [02/10/2017]; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4005.
164. Natkunam Y, Zhao S, Mason DY, Chen J, Taidi B, Jones M, et al. The oncoprotein LMO2 is expressed in normal germinal-center B cells and in human B-cell lymphomas. Blood. 2007;109(4):1636-42.
165. Nam CH, Rabbitts TH. The role of LMO2 in development and in T cell leukemia after chromosomal translocation or retroviral insertion. Mol Ther. 2006;13(1):15-25.
166. Younes SF, Beck AH, Lossos IS, Levy R, Warnke RA, Natkunam Y. Immunoarchitectural patterns in follicular lymphoma: efficacy of HGAL and LMO2 in the detection of the interfollicular and diffuse components. Am J Surg Pathol. 2010;34(9):1266-76.
167. Jiang CY, Yu JJ, Ruan Y, Wang XH, Zhao W, Wang XJ, et al. LIM domain only 2 over-expression in prostate stromal cells facilitates prostate cancer progression through paracrine of Interleukin-11. Oncotarget. 2016;7(18):26247-58.
168. Colomo L, Vazquez I, Papaleo N, Espinet B, Ferrer A, Franco C, et al. LMO2-negative Expression Predicts the Presence of MYC Translocations in Aggressive B-Cell Lymphomas. Am J Surg Pathol. 2017;41(7):877-86.
169. Alizadeh AA, Gentles AJ, Alencar AJ, Liu CL, Kohrt HE, Houot R, et al. Prediction of survival in diffuse large B-cell lymphoma based on the expression of 2 genes reflecting tumor and microenvironment. Blood. 2011;118(5):1350-8.

170. Lossos C, Bayraktar S, Weinzierl E, Younes SF, Hosein PJ, Tibshirani RJ, et al. LMO2 and BCL6 are associated with improved survival in primary central nervous system lymphoma. Br J Haematol. 2014;165(5):640-8.
171. (NCBI) BdDdNCfBI. MGMT O-6-methylguanine-DNA methyltransferase [ Homo sapiens (human) ]. 2018 [cited 2018 02/10/2018]; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4255.
172. Brady CA, Jiang D, Mello SS, Johnson TM, Jarvis LA, Kozak MM, et al. Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA-damage responses and tumor suppression. Cell. 2011;145(4):571-83.
173. Isono S, Fujishima M, Azumi T, Hashimoto Y, Komoike Y, Yukawa M, et al. O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase as a prognostic and predictive marker for basal-like breast cancer treated with cyclophosphamide-based chemotherapy. Oncol Lett. 2014;7(6):1778-84.
174. Brell M, Ibanez J, Tortosa A. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase protein expression by immunohistochemistry in brain and non-brain systemic tumours: systematic review and meta-analysis of correlation with methylation-specific polymerase chain reaction. BMC Cancer. 2011;11:35.
175. Preusser M. MGMT analysis at DNA, RNA and protein levels in glioblastoma tissue. Histol Histopathol. 2009;24(4):511-8.
176. Ohno T, Hiraga J, Ohashi H, Sugisaki C, Li E, Asano H, et al. Loss of O6-methylguanine-DNA methyltransferase protein expression is a favorable prognostic marker in diffuse large B-cell lymphoma. Int J Hematol. 2006;83(4):341-7.
177. Sturm RA, Cassady JL, Das G, Romo A, Evans GA. Chromosomal structure and expression of the human OTF1 locus encoding the Oct-1 protein. Genomics. 1993;16(2):333-41.
178. (NCBI) BdDdNCfBI. POU2F1 POU class 2 homeobox 1. 2018 [cited 2018 02/10/2018]; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5451.
179. Vazquez-Arreguin K, Maddox J, Kang J, Park D, Cano RR, Factor RE, et al. BRCA1 through Its E3 Ligase Activity Regulates the Transcription Factor Oct1 and Carbohydrate Metabolism. Mol Cancer Res. 2018;16(3):439-52.
180. Shakya A, Cooksey R, Cox JE, Wang V, McClain DA, Tantin D. Oct1 loss of function induces a coordinate metabolic shift that opposes tumorigenicity. Nat Cell Biol. 2009;11(3):320-7.
181. (NCBI) BdDdNCfBI. PDCD1 programmed cell death 1. 2018 [cited 2018 02/10/2018]; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5133.
182. Smeltzer JP, Jones JM, Ziesmer SC, Grote DM, Xiu B, Ristow KM, et al. Pattern of CD14+ follicular dendritic cells and PD1+ T cells independently predicts time to transformation in follicular lymphoma. Clin Cancer Res. 2014;20(11):2862-72.
183. Waki K, Yamada T, Yoshiyama K, Terazaki Y, Sakamoto S, Matsueda S, et al. PD-1 expression on peripheral blood T-cell subsets correlates with prognosis in non-small cell lung cancer. Cancer Sci. 2014;105(10):1229-35.

184. Muenst S, Hoeller S, Willi N, Dirnhofera S, Tzankov A. Diagnostic and prognostic utility of PD-1 in B cell lymphomas. Dis Markers. 2010;29(1):47-53.
185. Pauken KE, Wherry EJ. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. Trends Immunol. 2015;36(4):265-76.
186. Taube JM, Klein A, Brahmer JR, Xu H, Pan X, Kim JH, et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. Clin Cancer Res. 2014;20(19):5064-74.
187. Bertucci F, Finetti P, Colpaert C, Mamessier E, Parizel M, Dirix L, et al. PDL1 expression in inflammatory breast cancer is frequent and predicts for the pathological response to chemotherapy. Oncotarget. 2015;6(15):13506-19.
188. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. N Engl J Med. 2012;366(26):2443-54.
189. Robert C, Ribas A, Wolchok JD, Hodi FS, Hamid O, Kefford R, et al. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. Lancet. 2014;384(9948):1109-17.
190. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. N Engl J Med. 2015;372(4):320-30.
191. (NCBI) bdddNCfBI. BCL6 B cell CLL/lymphoma 6 [ Homo sapiens (human) ]. 2018 [cited 2018 02/10/2018]; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/604.
192. Barakat M, Albitar M, Xu-Monette Z, Young KH, Abdulhaq H. Molecular profiling of primary central nervous system lymphoma as compared to activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma. J Clin Oncol. 2019;37(15 suppl):7549-.
193. Cattoretti G, Chang CC, Cechova K, Zhang J, Ye BH, Falini B, et al. BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. Blood. 1995;86(1):45-53.
194. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. Nat Rev Immunol. 2008;8(1):22-33.
195. Park HY, Go H, Song HR, Kim S, Ha GH, Jeon YK, et al. Pellino 1 promotes lymphomagenesis by deregulating BCL6 polyubiquitination. J Clin Invest. 2014;124(11):4976-88.
196. Lossos IS, Jones CD, Warnke R, Natkunam Y, Kaizer H, Zehnder JL, et al. Expression of a single gene, BCL-6, strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. Blood. 2001;98(4):945-51.
197. Winter JN, Weller EA, Horning SJ, Krajewska M, Variakojis D, Habermann TM, et al. Prognostic significance of Bcl-6 protein expression in DLBCL treated with CHOP or R-CHOP: a prospective correlative study. Blood. 2006;107(11):4207-13.

198. Bellesso M, Bizzetto R, Pereira J, Beitler B, Pracchia LF, Chamone DAS. Linfoma primário do sistema nervoso central. Rev Bras Hematol Hemoter. 2008;30(1):6.
199. Kehdy FS, Gouveia MH, Machado M, Magalhaes WC, Horimoto AR, Horta BL, et al. Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(28):8696-701.
200. Bellomo R, Warrillow SJ, Reade MC. Why we should be wary of single-center trials. Crit Care Med. 2009;37(12):3114-9.
201. Mariani AW, Pego-Fernandes PM. Observational studies: why are they so important? Sao Paulo Medical Journal. 2014;132:01-2.
202. Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, et al. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. J Clin Oncol. 1989;7(11):1630-6.
203. Abrey LE, Yahalom J, DeAngelis LM. Treatment for primary CNS lymphoma: the next step. J Clin Oncol. 2000;18(17):3144-50.
204. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 2009;55(4):611-22.
205. Mitas M, Mikhitarian K, Walters C, Baron PL, Elliott BM, Brothers TE, et al. Quantitative real-time RT-PCR detection of breast cancer micrometastasis using a multigene marker panel. Int J Cancer. 2001;93(2):162-71.
206. Hulley SB, Cummings SR, Newman TB. Delineando a pesquisa clínica. Uma abordagem epidemiológica. Artmed, editor: Artmed; 2008.
207. Fischer RA. On the interpretation of χ2 from contingency tables, and the calculation of P. Journal of the Royal Statistical Society. 1922;85(1):8.
208. Fischer RA. Statistical Methods for Research Workers.: Oliver and Boyd; 1954.
209. Kaplan EM, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. Journal of American Statistical Association. 1958;53:467-81.
210. Schoenfeld D. The asymptotic properties of nonparametric tests for comparing survival distributions. Biometrika. 1981;68(1):316-9.
211. Cox DR. Regression Models and Life-Tables. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological). 1972;34(2):187-220.
212. Ulm K. Primary endpoints in cancer trials. J Thorac Dis. 2011;3(2):82-3.
213. National Cancer Institute at the National Institutes of Health. NCI Dictionary of Cancer Terms. 2019 [cited 2019]; Available from: https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms.
214. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. Biometrics. 1988;44(3):837-45.
215. Park SH, Goo JM, Jo CH. Receiver operating characteristic (ROC) curve: practical review for radiologists. Korean J Radiol. 2004;5(1):11-8.
216. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. Cancer. 1950;3(1):32-5.

217. Chen F, Xue Y, Tan MT, Chen P. Efficient statistical tests to compare Youden index: accounting for contingency correlation. Stat Med. 2015;34(9):1560-76.
218. Cohen J. A coefficient of Agreement for Nominal Scales. Educ Psychol Meas. 1960;20(1):37-46.
219. Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Green T, Wu L, Balasubramanyam A, et al. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. Blood. 2013;121(20):4021-31; quiz 250.
220. Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, Emile JF, Lederlin P, Sebban C, et al. Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2--associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). Blood. 2003;101(11):4279-84.
221. Uccella S, Cerutti R, Placidi C, Marchet S, Carnevali I, Bernasconi B, et al. MGMT methylation in diffuse large B-cell lymphoma: validation of quantitative methylation-specific PCR and comparison with MGMT protein expression. J Clin Pathol. 2009;62(8):715-23.
222. Geier A, Macias RI, Bettinger D, Weiss J, Bantel H, Jahn D, et al. The lack of the organic cation transporter OCT1 at the plasma membrane of tumor cells precludes a positive response to sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma. Oncotarget. 2017;8(9):15846-57.
223. Cogbill CH, Swerdlow SH, Gibson SE. Utility of CD279/PD-1 immunohistochemistry in the evaluation of benign and neoplastic T-cell-rich bone marrow infiltrates. Am J Clin Pathol. 2014;142(1):88-98.
224. Mrugala MM, Rubenstein JL, Ponzoni M, Batchelor TT. Insights into the biology of primary central nervous system lymphoma. Curr Oncol Rep. 2009;11(1):73-80.
225. Rubenstein JL, Gupta NK, Mannis GN, Lamarre AK, Treseler P. How I treat CNS lymphomas. Blood. 2013;122(14):2318-30.
226. Hackshaw A. Small studies: strengths and limitations. Eur Respir J. 2008;32(5):1141-3.
227. Altman DG, Bland JM. Absence of evidence is not evidence of absence. BMJ. 1995;311(7003):485.
228. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Vecchione-Koval T, Wolinsky Y, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. Neuro Oncol. 2017;19(suppl_5):v1-v88.
229. Siegal T, Bairey O. Primary CNS Lymphoma in the Elderly: The Challenge. Acta Haematol. 2019;141(3):138-45.
230. Ferreri AJ, Blay JY, Reni M, Pasini F, Spina M, Ambrosetti A, et al. Prognostic scoring system for primary CNS lymphomas: the International Extranodal Lymphoma Study Group experience. J Clin Oncol. 2003;21(2):266-72.

231. Corry J, Smith JG, Wirth A, Quong G, Liew KH. Primary central nervous system lymphoma: age and performance status are more important than treatment modality. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1998;41(3):615-20.
232. Schultz C, Scott C, Sherman W, Donahue B, Fields J, Murray K, et al. Preirradiation chemotherapy with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and dexamethasone for primary CNS lymphomas: initial report of radiation therapy oncology group protocol 88-06. J Clin Oncol. 1996;14(2):556-64.
233. Bessell EM, Lopez-Guillermo A, Villa S, Verger E, Nomdedeu B, Petit J, et al. Importance of radiotherapy in the outcome of patients with primary CNS lymphoma: an analysis of the CHOD/BVAM regimen followed by two different radiotherapy treatments. J Clin Oncol. 2002;20(1):231-6.
234. Zhao H, Ma M, Zhang L, Zheng G, Lv H, Liu J, et al. Diagnosis of central nervous system lymphoma via cerebrospinal fluid cytology: a case report. BMC Neurol. 2019;19(1):90.
235. Chiavazza C, Pellerino A, Ferrio F, Cistaro A, Soffietti R, Ruda R. Primary CNS Lymphomas: Challenges in Diagnosis and Monitoring. Biomed Res Int. 2018;2018:3606970.
236. Ferreri AJ, Reni M, Villa E. Primary central nervous system lymphoma in immunocompetent patients. Cancer Treat Rev. 1995;21(5):415-46.
237. Xavier FD, Levy D, Pereira J. Time-to-treatment of diffuse large B-cell lymphoma in Sao Paulo. Clinics (Sao Paulo). 2014;69(5):367-71.
238. Ferreri AJ. Primary central nervous system lymphoma: three linked questions in the situation puzzle of radiotherapy. Leuk Lymphoma. 2015;56(5):1185-7.
239. Juergens A, Pels H, Rogowski S, Fliessbach K, Glasmacher A, Engert A, et al. Long-term survival with favorable cognitive outcome after chemotherapy in primary central nervous system lymphoma. Ann Neurol. 2010;67(2):182-9.
240. Song J. Age as an independent predictive factor in survival outcomes of multimodality treatments for primary central nervous system lymphoma: A review from tertiary institution. In: EHA, editor. European Hematology Association; 05/16/2019; Amsterdam2019.
241. Bellinzona M, Roser F, Ostertag H, Gaab RM, Saini M. Surgical removal of primary central nervous system lymphomas (PCNSL) presenting as space occupying lesions: a series of 33 cases. Eur J Surg Oncol. 2005;31(1):100-5.
242. Bessell EM, Graus F, Lopez-Guillermo A, Lewis SA, Villa S, Verger E, et al. Primary non-Hodgkin's lymphoma of the CNS treated with CHOD/BVAM or BVAM chemotherapy before radiotherapy: long-term survival and prognostic factors. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2004;59(2):501-8.
243. DeAngelis LM, Seiferheld W, Schold SC, Fisher B, Schultz CJ, Radiation Therapy Oncology Group S. Combination chemotherapy and radiotherapy for primary central nervous system lymphoma: Radiation Therapy Oncology Group Study 93-10. J Clin Oncol. 2002;20(24):4643-8.

244. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med. 2006;27(2-3):95-125.
245. von Smolinski D, Leverkoehne I, von Samson-Himmelstjerna G, Gruber AD. Impact of formalin-fixation and paraffin-embedding on the ratio between mRNA copy numbers of differently expressed genes. Histochem Cell Biol. 2005;124(2):177-88.
246. Abrahamsen HN, Steiniche T, Nexo E, Hamilton-Dutoit SJ, Sorensen BS. Towards quantitative mRNA analysis in paraffin-embedded tissues using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction: a methodological study on lymph nodes from melanoma patients. J Mol Diagn. 2003;5(1):34-41.
247. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol. 2002;3(7):RESEARCH0034.
248. McCall MN, McMurray HR, Land H, Almudevar A. On non-detects in qPCR data. Bioinformatics. 2014;30(16):2310-6.
249. Chang CC, Kampalath B, Schultz C, Bunyi-Teopengco E, Logan B, Eshoa C, et al. Expression of p53, c-Myc, or Bcl-6 suggests a poor prognosis in primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma among immunocompetent individuals. Arch Pathol Lab Med. 2003;127(2):208-12.
250. Reed JC. Bcl-2 family proteins: regulators of chemoresistance in cancer. Toxicol Lett. 1995;82-83:155-8.
251. Visco C, Tzankov A, Xu-Monette ZY, Miranda RN, d'Amore ESG, Montes-Moreno S, et al. The t(14;18)(q32;q21) Characterizes a Subset of Patients with Diffuse Large-B Cell Lymphoma of Germinal Center Origin with Poor Outcome: Report From the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. Blood. 2011;21.
252. Cai Q, Fang Y, Young KH. Primary Central Nervous System Lymphoma: Molecular Pathogenesis and Advances in Treatment. Transl Oncol. 2019;12(3):523-38.
253. Montesinos-Rongen M, Brunn A, Bentink S, Basso K, Lim WK, Klapper W, et al. Gene expression profiling suggests primary central nervous system lymphomas to be derived from a late germinal center B cell. Leukemia. 2008;22(2):400-5.
254. Niparuck P, Boonsakan P, Sutthippingkiat T, Pukiat S, Chantrathammachart P, Phusanti S, et al. Treatment outcome and prognostic factors in PCNSL. Diagn Pathol. 2019;14(1):56.
255. Hermine O, Haioun C, Lepage E, d'Agay MF, Briere J, Lavignac C, et al. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). Blood. 1996;87(1):265-72.
256. Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. Nat Rev Genet. 2012;13(4):227-32.

257. Liu Y, Beyer A, Aebersold R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. Cell. 2016;165(3):535-50.
258. Nagaraj N, Wisniewski JR, Geiger T, Cox J, Kircher M, Kelso J, et al. Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. Mol Syst Biol. 2011;7:548.
259. Bujak M, Ratkaj I, Markova-Car E, Jurisic D, Horvatic A, Vucinic S, et al. Inflammatory Gene Expression Upon TGF-beta1-Induced p38 Activation in Primary Dupuytren's Disease Fibroblasts. Front Mol Biosci. 2015;2:68.
260. Maddox J, Shakya A, South S, Shelton D, Andersen JN, Chidester S, et al. Transcription factor Oct1 is a somatic and cancer stem cell determinant. PLoS Genet. 2012;8(11):e1003048.
261. Nakata K, Ohuchida K, Nagai E, Hayashi A, Miyasaka Y, Kayashima T, et al. LMO2 is a novel predictive marker for a better prognosis in pancreatic cancer. Neoplasia. 2009;11(7):712-9.
262. Aly RM, Taalab MM, Abdsalam EM, Elyamany OH, Hasan OE. High expression of LMO2 predicts a favorable outcome in adult patients with BCR/ABL negative B-cell acute lymphoblastic leukemia. Oncol Lett. 2016;11(3):1917-22.
263. Bertucci F, Finetti P, Mamessier E, Pantaleo MA, Astolfi A, Ostrowski J, et al. PDL1 expression is an independent prognostic factor in localized GIST. Oncoimmunology. 2015;4(5):e1002729.
264. Menter T, Bodmer-Haecki A, Dirnhofer S, Tzankov A. Evaluation of the diagnostic and prognostic value of PDL1 expression in Hodgkin and B-cell lymphomas. Hum Pathol. 2016;54:17-24.
265. Berghoff AS, Ricken G, Widhalm G, Rajky O, Hainfellner JA, Birner P, et al. PD1 (CD279) and PD-L1 (CD274, B7H1) expression in primary central nervous system lymphomas (PCNSL). Clin Neuropathol. 2014;33(1):42-9.
266. Cho H, Kim SH, Kim SJ, Chang JH, Yang WI, Suh CO, et al. Programmed cell death 1 expression is associated with inferior survival in patients with primary central nervous system lymphoma. Oncotarget. 2017;8(50):87317-28.
267. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. Annu Rev Immunol. 2009;27:591-619.
268. Sung CO, Kim SC, Karnan S, Karube K, Shin HJ, Nam DH, et al. Genomic profiling combined with gene expression profiling in primary central nervous system lymphoma. Blood. 2011;117(4):1291-300.
269. Basso K, Dalla-Favera R. Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells. Immunol Rev. 2012;247(1):172-83.
270. Niu H. The proto-oncogene BCL-6 in normal and malignant B cell development. Hematol Oncol. 2002;20(4):155-66.