GISELE RODRIGUES GOUVEIA

**Detecção da expressão dos genes associados à
resistência múltipla à droga, *OCT1* e *MDR1* e do gene
BCL2 em linfoma difuso de grandes células B**

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

Programa de Ciências Médicas

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

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Pereira

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Gouveia, Gisele Rodrigues

Detecção da expressão dos genes associados à resistência múltipla à droga, *OCT1* e *MDR1* e do gene *BCL2* em linfoma difuso de grandes células B / Gisele Rodrigues Gouveia. -- São Paulo, 2016.

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

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

Orientadora: Juliana Pereira.

Descritores: 1.Linfoma difuso de grandes células B 2.Expressão gênica 3.Reação em cadeia da polimerase em tempo real 4.Prognóstico 5.Sobrevida 6.Genes *BCL2* 7.Gene *MDR1* 8.Gene *OCT1*

USP/FM/DBD-444/16

DEDICATÓRIA

Ao Prof. Dr. Francisco das Chagas Valle (*in memoriam*) por projetar em mim seu amor, entusiasmo e dedicação à pesquisa científica e me guiar em meus primeiros passos profissionais com carinho e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

À minha família, em especial aos meus pais Agostinho e Fátima e à minha irmã Rosângela, a quem devo minha formação moral e profissional. Obrigada por todo amor, apoio incondicional, dedicação, incentivo e por me ensinarem a persistir em todos os momentos. Não há palavras suficientes para exprimir o meu eterno agradecimento.

Ao meu namorado Phillip, pelo amor, incentivo, companheirismo e apoio em todos os momentos ao longo destes anos. Obrigada por fazer parte da minha vida e dos meus projetos.

À pequena Letícia, que com sua ingenuidade, alegria e doçura, sempre tinha uma palavra de carinho nos momentos difíceis.

À minha orientadora, Prof. Dra. Juliana Pereira, pela oportunidade, ensinamentos, paciência, incentivo e confiança em mim depositada ao longo do desenvolvimento desta pesquisa. Obrigada pelo apoio e compreensão em todas as mudanças profissionais pelas quais passei durante esta caminhada.

À Dra. Sheila Aparecida Coelho Siqueira pelo auxílio na revisão dos casos, preparo dos cortes histológicos e reações de imunohistoquímica. Obrigada pela paciência e carinho com que sempre me recebeu, pelas palavras de apoio e por acreditar em meu trabalho. Seu auxílio e incentivo foram essenciais para a realização deste trabalho.

À Dra. Ester Cerdeira Sabino, que gentilmente disponibilizou seu laboratório e sua equipe para realização deste trabalho.

Às amigas Suzete Cleusa Ferreira, Anna Niyshia e Jerenice Esdras Ferreira do Departamento de Biologia Molecular da Fundação Pró-sangue, não apenas pelo carinho com o qual me receberam e pelo auxílio na parte experimental, mas por toda amizade, incentivo e apoio nos momentos difíceis.

Aos amigos Lis Vilela de Almeida e Alexandre de Almeida, pela amizade, carinho, apoio, paciência, ajuda e conselhos durante todo esse processo. A amizade, o carinho e incentivo de vocês foram essenciais para o meu crescimento pessoal e profissional. Lis, obrigada por contagiar a todos nós que convivemos com você com essa alegria, que torna os momentos difíceis muito mais suaves.

Aos amigos do Laboratório de Imunopatologia pela colaboração e apoio.

Ao Dr. Luis Alberto de Pádua Covas Lage, pelos ensinamentos, paciência e auxílio na revisão dos prontuários.

Aos meus chefes, Helena Brentani e Homero Pinto Vallada Filho, não apenas por dividirem os seus conhecimentos comigo a cada dia e confiarem em meu trabalho, mas por todo incentivo, compreensão e apoio ao longo desta jornada.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Clínica do Instituto de Psiquiatria do HC-FMUSP, Thais Chile, Jean Eduardo Lucas, Marli Brito de Oliveira, Elza

Jagiello, Kátia Ichi e Isabela Moraes pelo apoio durante este processo, convivência e amizade.

Às companheiras de pós-graduação e amigas Sheila de Oliveira Garcia e Maricleia Ferreira, pelo apoio e pelos momentos alegres que compartilhamos.

Às amigas Maria Regina Fernandes Pelixo Alves, Thais Helena Lopes Lima e Cristiani Martinez Salzone, pelas palavras de incentivo e apoio e por sempre acreditarem em mim.

Às secretárias do programa de pós-graduação em Ciências Médicas, Rose e Angélica, pela paciência com que sempre me receberam e orientações durante todo este processo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

A todos os pacientes pela confiança em participar deste estudo, tornando este projeto possível.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

*“O maior valor da vida não é o que
você conquista, mas o que você se
torna ao longo das suas conquistas”.*

(Jim Rohn)

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. 3 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

Sumário

Lista de abreviaturas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Abstract	
1 – Introdução	2
2 – Objetivos	7
3 – Revisão da Literatura	9
3.1- Definição do Linfoma Difuso de Grandes Células B	9
3.2- Epidemiologia	9
3.3- Etiologia	10
3.4- Patogênese	11
3.4.1- Eventos moleculares	12
3.4.2- Fatores ambientais	15
3.5- Locais de comprometimento	16
3.6- Classificação	16
3.7- Diagnóstico	19
3.7.1- Biópsia para anatomia patológica	20
3.7.2- Imunohistoquímica	20
3.7.3- Imunofenotipagem por citometria de fluxo	21
3.7.4- Métodos de imagem	22
3.7.5- Detecção de monoclonalidade	25
3.7.6- Anormalidades citogenéticas	25
3.8- Fatores de prognóstico	26
3.8.1- Fatores clínicos	26
3.8.2- Fatores biológicos	31
3.8.2.1- Gene <i>BCL2</i>	34
3.8.2.2- Gene <i>MDR1</i> e resistência à múltiplas drogas	39
3.8.2.3- Fatores OCT e gene <i>OCT1</i>	42
3.9- Tratamento	44
3.10- Avaliação da resposta e seguimento	46
4 – Métodos	50
4.1- Casuística	50
4.1.1- Caracterização dos pacientes	50
4.2- Métodos	51
4.2.1- Revisão dos prontuários	51
4.2.2- Estadiamento	53
4.2.3- Tratamento	54

4.2.4- Avaliação de resposta e seguimento	55
4.2.5- Preparo do material	57
4.2.6- Extração de RNA	57
4.2.7- Quantificação e análise da qualidade do RNA	59
4.2.8- Transcrição reversa (cDNA)	59
4.2.9- PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)	60
4.2.10- Extração de DNA	71
4.2.11- Quantificação e análise da qualidade do DNA	73
4.2.12- Detecção da translocação t(14;18)	73
4.2.13- Reações de Imunohistoquímica	74
4.2.14- Análise estatística	76
5 – Resultados	79
5.1- Revisão dos prontuários	79
5.1.1- Dados clínicos e laboratoriais	79
5.1.2- Resposta ao tratamento	82
5.2- Expressão gênica por qRT-PCR	82
5.3- Expressão proteica por Imunohistoquímica (IHQ)	83
5.4- Avaliação de Remissão	87
5.5- Análises de Sobrevida	93
5.5.1- Sobrevida Global (SG)	94
5.5.2- Sobrevida Livre de Doença (SLD).....	109
5.5.3- Sobrevida Livre de Progressão (SLP)	121
5.5.4- Análises de sobrevida dos subgrupos	137
5.6- Avaliação da t(14;18)	162
6 – Discussão	164
6.1- Revisão dos prontuários	164
6.2- Análises de expressão gênica e proteica	167
6.2.1- <i>BCL2</i>	170
6.2.2- <i>MDR1</i>	173
6.2.3- <i>OCT1</i>	178
6.4- Avaliação da t(14;18)	182
7 – Conclusão	186
8 – Anexos	189
Anexo A- Aprovação do estudo pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HC-FMUSP	189
Anexo B- Aprovação do adendo do estudo pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HC-FMUSP	190
Anexo C- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	191
Anexo D- Ficha de coleta de dados nos prontuários	194
Anexo E- Lista de publicações realizadas durante o desenvolvimento da pesquisa	195
9 – Referências Bibliográficas	198

LISTA DE ABREVIATURAS

Lista de Abreviaturas

- ABC: activated B-cell-like
- ATMO: transplante autólogo de medula óssea
- ATP: trifosfato de adenosina
- BEAM: carmustina, etoposida, citarabina e melfalan
- *BCL2: B-Cell CLL/Lymphoma*
- BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*
- °C: Grau Celsius
- CAPPesq: Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
- cDNA: DNA Complementar
- CF: citometria de fluxo
- CG: centro germinativo
- CHOP: ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina, prednisona
- cm: centímetro
- CNF: Cadastro Nacional de Falecidos
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- DNase: desoxirribonuclease
- DNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados
- DTT: ditioneitol
- EBV: vírus Epstein-Barr ou Herpes vírus humano 4
- ECOG: *Eastern Cooperative Oncologic Group*
- EDTA: ácido etileno diamino tetracético

- EPM: escore preditivo de mortalidade
- FDA: *Food and Drug Administration*
- FDG: 2-F18-fluoro-2-deoxi-glicose
- FFEP: fixado em formalina e embocado em parafina
- FISH: *fluorescent in situ hybridization* (hibridação in situ por fluorescência)
- GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- GCB: germinal center B-cell-like (células B do centro germinativo)
- GELA: *Groupe d'Etude de Lymphoma d'Adultes*
- HC-FMUSP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
- HIV: vírus da imunodeficiência humana
- HR: *hazard ratio* ou risco relativo
- ICESP: Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
- Ig: imunoglobulina
- IHQ: imunohistoquímica
- IPI: índice de prognóstico internacional
- IPI BR: índice de prognóstico internacional de baixo risco
- IPI IB: índice de prognóstico internacional de risco intermediário-baixo
- IPI IA: índice de prognóstico internacional de risco intermediário-alto
- IPI AR: índice de prognóstico internacional de alto risco
- Kb: quilobase (1000 pares de base de DNA ou RNA)
- KDa: quilodalton
- LDGCB: linfoma difuso de grandes células B
- DHL: nível de desidrogenase láctica

- LF: linfoma folicular
- LH: linfoma de Hodgkin
- LLC: leucemia linfocítica crônica
- LNH: linfoma não-Hodgkin
- M: molar
- MALT: *mucosa-associated lymphoid tissue* (tecido linfóide associado à mucosa)
- *MDR1*: gene de resistência à múltiplas drogas ATP-Binding Cassete Sub-família B, Membro1
- MgCl_2 : cloreto de magnésio
- mL: mililitro
- mM: milimolar
- MO: medula óssea
- NCBI: *National Center for Biotechnology Information*
- NF-KB: fator nuclear kappa B
- ng: nanogramas
- nm: nanômetros
- $\text{ng}/\mu\text{L}$: nanogramas por microlitro
- *OCT1*: gene *Octamer Transcription Factor*, domínio POU, classe 2, fator de transcrição 1
- OMS: Organização Mundial da Saúde
- PA: para análise
- PAAF: punção aspirativa com agulha fina
- pb: pares de base

- PBS: tampão fosfato salino
- PCR: reação em cadeia da polimerase
- Pg-p: glicoproteína P
- pH: potencial hidrogeniônico
- PMBCL: *Primary Mediastinal Diffuse Large B-cell Lymphoma* (linfoma de células B primário mediastínico)
- Primer F: *primer forward*
- Primer R: *primer reverse*
- *PRKG1: protein kinase, cGMP-dependent, type 1* (proteína quinase cGMP [monofosfato cíclico de guanosina] dependente tipo 1)
- qRT-PCR: RT-PCR quantitativo em tempo real
- RC: resposta completa
- R-DHAP: rituximabe, dexametasona, citarabina em doses altas e cisplatina
- R-ICE: rituximabe, ifosfamida, etoposida e carboplatina
- RM: ressonância magnética
- RNA: ácido ribonucleico
- RNAm: RNA mensageiro
- RNase: ribonuclease
- RP: resposta parcial
- rpm: rotações por minuto
- R-CHOP: rituximabe, ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina, prednisona
- SG: sobrevida global
- SLD: sobrevida livre de doença
- SLE: sobrevida livre de eventos

- SLP: sobrevida livre de progressão
- SNC: sistema nervoso central
- t(14;18): translocação 14;18
- *TBP*: *TATA binding protein* (proteína de ligação TATA)
- TC: tomografia computadorizada
- TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido
- TE: tampão Tris-EDTA
- TGI: trato gastrointestinal
- U/l: unidades por Litro
- USG: ultrassonografia
- µg: micrograma
- µL: microlitro
- µm: micrômetros

LISTA DE FIGURAS

Lista de Figuras

Figura 1- Esquema de diferenciação e maturação dos linfócitos B normais e possíveis alterações moleculares que podem levar à patogênese do LDGCB	11
Figura 2- Principais lesões genéticas presentes na patogênese do LDGCB e suas respectivas frequências	14
Figura 3- Estadiamento de Ann Arbor	29
Figura 4- Levantamento de dados para seleção de pacientes para o estudo	52
Figura 5- Informações coletadas nos prontuários médicos dos pacientes selecionados para o estudo	53
Figura 6- Alinhamento dos primers no Primer-Blast do NCBI	62
Figura 7- Avaliação da eficiência de amplificação dos genes <i>BCL2</i> e <i>PRKG1</i>	65
Figura 8- Avaliação da eficiência de amplificação dos genes <i>MDR1</i> e <i>PRKG1</i>	66
Figura 9- Avaliação da eficiência de amplificação dos genes <i>OCT1</i> e <i>PRKG1</i>	67
Figura 10- Avaliação da eficiência de amplificação dos genes <i>BCL2</i> e <i>GAPDH</i>	68
Figura 11- Avaliação da eficiência de amplificação dos genes <i>MDR1</i> e <i>GAPDH</i>	69
Figura 12- Avaliação da eficiência de amplificação dos genes <i>OCT1</i> e <i>GAPDH</i>	70
Figura 13- Lâmina de Imunohistoquímica demonstrando expressão positiva de BCL-2	84
Figura 14- Lâmina de Imunohistoquímica demonstrando expressão positiva para a proteína Pg-p em 10 a 50% das células (+2/+3)	85
Figura 15- Lâmina de Imunohistoquímica demonstrando expressão positiva para a proteína Pg-p em mais de 50% das células (+3/+3)	85
Figura 16- Lâmina de Imunohistoquímica demonstrando expressão positiva moderada (+2/+3) para a proteína OCT-1.....	86
Figura 17- Lâmina de Imunohistoquímica demonstrando expressão positiva intensa (+3/+3) para a proteína OCT-1	86
Figura 18- Curva de SG em relação à idade	96
Figura 19- Curva de SG em relação ao número de sítios extralinfonodais	97
Figura 20- Curva de SG em relação ao estágio clínico	98
Figura 21- Curva de SG em relação ao IPI	99

Figura 22- Curva de SG em relação ao nível de DHL	100
Figura 23- Curva de SG em relação ao sexo	101
Figura 24- Curva de SG em relação ao acometimento de MO	101
Figura 25- Curva de SG em relação ao acometimento de SNC	102
Figura 26- Curva de SG em relação ao <i>performance status</i>	102
Figura 27- Curva de SG em relação à presença de <i>bulky</i>	103
Figura 28- Curva de SG em relação à presença de sintomas B	103
Figura 29- Curva de SG em relação à expressão do gene <i>OCT1</i>	104
Figura 30- Curva de SG em relação à expressão do gene <i>BCL2</i>	105
Figura 31- Curva de SG em relação à expressão do gene <i>MDR1</i>	105
Figura 32- Curva de SG em relação à expressão da proteína BCL-2	106
Figura 33- Curva de SG em relação à expressão da proteína Pg-p	107
Figura 34- Curva de SG em relação à expressão da proteína OCT-1.....	107
Figura 35- Curva de SLD em relação ao sexo	112
Figura 36- Curva de SLD em relação à idade	113
Figura 37- Curva de SLD em relação ao acometimento de MO	113
Figura 38- Curva de SLD em relação ao acometimento de SNC	114
Figura 39- Curva de SLD em relação ao número de sítios extralinfonodais	114
Figura 40- Curva de SLD em relação ao <i>performance status</i>	115
Figura 41- Curva de SLD em relação à presença de <i>bulky</i>	115
Figura 42- Curva de SLD em relação à presença de sintomas B	116
Figura 43- Curva de SLD em relação ao estágio clínico	116
Figura 44- Curva de SLD em relação ao IPI	117
Figura 45- Curva de SLD em relação aos níveis de DHL	117
Figura 46- Curva de SLD em relação à expressão do gene <i>BCL2</i>	118
Figura 47- Curva de SLD em relação à expressão do gene <i>MDR1</i>	118
Figura 48- Curva de SLD em relação à expressão do gene <i>OCT1</i>	119
Figura 49- Curva de SLD em relação à expressão da proteína BCL-2	119
Figura 50- Curva de SLD em relação à expressão da proteína Pg-p	120
Figura 51- Curva de SLD em relação à expressão da proteína OCT-1....	120
Figura 52- Curva de SLP em relação à idade	123
Figura 53- Curva de SLP em relação ao número de sítios extralinfonodais	124
Figura 54- Curva de SLP em relação ao estágio clínico	125
Figura 55- Curva de SLP em relação ao IPI	126
Figura 56- Curva de SLP em relação ao nível de DHL	127
Figura 57- Curva de SLP em relação ao sexo	128
Figura 58- Curva de SLP em relação ao acometimento de MO	128
Figura 59- Curva de SLP em relação ao acometimento de SNC.....	129
Figura 60- Curva de SLP em relação ao <i>performance status</i>	129
Figura 61- Curva de SLP em relação à presença de <i>bulky</i>	130
Figura 62- Curva de SLP em relação à presença de sintomas B	130

Figura 63- Curva de SLP em relação à expressão do gene <i>BCL2</i>	133
Figura 64- Curva de SLP em relação à expressão do gene <i>MDR1</i>	133
Figura 65- Curva de SLP em relação à expressão do gene <i>OCT1</i>	134
Figura 66- Curva de SLP em relação à expressão da proteína BCL-2	135
Figura 67- Curva de SLP em relação à expressão da proteína Pg-p	135
Figura 68- Curva de SLP em relação à expressão da proteína OCT-1	136
Figura 69- Curvas de SG em relação à expressão do gene <i>BCL2</i> para os subgrupos de estágio	140
Figura 70- Curvas de SG em relação à expressão do gene <i>MDR1</i> para os subgrupos de estágio	140
Figura 71- Curvas de SG em relação à expressão do gene <i>OCT1</i> para os subgrupos de estágio	141
Figura 72- Curvas de SG em relação à expressão da proteína BCL-2 para os subgrupos de estágio	141
Figura 73- Curvas de SG em relação à expressão da proteína Pg-p para os subgrupos de estágio	142
Figura 74- Curvas de SG em relação à expressão da proteína OCT-1 para os subgrupos de estágio	142
Figura 75- Curvas de SLP em relação à expressão do gene <i>BCL2</i> para os subgrupos de estágio	143
Figura 76- Curvas de SLP em relação à expressão do gene <i>MDR1</i> para os subgrupos de estágio	143
Figura 77- Curvas de SLP em relação à expressão do gene <i>OCT1</i> para os subgrupos de estágio	144
Figura 78- Curvas de SLP em relação à expressão da proteína BCL-2 para os subgrupos de estágio	144
Figura 79- Curvas de SLP em relação à expressão da proteína Pg-p para os subgrupos de estágio	145
Figura 80- Curvas de SLP em relação à expressão da proteína OCT-1 para os subgrupos de estágio	145
Figura 81- Curvas de SG em relação à expressão do gene <i>BCL2</i> para os subgrupos de IPI	148
Figura 82- Curvas de SG em relação à expressão do gene <i>MDR1</i> para os subgrupos de IPI	148
Figura 83- Curvas de SG em relação à expressão do gene <i>OCT1</i> para os subgrupos de IPI	149
Figura 84- Curvas de SG em relação à expressão da proteína BCL-2 para os subgrupos de IPI	149
Figura 85- Curvas de SG em relação à expressão da proteína Pg-p para os subgrupos de IPI	150
Figura 86- Curvas de SG em relação à expressão da proteína OCT-1 para os subgrupos de IPI	150
Figura 87- Curvas de SLP em relação à expressão do gene <i>BCL2</i> para	

os subgrupos de IPI	151
Figura 88- Curvas de SLP em relação à expressão do gene <i>MDR1</i> para os subgrupos de IPI	151
Figura 89- Curvas de SLP em relação à expressão do gene <i>OCT1</i> para os subgrupos de IPI	152
Figura 90- Curvas de SLP em relação à expressão da proteína BCL-2 para os subgrupos de IPI	152
Figura 91- Curvas de SLP em relação à expressão da proteína Pg-p para os subgrupos de IPI	153
Figura 92- Curvas de SLP em relação à expressão da proteína OCT-1 para os subgrupos de IPI	153
Figura 93- Curvas de SG em relação à expressão do gene <i>BCL2</i> para os subgrupos de idade	156
Figura 94- Curvas de SG em relação à expressão do gene <i>MDR1</i> para os subgrupos de idade	156
Figura 95- Curvas de SG em relação à expressão do gene <i>OCT1</i> para os subgrupos de idade	157
Figura 96- Curvas de SG em relação à expressão da proteína BCL-2 para os subgrupos de idade	157
Figura 97- Curvas de SG em relação à expressão da proteína Pg-p para os subgrupos de idade	158
Figura 98- Curvas de SG em relação à expressão da proteína OCT-1 para os subgrupos de idade	158
Figura 99- Curvas de SLP em relação à expressão do gene <i>BCL2</i> para os subgrupos de idade	159
Figura 100- Curvas de SLP em relação à expressão do gene <i>MDR1</i> para os subgrupos de idade	159
Figura 101- Curvas de SLP em relação à expressão do gene <i>OCT1</i> para os subgrupos de idade	160
Figura 102- Curvas de SLP em relação à expressão da proteína BCL-2 para os subgrupos de idade	160
Figura 103- Curvas de SLP em relação à expressão da proteína Pg-p para os subgrupos de idade	161
Figura 104- Curvas de SLP em relação à expressão da proteína OCT-1 para os subgrupos de idade	161
Figura 105- Resultado da reação de Nested-PCR para t(14;18)	162

LISTA DE TABELAS

Lista de Tabelas

Tabela 1- Sistema de estadiamento de Ann Arbor	29
Tabela 2- <i>Performance status</i> : escala de desempenho ECOG para os LDGCB	30
Tabela 3- Índice de Prognóstico Internacional (IPI) para os LDGCB	31
Tabela 4- Protocolo CVP citoreduutor	54
Tabela 5- Protocolo R-CHOP	55
Tabela 6- Primers e sondas dos genes referência e alvo utilizados nas reações de PCR quantitativo em tempo real e tamanho dos produtos esperados	63
Tabela 7- Primers utilizados nas reações de Nested-PCR para detecção da t(14;18)	74
Tabela 8- Anticorpos utilizados nas reações de Imunohistoquímica	76
Tabela 9- Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LDGCB	81
Tabela 10- Resposta ao tratamento dos pacientes com LDGCB	82
Tabela 11- Expressão proteica por IHQ nos pacientes com LDGCB	84
Tabela 12- Associação entre variáveis clínicas e laboratoriais com a Remissão Completa pelo Teste Exato de Fisher	88
Tabela 13- Associação entre variáveis de expressão gênica e proteica com a Remissão Completa pelo Teste Exato de Fisher	89
Tabela 14- Associação entre IPI e expressão gênica e proteica obtidos pelo Teste de Qui-quadrado	91
Tabela 15- Associação entre estágio clínico e expressão gênica e proteica obtidos pelo Teste de Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher..	92
Tabela 16- Associação entre idade e expressão gênica e proteica obtidos pelo Teste de Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher	93
Tabela 17- Estimativa dos tempos medianos de Sobrevida Global dos pacientes em relação aos dados clínicos e laboratoriais	95
Tabela 18- Estimativa dos tempos medianos de Sobrevida Global dos pacientes em relação aos dados de expressão gênica e proteica	108
Tabela 19- Resultado da análise de regressão múltipla de Cox para SG dos pacientes incluídos no estudo	109
Tabela 20- Estimativa dos tempos medianos de Sobrevida Livre de Doença em relação aos dados clínicos e laboratoriais	110
Tabela 21- Estimativa dos tempos medianos de Sobrevida Livre de Doença em relação aos dados de expressão gênica e proteica	111
Tabela 22- Estimativa dos tempos medianos de Sobrevida Livre de Progressão em relação aos dados clínicos e laboratoriais	122

Tabela 23- Estimativa dos tempos medianos de Sobrevida Livre de Progressão em relação aos dados de expressão gênica e proteica	132
Tabela 24- Resultado do modelo de regressão múltipla de Cox para Sobrevida Livre de Progressão	137
Tabela 25- Sobrevida Global para as categorias de expressão gênica e proteica estratificadas pelo estadiamento	138
Tabela 26- Sobrevida Livre de Progressão para as categorias de expressão gênica e proteica estratificadas pelo estadiamento	139
Tabela 27- Sobrevida Global para as categorias de expressão gênica e proteica estratificadas pelo IPI	146
Tabela 28- Sobrevida Livre de Progressão para as categorias de expressão gênica e proteica estratificadas pelo IPI	147
Tabela 29- Sobrevida Global para as categorias de expressão gênica e proteica estratificadas pela idade	154
Tabela 30- Sobrevida Livre de Progressão para as categorias de expressão gênica e proteica estratificadas pela idade	155

RESUMO

Resumo

Gouveia GR. *Detecção da expressão dos genes associados à resistência múltipla à droga, OCT1 e MDR1 e do gene BCL2 em linfoma difuso de grandes células B* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

O linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) é o subtipo de linfoma mais comum em países em desenvolvimento. Entretanto, apesar de sua prevalência e importância, ainda existem poucas publicações com dados epidemiológicos para a população brasileira. Conhecer os fatores de prognóstico é imperativo para identificar os pacientes que responderão melhor ao tratamento, além de permitir sua individualização terapêutica. Alguns estudos demonstraram que pacientes com o mesmo Índice Internacional de Prognóstico (IPI) podem apresentar diferentes sobrevidas, justificando a necessidade de identificar novos marcadores biológicos de prognóstico. O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto prognóstico da expressão dos genes *BCL2*, *MDR1* e *OCT1*, de suas respectivas proteínas e da translocação t(14;18), nos desfechos de resposta completa (RC), sobrevida global (SG), sobrevida livre de doença (SLD) e sobrevida livre de progressão (SLP) em pacientes com LDGCB. Foram avaliados de forma retrospectiva 98 pacientes com LDGCB *de novo* tratados com R-CHOP. A expressão gênica foi avaliada por PCR em Tempo Real com RNA extraído de amostras parafinadas. A expressão proteica foi avaliada pelo método de imuno-histoquímica. A mediana de idade foi de 54,5 anos e 49 pacientes (50%) eram do sexo masculino. Sessenta e quatro pacientes (85,3%)

obtiveram RC, com uma mediana de acompanhamento de 2,66 anos. A expressão mediana de *BCL2*, *MDR1* e *OCT1* foi 6,27; 0 e 24,49, respectivamente. Não encontramos impacto prognóstico da expressão do gene *BCL2* na RC ($p=0,277$), SG ($p=0,068$) e SLD ($p=0,860$). Porém, a expressão de *BCL2* $\geq$ à mediana associou-se à menor SLP ($p=0,040$). Encontramos associação entre expressão do gene *OCT1* $\geq$ à mediana e pior prognóstico para SG ($p=0,010$) e SLP ($p=0,016$). Porém, não observamos impacto prognóstico da expressão de *OCT1* para RC ($p=0,464$) e SLD ($p=0,717$). Não houve associação entre expressão do gene *MDR1* e das proteínas BCL-2, Pg-p e OCT-1 com o prognóstico dos pacientes em relação à RC, SG, SLD e SLP. O número de sítios extralinfonodais ($p=0,004$ e $p=0,005$), estágio clínico ($p<0,001$ para ambas), IPI ($p<0,001$ para ambas) e nível de DHL ($p=0,010$ e $p=0,008$) apresentaram impacto prognóstico na SG e SLP, respectivamente. Quando os pacientes foram estratificados pelo estágio, IPI e idade, o grupo com expressão de *OCT1* $\geq$ à mediana e IPI intermediário-alto ou alto risco apresentou pior SG ($p=0,048$) e o grupo com idade ≥ 60 anos e expressão de *OCT1* $\geq$ à mediana apresentou pior prognóstico para SG e SLP ($p=0,025$ para ambas). Em conclusão, a expressão de *MDR1* não apresentou impacto no prognóstico de portadores de LDGCB, porém, a expressão do gene *BCL2* $\geq$ à mediana foi associada a menor SLP. Além disso, a hiperexpressão de *OCT1* apresentou valor preditivo de prognóstico para a SG e SLP em pacientes com LDGCB tratados com R-CHOP.

Descritores: Linfoma difuso de grandes células B; expressão gênica; reação em cadeia da polimerase em tempo real; prognóstico; sobrevida; genes *BCL2*, gene *MDR1*; gene *OCT1*.

ABSTRACT

Abstract

Gouveia GR. *Detection of the expression of genes associated with multiple drug resistance, OCT-1 and MDR-1 and BCL-2 gene in diffuse large B-cell lymphoma* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

The diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most common lymphoma subtype in developing countries. However, despite its prevalence and importance, there are still few publications showing the epidemiological data of the Brazilian population. Knowing the prognostic factors is imperative to identify patients supposed to better respond to treatment, as well as to allow their therapeutic individualization. Some studies have shown that patients with the same International Prognostic Index (IPI) may present different survival rates, thus justifying the need to identify new prognosis biomarkers. The aim of this study was to assess the prognostic impact of the genes *BCL2*, *MDR1* and *OCT1* and their respective proteins and t (14; 18) translocation on the complete response (CR), overall survival (OS), disease-free survival (DFS) and progression-free survival (PFS) of patients with DLBCL. We retrospectively assessed 98 patients with *de novo* DLBCL treated with R-CHOP. The gene expression was assessed through real-time PCR using RNA extracted from paraffin samples. The protein expression was assessed through the immunohistochemistry method. The median age was 54.5 years; 49 patients (50%) were men. Sixty-four patients (85.3%) had CR and median follow-up 2.66 years. The median expression of *BCL2*, *MDR1* and *OCT1* was 6.27; 0 and

24.49, respectively. We did not find the prognostic impact of the *BCL2* gene expression on CR ($p = 0.277$), OS ($p = 0.068$) and on DFS ($p = 0.860$). However, the expression of *BCL2* $\geq$ the median was associated with the lower PFS ($p = 0.040$). We found association between *OCT1* gene expression $\geq$ the median and worse prognosis for OS ($p = 0.010$) and PFS ($p = 0.016$). However, we did not find the prognostic impact of *OCT1* expression on CR ($p = 0.464$) and DFS ($p = 0.717$). There was no association between the *MDR1* gene expression and the BCL-2, Pg-p and OCT-1 proteins, and the patients' prognosis regarding CR, OS, DFS and PFS. The number of extranodal sites ($p = 0.004$ and $p = 0.005$), the clinical status ($p < 0.001$ for both), the IPI ($p < 0.001$ for both) and DHL levels ($p = 0.010$ and $p = 0.008$) presented PFS, respectively. When the patients were stratified by stage, IPI and age, the group with *OCT1* expression at the median and intermediate-to-high or high-risk IPI had worse OS results ($p = 0.048$) and the patients in the age group ≥ 60 years and expression of *OCT1* $\geq$ the median presented worse prognosis for OS and PFS ($p = 0.025$ for both). Therefore, the *MDR1* expression had no impact on the prognosis of DLBCL carriers. However, the expression of the *BCL2* gene $\geq$ the median was associated with lower PFS. In addition, the *OCT1* hyperexpression presented a predictive prognosis value for OS and PFS in patients with DLBCL treated with R-CHOP.

Descriptors: lymphoma, large B-cell, diffuse; gene expression; real-time polymerase chain reaction; prognosis; survival; genes, *BCL2*; gene, *MDR1*; gene, *OCT1*.

INTRODUÇÃO

1 – Introdução

O termo “linfoma” identifica um grupo heterogêneo de neoplasias biologicamente e clinicamente distintas, que se originam nos órgãos linfóides (Novak et al., 2011).

A descrição destas neoplasias teve início em 1832 a partir da publicação do artigo de Thomas Hodgkin, um médico patologista inglês, que descreveu a clínica e os achados patológicos pós-morte de sete pacientes com aumento de linfonodos e baço, mas sem sinais de inflamação ou outros achados de significância patológica. Em 1865, Samuel Wilks escreveu um artigo mais detalhado sobre pacientes com estas características e utilizou pela primeira vez o termo “Doença de Hodgkin”, immortalizando seu antecessor. Mais tarde, outros pesquisadores utilizaram o microscópio para examinar os tecidos de pacientes com estas condições e reconheceram células gigantes características (Stone, 2005).

Historicamente, os linfomas têm sido subdivididos em dois grandes grupos devido a diferenças morfológicas: os linfomas de Hodgkin (LH) e os linfomas não-Hodgkin (LNH). (Novak et al., 2011).

Os LNH correspondem a 4% de todas as neoplasias humanas, sendo mais frequentes no sexo masculino, em caucasianos e indivíduos com idade média de 50 anos. Sua incidência mundial tem aumentado rapidamente, constituindo um problema de saúde pública (Gonçalves, 1999).

O subtipo mais comum é o linfoma difuso de grandes células B (LDGCB), caracterizado por proliferação difusa de grandes células linfóides B,

de núcleo maior ou igual ao do macrófago ou duas vezes superior ao do linfócito normal. Trata-se de uma doença agressiva e composta por diferentes subtipos com características clínicas e biológicas heterogêneas (WHO, 2008).

Há algum tempo, a classificação dos LDGCB era realizada com base na morfologia, porém, atualmente, características imunológicas e moleculares também são utilizadas para melhor caracterização dos subtipos. Isto foi possível devido à padronização de técnicas como imunohistoquímica (IHQ), citometria de fluxo (CF), citogenética e várias técnicas moleculares, incluindo a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o microarray.

A transformação de uma célula normal em neoplásica envolve uma série de eventos genéticos e moleculares, que interferem tanto no processo de proliferação quanto de diferenciação celular (Klumb, 2001). Sabe-se que fatores hereditários e ambientais também têm influência neste processo (Araújo et al., 2008).

O câncer surge a partir de uma célula com DNA modificado e que, por isso, é capaz de escapar dos mecanismos de reparo e controle do ciclo celular. As células descendentes formadas por mitose acumulam mutações que vão se somando e resultam na célula cancerosa (Junqueira e Carneiro, 2005).

A caracterização molecular das mais frequentes anormalidades genéticas associadas com o desenvolvimento dos linfomas tem levado à identificação de diversos oncogenes e genes supressores de tumor, cujo funcionamento anormal contribui para a patogênese da doença (Novak et al., 2011).

Os oncogenes estimulam o crescimento celular e limitam a diferenciação das células. Quando estes genes estão alterados, codificam suas proteínas nas

ocasiões em que não são necessárias ou de forma alterada, levando a formação dos tumores. Já os genes supressores de tumor, que promovem a diferenciação celular e limitam a proliferação, geralmente perdem sua função. Assim, alterações genéticas relacionadas aos linfomas bem como a outros tipos de câncer, frequentemente resultam na perda da regulação de genes envolvidos na proliferação celular através da ativação dos oncogenes e da perda de diferenciação celular, através do silenciamento de genes supressores de tumor (Klumb, 2001; Junqueira e Carneiro, 2005).

No LDGCB, alguns oncogenes codificam proteínas que inibem a apoptose, um mecanismo de morte celular programada importante para a defesa contra os defeitos do DNA. Assim, células cujo DNA sofreu mutação, tornando-se cancerosas e que, por isso, deveriam ser eliminadas por apoptose, continuam a se proliferar (Junqueira e Carneiro, 2005). Dentre eles, destacam-se os genes *BCL2* e *BCL6*.

Um número significativo de genes relacionados aos linfomas são fatores de transcrição, que além de se ligarem ao DNA, são capazes de interagir com outros fatores de transcrição, resultando na ativação ou inibição de programas de expressão gênica, que controlam a proliferação e diferenciação celular (Klumb, 2001). Neste grupo, destacam-se os fatores OCT.

Um terceiro grupo de genes pode, ainda, interferir na patogênese e prognóstico dos linfomas: são os genes relacionados à resistência à múltiplas drogas, dos quais se destaca o gene *MDR1*.

Perfis de expressão gênica têm sido avaliados para predizer o prognóstico, permitindo que os grupos de risco identificados pelo Índice de

Prognóstico Internacional (IPI) sejam aprimorados (Veloso e Clementino, 2007).

A compreensão de fatores associados à fisiopatologia dos LDGCB, incluindo alterações genéticas e perfis de expressão gênica, além de outros fatores de prognóstico é de extrema importância, uma vez que estes são essenciais para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas de prevenção ou superação da resistência ao tratamento, podendo favorecer o desenvolvimento de terapia-alvo individualizada.

A presente pesquisa tem como principal objetivo avaliar o impacto prognóstico da expressão dos genes *BCL2*, *MDR1* e *OCT1* e de suas respectivas proteínas (BCL-2, Pg-p e OCT-1) em portadores de linfoma difuso de grandes células B *de novo* ao diagnóstico. Além disso, avaliar a presença da translocação cromossômica t(14;18), usualmente relacionada à hiperexpressão do gene *BCL2*.

OBJETIVOS

2 – Objetivos

2.1- Objetivo Geral

Avaliar a expressão dos genes *BCL2*, *MDR1* e *OCT1* em pacientes com LDGCB *de novo*.

2.2- Objetivos Específicos

Avaliar o impacto da expressão dos genes *BCL2*, *MDR1* e *OCT1* na resposta global (remissão completa e remissão parcial) e na sobrevida global, sobrevida livre de doença e sobrevida livre de progressão em pacientes com LDGCB *de novo*.

Avaliar o impacto da expressão das proteínas BCL-2, Pg-p e OCT-1 na resposta global, sobrevida global, sobrevida livre de doença e sobrevida livre de progressão em pacientes com LDGCB *de novo*.

Correlacionar dados clínicos e laboratoriais dos prontuários com resposta global, sobrevida global, sobrevida livre de doença e sobrevida livre de progressão em pacientes com LDGCB *de novo*.

Avaliar a presença da t(14;18) e seu impacto prognóstico em pacientes com LDGCB *de novo*.

REVISÃO DA LITERATURA

3 – Revisão da Literatura

3.1- Definição do linfoma difuso de grandes células B

O linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) é o subtipo mais comum de linfoma no Ocidente (Shih e Liang, 1991), caracterizado por proliferação difusa de grandes células linfóides de linhagem B, com núcleo maior ou igual ao de um macrófago ou duas vezes maior que o linfócito normal (WHO, 2008).

É uma doença clínica e biologicamente heterogênea, apresentando diferentes subtipos histológicos, e considerada agressiva devido à curta sobrevida na ausência de tratamento adequado (Hallack Neto et al., 2006).

3.2- Epidemiologia

O LDGCB representa 80% dos linfomas agressivos (Shahi e Manga, 2006), 30% a 40% dos LNH no ocidente e um dos mais frequentes em países em desenvolvimento (WHO, 2008).

Segundo dados do INCA, a incidência de LNH em 2014 para o estado de São Paulo foi de 6,73 casos/100 mil homens e 7,42 casos/100 mil mulheres. Já em relação aos dados de mortalidade, até 2012, os linfomas corresponderam à 12ª causa de morte em mulheres e à 13ª causa em homens (INCA, 2014).

Na casuística do serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) e do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), o LDGCB representa 49,45% dos casos de LNH (Gouveia et al., 2011a).

Nos Estados Unidos, o LDGCB é o 6º tipo de câncer em prevalência e o 7º em número de óbitos (National Cancer Institute, 2012).

É o tipo de linfoma mais frequente na idade adulta (31%), seguido do linfoma folicular (Gonçalves, 1999; Shahi e Manga, 2006).

A idade mediana da população afetada é de 70 anos, mas pode ocorrer em qualquer faixa etária, incluindo crianças, com leve predomínio no sexo masculino (55%). (Gonçalves, 1999; WHO, 2008).

De acordo com Friedberg (2006), a incidência do LDGCB tem aumentado desde 1973 até meados de 1990 em cerca de 3 a 4% ao ano em indivíduos de ambos os sexos, brancos e não brancos e em todos os grupos de idade, com exceção dos muitos jovens. Fatores como técnicas de diagnóstico mais sensíveis, modificações na classificação das doenças linfoproliferativas e, em particular, o aumento da ocorrência de HIV associado ao LDGCB têm contribuído para os estudos de incidência da doença. Porém, o autor destaca que estes fatores influenciam em apenas 50% de casos adicionais de LNH, uma vez que a incidência de LNH em pacientes HIV negativo tem continuado a aumentar, principalmente entre mulheres, homens idosos e negros.

3.3- Etiologia

Segundo Shahi e Manga (2006), a etiologia do LDGCB é ainda desconhecida, mas sabe-se que a imunodepressão é um fator de risco e que as células neoplásicas podem expressar o vírus Epstein-Barr.

O LDGCB pode ser primário (*de novo*) ou secundário, quando surge da transformação de outras patologias, incluindo leucemia linfocítica crônica, linfoma folicular, linfoma de zona marginal (MALT), linfoma de zona marginal

esplênico e linfoma de Hodgkin de predomínio nodular linfocítico ou, ainda, da conversão de um linfoma T angioimunoblástico (Shahi e Manga, 2006). Os linfomas secundários, geralmente, têm pior prognóstico (Gonçalves, 1999).

3.4- Patogênese

O LDGCB surge a partir de linfócitos em diferentes estágios de diferenciação das células B. Diversas mutações podem alterar as assinaturas de expressão gênica das células B normais, desencadeando o mecanismo de transformação linfomatosa (Figura 1) (Lossos, 2005).

Figura 1 – Esquema de diferenciação e maturação dos linfócitos B normais e possíveis alterações moleculares que podem levar à patogênese do LDGCB.
 FONTE: Gouveia et al., 2012.

Durante a ontogenia dos linfócitos, as células pré-B ocupam os folículos linfóides primários e zonas do manto folicular. Após a transformação blástica, estas células proliferam e sofrem maturação, originando os plasmócitos, que secretam as imunoglobulinas IgG e IgA e células B de memória. Quando os

blastos migram para o centro de um folículo primário ficam entre as células dendríticas foliculares formando o centro germinativo e passam a ser chamadas de centroblastos (Guilherme et al., 2008).

O centro germinativo é a provável fonte de grande parte dos linfomas. Nesta região, podem ocorrer duas modificações a partir da ativação da enzima citidina deaminase: as mutações somáticas, que envolvem mutação na região dos genes das imunoglobulinas e processo de recombinação ou mudança de classe das imunoglobulinas (IgM para IgG, IgA ou IgE) (Lenz e Staudt, 2010).

Os centroblastos maturam em centrócitos. Se estas células expressam imunoglobulina de superfície apresentarão modificações na combinação com os antígenos devido às mutações somáticas, citadas anteriormente. Se houver redução de afinidade pelo antígeno, os centrócitos morrem por apoptose. Porém, em caso de aumento de afinidade, tornam-se capazes de se ligar ao antígeno, ativando a re-expressão de *BCL2* e resistência à apoptose. Neste caso, os centrócitos inibem a expressão de *BCL6* e se diferenciam em células de memória (Guilherme et al., 2008).

Várias modificações moleculares, além de fatores ambientais, podem estar envolvidas neste processo. A seguir, são descritos alguns destes principais fatores relacionados à patogênese do LDGCB.

3.4.1- Eventos Moleculares

A transformação de uma célula normal em neoplásica envolve uma série de acometimentos genéticos e moleculares, que interferem tanto no processo de proliferação quanto de diferenciação celular (Klumb, 2001).

Segundo Klumb (2001) e Junqueira e Carneiro (2005), dois grupos principais de genes participam da formação de tumores. São eles:

- Proto-oncogenes ou oncogenes: estimulam o crescimento celular e limitam a diferenciação das células. Quando atuam nos momentos certos e de modo controlado, estes genes são chamados de proto-oncogenes e quando estão alterados e entram em atividade codificando suas proteínas nas ocasiões em que não são necessárias ou quando formam proteínas modificadas e originam tumores, passam a ser chamados de oncogenes. No câncer, em geral, são ativados por translocações, mutações somáticas ou por amplificação, levando à expressão aberrante de sua proteína;
- Genes supressores de tumor: promovem a diferenciação celular e limitam a proliferação. Em processos neoplásicos, há perda de função destes genes, que frequentemente são alterados por mutações ou deleções.

Semelhante ao que ocorre em outros tipos de câncer, a patogênese do LDGCB trata-se de um processo multifatorial, com o acúmulo de múltiplas lesões moleculares e genéticas, levando à seleção de um clone maligno. Esse processo é complexo e inclui diferenças na derivação do LDGCB, distintas translocações cromossômicas, mecanismos de hipermutação somática aberrante, bem como aberrações comuns de outras malignidades com amplificação de genes, deleções e mutações (Figura 2). (Lossos, 2005).

A hipermutação somática é um mecanismo de lesão genética recentemente identificado, que envolve principalmente a mutação de múltiplos genes não Igs. Estas mutações são tipicamente distribuídas a 2kb do sítio de início da transcrição e, dependendo da configuração genômica do gene alvo,

pode afetar regiões não traduzidas bem como regiões codificadoras (Novak et al., 2011).

Figura 2 – Principais lesões genéticas presentes na patogênese do LDGCB e suas respectivas frequências.
FONTE: Gouveia et al., 2012.

Durante a ontogenia dos linfócitos na medula óssea, podem ocorrer eventos de recombinação gênica que levam à formação de clones de células B e T. Um tipo de recombinação que ocorre com frequência, é a justaposição de um gene que codifica os receptores das Imunoglobulinas (Igs) com um gene que controla a proliferação e a diferenciação celular, a partir de duas enzimas codificadas pelos genes *RAG1* e *RAG2*, podendo ocasionar quebras na dupla fita do DNA. Caso estes erros não sejam corrigidos, podem dar origem à

translocações cromossômicas relacionadas ao aparecimento destas transformações malignas (Klumb, 2001; Lenz e Staudt, 2010).

No LDGCB, a principal translocação é a t(14;18), que determina uma translocação balanceada entre o proto-oncogene *BCL2* do cromossomo 18 e o sítio ativo de transcrição do gene da cadeia pesada de Ig do cromossomo 14, resultando na superprodução de RNA mensageiro e em hiperexpressão da proteína anti-apoptótica BCL-2 (Akagi et al., 1994; Kotliar e Koziner, 1995 e Meier et al., 2001).

3.4.2- Fatores Ambientais

Alguns fatores ambientais, hereditários, ocupacionais e dietéticos podem ter importante papel no desenvolvimento dos LNH (Araújo et al., 2008). Sabe-se que estes linfomas estão associados com doenças inflamatórias crônicas, como Síndrome Sjögren, doença celíaca e artrite reumatóide (Colleoni e Inaoka, 2007).

Alguns agentes infecciosos, incluindo o HIV, HCV e *H. pylori* também estão relacionados à patogênese por prejudicar o sistema imune e/ou promover a estimulação de alguns antígenos de forma crônica (Novak et al., 2011).

Além disso, há maior incidência de casos da doença em indivíduos que manipulam solventes orgânicos, organofosforados, benzeno e tetracloreto de carbono (Colleoni e Inaoka, 2007).

Outros fatores como radiação ultravioleta, pesticidas, tintura de cabelo e dieta aumentam potencialmente o risco. A imunodepressão também é um fator de risco, sobretudo para os pacientes HIV positivos (Friedberg, 2006).

3.5- Locais de comprometimento

Os pacientes podem apresentar diferentes locais de comprometimento, com doença linfonodal ou extralinfonodal. Cerca de 40% dos casos tem origem extralinfonodal (Harris et al., 1994), mais frequentemente no trato gastrointestinal (estômago e região ileocecal). Entretanto, pode originar-se em qualquer outra localização extralinfonodal, incluindo pele, sistema nervoso central (SNC), medula óssea (MO), testículos, glândulas salivares, trato genital feminino, pulmões, rins e fígado (Pettit et al., 1990; Van Baarlen et al., 1998).

O envolvimento da medula óssea ocorre em 11 a 27% dos casos, sendo que cerca de um terço destes pacientes apresentam células malignas também no sangue periférico (WHO, 2008).

3.6- Classificação

De acordo com a WHO (2008), os LDGCB são histologicamente distintos e podem ser subdivididos em variantes morfológicas. São elas:

- *Centroblástica*: constituída por células linfóides de médio a grande tamanho, núcleo vesicular, cromatina fina e citoplasma geralmente escasso. Em alguns casos, podem apresentar células multilobuladas e mais de 90% de centroblastos com características polimórficas. Shahi e Manga (2006) acrescentam que podem ser observados, ainda, um a três nucléolos basófilos proeminentes;
- *Imunoblástica*: constituída por mais de 90% de imunoblastos, caracterizados por núcleo único e central, citoplasma basofílico em quantidade variável e menos de 10% de centroblastos. Características clínicas ou imunofenótípicas podem ser essenciais na diferenciação desta

variante de outra denominada plasmablástica. Shahi e Manga (2006) descrevem que esta variante morfológica representa cerca de 10% dos casos de LDGCB e é próprio de pacientes imunodeprimidos;

- *LDGCB rico em células T/histiócito*: a maioria das células tem fenótipo T e caráter reacional (não neoplásicas), com ou sem histiócitos, menos de 10% de grandes células B neoplásicas e raras células B pequenas. A análise imunofenotípica é essencial para diferenciação com o linfoma de Hodgkin (LH) clássico. Shahi e Manga (2006) afirmam que esta variante é rara e apresenta pior prognóstico;
- *Anaplásico*: caracterizado por células ovais ou poligonais com núcleo pleomórfico. Shahi e Manga (2006) acrescentam que esta variante apresenta expressão do antígeno CD30, mas alertam que o mesmo não deve ser confundido com o linfoma anaplásico de células grandes, que é um LNH de fenótipo T citotóxico que também expressa de CD30;
- *LDGCB primário do Sistema Nervoso Central (SNC)*: representa todos os linfomas intracerebral ou intraocular primário, o que corresponde a menos de 1% dos LNH e 2 a 3% de todos os tumores cerebrais. A idade média de aparecimento é de 60 anos, sendo mais comum em homens. Os sinais clínicos incluem déficit neurológico em 80% dos pacientes, sintomas neuropsiquiátricos em 20 a 30% dos casos e aumento da pressão intracraniana. Porém, a disseminação às áreas extralinfonodais é rara;
- *LDGCB cutâneo primário tipo da perna*: constitui 4% de todos os LDGCB cutâneos primários e 20% de todos os linfomas cutâneos primários de células B. Na maioria dos casos afeta as pernas, mas 10 a 15% surgem em outros sítios. Ocorre em pacientes idosos, sendo mais frequente em

mulheres e indivíduos na sétima década de vida;

- *LDGCB do idoso, EBV positivo:* é uma proliferação clonal de grandes células B EBV positivas. Ocorre em pacientes com mais de 50 anos, sem nenhuma imunodeficiência conhecida ou linfoma primário, sendo raro em indivíduos jovens. Casos de granulomatose linfomatóide, infecção por mononucleose, linfoma plasmablastico, linfoma de efusão primário ou LDGCB associado à inflamação crônica, que podem ser EBV positivo, são excluídos desta categoria. Cerca de 70% dos pacientes apresentam doença extralinfonodal (pele, pulmão, tonsila e estômago) com ou sem comprometimento simultâneo;
- *LDGCB associado com inflamação crônica:* é uma neoplasia linfóide associada à inflamação crônica e EBV, sendo o intervalo entre a associação da inflamação crônica com o linfoma de cerca de 10 anos. Os sítios de envolvimento mais comuns são cavidade pleural, fêmur e tecido periarticular. Cerca de 70% dos pacientes apresentam estágio clínico I ou II e o diagnóstico ocorre entre a quinta e oitava década de vida, sendo a mediana de idade entre 65 e 70 anos;
- *Linfoma de células B, não classificável, com características intermediárias entre LDGCB e linfoma de Burkitt:* são linfomas raros e agressivos, com características intermediárias entre LDGCB e linfoma de Burkitt, mas por suas características clínicas e biológicas não poderiam ser incluídos nestas duas categorias. Na maioria dos casos, as características morfológicas estão entre os dois tipos, com algumas células que são menores que as típicas para LDGCB e algumas maiores que as típicas para linfoma de Burkitt. O imunofenótipo é compatível com linfoma de Burkitt e mais da

metade dos pacientes apresenta doença extralinfonodal, com possível envolvimento da medula óssea e sangue periférico;

- *Linfoma de células B, não classificável, com características intermediárias entre LDGCB e linfoma de Hodgkin clássico:* são comuns em homens jovens (20 a 40 anos) e o sítio mais comum é massa mediastinal, com ou sem envolvimento de linfonodos. Pode acometer, ainda, fígado, pulmão, baço e medula óssea.

3.7- Diagnóstico

A avaliação clínica do paciente exige uma história abrangente, incluindo informações como idade, sexo, presença de sintomas B, história de doenças malignas, avaliação das comorbidades e estimativa de tamanho dos grupos nodais acessíveis, bem como do baço e do fígado. Porém, como a sensibilidade do exame físico é variável entre os observadores, as medições devem ser formalmente realizadas por exames de imagem por tomografia computadorizada ou tomografia com emissão de pósitron com 18-fluorodeoxiglicose (Cheson et al., 2014).

Diversas técnicas podem ser utilizadas no diagnóstico dos LDGCB. A união delas é importante, pois cada uma oferece vantagens específicas e se complementam, fornecendo sensibilidade, acurácia e precisão, que não poderiam ser obtidas apenas pela análise da morfologia (Stetler-Stevenson e Braylan, 2001).

3.7.1- *Biópsia para anatomia patológica*

A biópsia consiste na retirada de um fragmento da lesão para análise histopatológica, onde se observa o grau de diferenciação celular (Chiattonne, 2002; Colleoni e Inaoka, 2007). Porém, como apenas a morfologia não é suficiente para um diagnóstico preciso, o exame de anatomia patológica é utilizado como referência servindo de base para escolha de quais exames complementares são necessários para definição final do diagnóstico (Guilherme et al., 2008).

Além de biópsia da lesão e aspirado de medula óssea, alguns exames laboratoriais como hemograma completo, exames bioquímicos de rotina (incluindo DHL e ácido úrico) e testes de triagem para o HIV, HCV e HBV são obrigatórios. A eletroforese de proteínas também é recomendada (Tilly e Dreyling, 2010).

3.7.2- *Imunohistoquímica*

A técnica de Imunohistoquímica (IHQ) tem como objetivo auxiliar no diagnóstico patológico, podendo ser indicada para identificar diferentes subtipos de uma determinada patologia, tentar classificar neoplasias indiferenciadas, identificar possíveis sítios primários desconhecidos em metástases, avaliação prognóstica de patologias e identificação de agentes infecciosos. Porém, devido às múltiplas variáveis envolvidas (incluindo diferentes clones de anticorpos, sistemas de amplificação, métodos de recuperação antigênica e definições de positividade e intensidade), deve ser utilizada com prudência e sempre dentro de um contexto complexo de informações (Barrans et al., 2003).

As principais proteínas analisadas por IHQ em amostras com suspeita de LDGCB incluem: CD20 (envolvido na ativação de células B), CD45, CD30 (positivo em LDCGB anaplásicos), CD10 (positivo em 25 a 50% dos casos), Ki-67 (marcador de proliferação celular, com positividade variando entre 40 e 90%), BCL-2 (relacionada à resistência à apoptose) e BCL-6 (funciona como repressor transcricional importante para a formação do centro germinativo), MUM1 (relacionada à proliferação, apoptose e diferenciação celular) e p53 (envolvida no controle do ciclo celular) (Carvalho, 2007).

3.7.3- Imunofenotipagem por citometria de fluxo

A citometria de fluxo (CF) tem grande importância no diagnóstico e caracterização das neoplasias hematológicas, apresentando diversas vantagens, como o fornecimento de resultados rápidos utilizando pequenos volumes de amostra; reprodutibilidade; objetividade; precisão estatística; capacidade de avaliar simultaneamente diversas características celulares (como tamanho, granulosidade, antígenos de superfície e intracelulares; análise de subpopulações de linfócitos), além de testes de viabilidade celular (incluindo células em apoptose) e conteúdo celular de DNA (Robins et al., 1994; Stetler-Stevenson e Braylan, 2001; Costa et al., 2005).

No passado, o diagnóstico de linfoma por aspiração de linfonodos com agulha fina (PAAF), foi visto com ceticismo e a biópsia cirúrgica era considerada padrão ouro para confirmação do diagnóstico (Robins et al., 1994). Porém, atualmente, a PAAF tem sido cada vez mais utilizada para investigação de neoplasias por CF, uma vez que além de permitir a obtenção de resultados mais rápidos, possibilita a identificação de pequenas populações neoplásicas

que não são detectadas na rotina citológica (Stetler-Stevenson e Braylan, 2001; Costa et al., 2005).

Os LDGCB expressam marcadores pan-B CD19, CD20, CD22 e CD79a, visualizando-se imunoglobulina citoplasmática ou de superfície em 50% a 75% dos casos. A maioria dos LDGCB anaplásicos expressa CD30, o qual pode ocorrer também em outras variantes (Piris et al., 1990).

Cerca de 10% dos LDGCB expressa o antígeno T CD5 e ciclina D1 e 25 a 50% expressam o antígeno CD10 (Matolcsy et al., 1995). Casos CD5+ têm sido associados com pior prognóstico, porém as anormalidades moleculares ou o papel exato deste antígeno ainda não foram totalmente esclarecidos (Wu e Keating, 2006).

A IRF4/MUM1 é expressa em 35 a 65% dos casos e uma alta expressão de FOXP1 é também descrita em LDGCB com fenótipo do centro germinativo (WHO, 2008).

O CD138 é identificado em apenas 2% dos casos de LDGCB, sendo mais frequentes em pacientes com HIV. Por enquanto, o seu fator prognóstico ainda não está totalmente estabelecido, sendo utilizado principalmente como marcador de LDGCB resultante da fase de desenvolvimento pós-CG (Wu e Keating, 2006).

3.7.4- Métodos de imagem

Os métodos de imagem são ferramentas importantes para avaliação dos pacientes com linfoma. A tomografia computadorizada (TC), a ressonância magnética (RM) e o ultrassom (US) são alguns dos exames utilizados para caracterização de alterações anatômicas decorrentes da doença. Porém, essa

avaliação anatômica nem sempre é conclusiva, como em casos em que há presença de massa residual em pacientes com boa resposta ao tratamento e infiltração de linfonodos de pequenas dimensões. Nestes casos, podem ser utilizados métodos de medicina nuclear, que permitem a caracterização funcional e metabólica dos tecidos, auxiliando no diagnóstico e, principalmente, no acompanhamento e otimização do tratamento dos pacientes (Sapienza et al., 2001).

Os principais métodos de medicina nuclear utilizados são a cintilografia com gálio-67, traçador com alta afinidade por transferrina e receptores de ferro e 2-F18-fluoro-2-deoxi-glicose (FDG), emissor de pósitron que permite a caracterização do metabolismo da glicose nos tecidos. Outros traçadores podem, ainda, ser utilizados, porém, em menor escala (Sapienza et al., 2001).

A tomografia por emissão de pósitrons (PET) mostra a situação metabólica e funcional das células, sendo útil na avaliação do estadiamento e no seguimento dos pacientes (Ansell e Armitage, 2005; Veloso e Clementino, 2007). Através de avaliação visual, a captação focal de FDG aumentada em locais nodais e extralinfonodais, que se distingue de captação fisiológica ou outros padrões de doença (incluindo infecção e inflamação) é observada (Barrington et al., 2014).

Em LDGCB, o PET tem sido utilizado para avaliar a resposta e possíveis massas residuais após a quimioterapia. Anormalidades persistentes durante e após a quimioterapia parecem ser importantes para prever recidiva, enquanto a PET normal ao final da quimioterapia se correlaciona com bom prognóstico (Ansell e Armitage, 2005; Veloso e Clementino, 2007).

Os avanços em imagem estão afetando a prática clínica nos linfomas. Atualmente, o PET combinado com a TC (PET-CT) tem substituído a utilização dos exames separadamente. Os grupos de imagem do mundo têm reunido esforços para padronização deste exame. Um grupo de trabalho de imagem desenvolveu um consenso durante a Conferência Internacional de Linfomas Malignos com as recomendações para uso do PET-CT tanto no estadiamento quanto na avaliação de resposta dos linfomas. Este trabalho foi apresentado em dois eventos: 4º Workshop Internacional de PET em Linfoma (Menton, França) e 12ª Conferência Internacional de Linfomas Malignos (Suíça). (Barrington et al., 2014).

Este consenso recomenda utilizar uma escala de 5 pontos para avaliação do PET-CT, onde: 1 ponto (sem captação) ou 2 pontos (captação no mediastino) representam RC ao tratamento, 3 pontos (captação superior ao mediastino e inferior ao fígado) representa resposta inadequada e 4 pontos (captação moderadamente superior ao fígado) ou 5 pontos (captação marcadamente superior ao fígado e/ou novas lesões) sugerem doença sensível à quimioterapia com RP e quando feita no final do tratamento, representa fracasso do mesmo (Cheson et al., 2014; Barrington et al., 2014).

A captação de FDG na medula óssea, ossos, fígado e baço é altamente sensível e pode evitar a necessidade de biópsia. Porém, devido à alta absorção de FDG que ocorre no cérebro, a ressonância magnética é o exame mais indicado para avaliar a suspeita de envolvimento do SNC (Barrington et al., 2014).

3.7.5- Detecção de monoclonalidade

A detecção de monoclonalidade é essencial para diagnóstico das neoplasias hematológicas. Um estudo comparando os métodos de PCR e CF para detecção de clonalidade em LNH de células B demonstrou que a CF foi mais eficiente que a PCR (98% x 68% dos casos, respectivamente). Em CF, a monoclonalidade pode ser detectada pela relação de expressão entre Kappa e Lambda. Porém, em amostras contendo populações monoclonais e policlonais, a análise simultânea de outros marcadores que são diferentemente expressos pelas células malignas e benignas pode facilitar a identificação dos linfomas (Stetler-Stevenson e Braylan, 2001).

3.7.6- Anormalidades citogenéticas

Estudos têm demonstrado que as anormalidades citogenéticas relacionadas ao LDGCB podem ajudar na identificação de genes responsáveis por etapas da gênese da doença, através de mecanismos que afetam a morte celular programada ou vias de proliferação celular (Wu e Keating, 2006).

As translocações cromossômicas são marcadores genéticos de malignidade que representam recombinação entre dois cromossomos específicos. Porém, os mecanismos moleculares precisos que são responsáveis pela formação destas alterações continuam parcialmente obscuros (Novak et al., 2011).

As translocações mais frequentes são a t(14;18) (q32;q21), relacionada ao gene *BCL2* e a t(3;14), relacionada ao gene *BCL6* (Wu e Keating, 2006).

Ganhos cromossômicos como o 8q32-34 e 2p estão relacionados com a regulação de MYC, uma proteína cuja função está associada à proliferação celular (Wu e Keating, 2006).

Já a perda de 17p está relacionada com uma deleção no gene supressor de tumor, que codifica a proteína p53, essencial para o controle do ciclo celular (Wu e Keating, 2006).

3.8- Fatores de Prognóstico

De acordo com Azambuja (2007), fatores de prognóstico são aqueles que predizem o risco de recidiva ou morte devido à doença, independentemente do tratamento empregado. Já os fatores preditivos são aqueles que distinguem entre os pacientes quais responderão a determinado tipo de tratamento.

A possibilidade de predizer ao diagnóstico quais pacientes responderão melhor à terapia padrão, fornece informações importantes para estratificar os pacientes de acordo com o risco, além de orientar as pesquisas que buscam encontrar o melhor método de tratamento para diferentes subgrupos da doença (Wu e Keating, 2006).

3.8.1- Fatores clínicos

Segundo Gonçalves (1999), Mota (2006) e Marcelino (2009) várias características clínicas podem influenciar no prognóstico de pacientes com LDGCB, conforme descrito a seguir:

A. Número de sítios extralinfonodais: a presença de envolvimento extranodal, representado pela letra “E”, não é relevante para pacientes com estágio avançado. Dentre os sítios extralinfonodais mais frequentes destacam-se estômago, pele, cavidade oral, intestino delgado, medula óssea, tireóide e SNC. De acordo com a revisão proposta pelas comissões de trabalho na 11ª Conferência Internacional em Linfoma Maligno em Lugano e na 12ª Conferência Internacional em Linfomas Malignos e publicada por Cheson et al. (2014), as seguintes informações devem ser levadas em consideração:

- Envolvimento do baço: é melhor determinado pelo PET-CT. Porém, como não há consenso em relação ao número de medições volumétricas necessárias e como o tamanho do baço pode ser influenciado por diversos fatores, como raça, peso e volume de sangue, recomenda-se a utilização de um ponto de corte de 13 cm no comprimento vertical para determinar esplenomegalia;
- Envolvimento do fígado: devido à variabilidade entre os indivíduos e do impacto de numerosas condições médicas, o tamanho do fígado não é uma medida muito confiável para determinar envolvimento hepático no linfoma. Como recomendado para o baço, captação focal ou difusa aumentada, com ou sem nódulos disseminados, apoia envolvimento focal;
- Envolvimento da medula óssea: exame de PET-CT indicando envolvimento de osso ou medula óssea é geralmente suficiente para designar a doença em estágio avançado e, nestes casos, a biópsia de medula óssea não é necessária. Pacientes com biópsia de medula

óssea positiva, geralmente têm outros fatores consistentes com estágio avançado ou mau prognóstico;

- B. Presença de sintomas B:** febre, sudorese noturna e perda de mais de 10% do peso corporal em apenas 6 meses. De acordo com a revisão proposta pelas comissões de trabalho na 11ª Conferência Internacional em Linfoma Maligno em Lugano e na 12ª Conferência Internacional em Linfomas Malignos e publicadas por Cheson et al. (2014), sintomas B não são mais considerados como relevantes a não ser para pacientes com LH;
- C. Presença de *bulky*:** corresponde à massa tumoral superior a 10 cm. A presença de *bulky* era representada pela letra “x” junto ao estadiamento do paciente. Porém, após a revisão proposta pelas comissões de trabalho na 11ª Conferência Internacional em Linfoma Maligno em Lugano e na 12ª Conferência Internacional em Linfomas Malignos e publicadas por Cheson et al. (2014), o termo “x” deixa de ser necessário;
- D. Estadiamento:** define a localização e extensão da doença. O estágio clínico é definido pelo Sistema Ann Arbor, que divide os pacientes em quatro grupos de acordo com a distribuição anatômica da doença e a presença ou ausência de sintomas B, conforme descrito na tabela 1 e figura 3;

Tabela 1 – Sistema de estadiamento Ann Arbor

Estádio	Extensão da doença
I	Comprometimento de uma única cadeia linfonodal ou um único sítio extralinfonodal.
II	Comprometimento de duas ou mais cadeias linfonodais do mesmo lado do diafragma ou envolvimento localizado de sítio extralinfonodal e de uma ou mais cadeias linfonodais do mesmo lado do diafragma.
III	Comprometimento de cadeias linfonodais dos dois lados do diafragma, o qual ainda pode ser acompanhado de comprometimento extralinfonodal localizado e/ou baço.
IV	Comprometimento difuso ou disseminado de um ou mais sítios extralinfonodais (como fígado, pulmão, medula óssea e sistema nervoso central) com ou sem linfonodomegalia associada.

FONTE: Marcelino, 2009, adaptado pela autora.

Figura 3- Estadiamento de Ann Arbor

FONTE: Hofferond e Moss, 2013.

E. Performance Status: seu objetivo é medir a qualidade de vida dos pacientes. Aqueles que se mostram completamente ativos e apresentam sintomas discretos respondem melhor ao tratamento e sobrevivem mais tempo do que aqueles que são menos ativos ou gravemente sintomáticos. Os dois instrumentos ou escalas mais utilizados são o Índice de Karnofsky e a escala de desempenho ECOG (Eastern Cooperative Oncologic Group), sendo esta última utilizada no presente estudo. O ECOG estabelece

escores de 0 a 5. O escore 0 indica que o paciente é completamente ativo e capaz de realizar atividades normais e 5 é atribuído ao paciente morto, conforme descrito na tabela a seguir (Tabela 2).

Tabela 2 – *Performance status*: escala de desempenho ECOG para LDGCB

Valor	Descrição
0	Atividade plena, apto a realizar as mesmas atividades desenvolvidas antes da doença.
1	Atividades físicas extenuantes restringidas, mas capaz de desenvolver atividades leves ou de natureza sedentária (ex. serviços domésticos leves, serviço de escritório).
2	Capaz de autocuidado, mas incapaz de desenvolver outras atividades. Fora da cama em mais de 50% do tempo em que está acordado.
3	Limitações para o autocuidado. Confinado à cama ou cadeira por mais de 50% do tempo em que está acordado.
4	Totalmente incapacitado. Incapaz de autocuidado. Totalmente confinado à cama ou cadeira.
5	Morte.

FONTE: Marcelino, 2009.

F. Índice de Prognóstico Internacional (IPI): conforme definido no estudo do Projeto TIN-HSLPF (1993), seu objetivo é prever o desfecho clínico dos pacientes a partir da avaliação das seguintes características: potencial de crescimento e invasão do tumor (estádio tumoral, nível sérico de DHL e número de sítios extralinfonodais da doença), equilíbrio entre paciente e tumor (*performance status*) e tolerância do paciente ao tratamento (idade, *performance status*), conforme descrito na tabela 3.

Tabela 3 – Índice de Prognóstico Internacional (IPI) para os LDGCB

PARÂMETROS
Idade $\geq$ 60 anos
Estádio avançado (III ou IV)
Envolvimento extralinfonodal $>$ 1 sítio
<i>Performance status</i> $\geq$ 2
Níveis de DHL acima do normal
ESTRATIFICAÇÃO DOS GRUPOS DE RISCO (De acordo com o nº total de fatores acima listados)
0-1: Baixo risco
2: Risco intermediário-baixo
3: Risco intermediário-alto
4-5: Alto risco

FONTE: Mota, 2006.

G. Níveis de Desidrogenase Láctica (DHL): o nível sérico desta enzima se correlaciona com a massa tumoral e é útil como indicador prognóstico para progressão da doença. Altos níveis de DHL persistentes ou recorrentes depois do tratamento normalmente indicam que a doença ainda está presente ou que houve recidiva.

3.8.2- Fatores biológicos

Embora alguns fatores clínicos como o IPI sejam úteis para predizer o prognóstico de pacientes com LDGCB, alguns estudos demonstraram que pacientes com IPI idênticos exibem variabilidade acentuada na sobrevida, sugerindo a presença de marcadores moleculares individuais (Lossos e Morgensztern, 2006).

Achados moleculares, como alterações nos níveis de expressão gênica, têm sido importantes para a descoberta de novos subtipos biológicos de LDGCB e na identificação de genes e vias que podem apresentar importante papel na patogênese da doença e gerar novos sistemas de classificação baseados em características biológicas (Wu e Keating, 2006).

Em 2000, Alizadeh et al. utilizando a técnica de microarray, identificaram dois subgrupos de LDGCB com expressão de genes envolvidos em diferentes estágios de diferenciação e proliferação celular. Um dos subgrupos (denominado GCB) expressou genes característicos de células do CG (*BCL6*, *CD10*, *CD38*, *BCL7A* e *LMO2*) enquanto o outro (denominado ABC) expressou genes de células B ativadas (*MUM1/IRF4*) e de resistência à apoptose (*FLIP*, *BCL2*). Os pacientes com o subtipo GCB apresentaram melhor sobrevida global quando comparados aos do subtipo ABC (76% x 16%, respectivamente).

Em 2002, Rosenwald et al., partindo da hipótese de que a sobrevida após a quimioterapia é influenciada por biomarcadores tumorais, utilizaram o perfil de expressão gênica de pacientes com LDGCB para desenvolver um modelo de prognóstico molecular de sobrevida. Os autores encontraram, além dos dois subgrupos descritos por Alizadeh et al., um terceiro subgrupo sem predomínio particular de expressão gênica. Os pacientes com o subtipo GCB apresentaram sobrevida global de 60% contra 35% para o subtipo ABC e 39% para o subgrupo sem predomínio particular de expressão.

Assim, estes e diversos outros estudos moleculares demonstram que o LDGCB pode ser dividido em três subtipos: o GCB (Germinal Center B-cell-like), que expressa genes típicos de células do centro germinativo; o ABC (Activated B-cell-like), que expressa genes típicos de células B ativadas e o subgrupo tipo 3 ou PMBCL (Primary Mediastinal DLBCL), que apresenta um perfil de expressão heterogêneo, que poderia incluir mais de um subtipo (Shivakumar e Armitage, 2006).

Em 2004, Lossos et al., utilizando a técnica de PCR em Tempo Real, avaliaram em amostras congeladas de biópsias de pacientes com LDGCB, a

expressão de 36 genes, correlacionados com prognóstico em estudos prévios. A partir dos resultados encontrados, os autores elaboraram um modelo matemático baseado na expressão de 6 genes (*LMO2*, *BCL6*, *FN1*, *CCND2*, *SCYA3* e *BCL2*) para prever, independente do IPI, o prognóstico de pacientes com LDGCB tratados com CHOP. Destes seis genes selecionados para o modelo, *LMO2*, *BCL6* e *FN1* foram associados à melhor prognóstico e *BCL2*, *CCND2* e *SCYA3* à pior prognóstico. Os autores criaram um escore denominado de EPM (escore preditivo de mortalidade), que estratificou os pacientes de acordo com o risco de mortalidade em três subgrupos: baixo (EPM <0,0063), médio (EPM = 0,063 e < que 0,093) e alto (EPM >0,093). A SG em 5 anos para estes subgrupos foi de 65%, 49% e 15%, respectivamente, sendo o EPM capaz de separar pacientes que não se beneficiariam da quimioterapia (CHOP).

O estudo de Lossos et al. (2004) foi posteriormente validado por Malumbres et al. (2008) para pacientes com LDGCB tratados com R-CHOP e utilizando amostras de RNA provenientes de tecidos fixados em formalina e emblocados em parafina (FFEP). Os autores calcularam o EPM dos pacientes, subdividindo-os em dois grupos: baixo risco (abaixo da mediana) e alto risco (acima da mediana). Os resultados demonstraram que a SG e a SLP foram estatisticamente significante ($p=0,002$ e $p=0,038$, respectivamente), sugerindo que o valor prognóstico do painel proposto por Lossos et al. continua a ser significativo para pacientes tratados com R-CHOP. Porém, o gene *SCYA3*, relacionado à pior prognóstico no estudo de Lossos et al., passou a apresentar uma tendência à maior SG com adição do Rituximabe à quimioterapia. Além disso, o gene *FN1* também perdeu o significado relacionado anteriormente à

melhor prognóstico. Com isso, a necessidade de recalcular o EPM para os pacientes tratados com R-CHOP passou a ser discutida.

Em 2013, um estudo do nosso grupo (Xavier, 2013) verificou a validade do painel proposto por Lossos et al. em amostras FFEP de pacientes com LDGCB. Os resultados demonstraram que, na nossa população, o valor preditivo deste modelo para RC, SG e SLP não foi confirmado. O grupo propôs um novo escore de prognóstico molecular baseado nos valores de expressão absoluta dos genes *LMO2* e *CCND2*, com um impacto significativo na SG e SLP para o subgrupo de pacientes com IPI de risco intermediário-alto e alto. Porém, não foi possível validar este score para pacientes com IPI de baixo risco.

3.8.2.1- Gene *BCL2*

O gene *BCL2*, localizado no cromossomo 18, codifica a BCL-2 humana, uma proteína de 25KDa com 239 aminoácidos, localizada primariamente na membrana da mitocôndria, do núcleo e no citoplasma (El-Hameed, 2005).

Acredita-se que, quando expressa em altos níveis, a proteína BCL-2 pode ter um importante papel na gênese do Linfoma, uma vez que traz uma série de vantagens para a sobrevivência de células malignas B, por meio de prevenção da morte celular programada, desenvolvendo um importante papel na resistência à quimioterapia (El-Hameed, 2005; Iqbal et al., 2006).

O protooncogene *BCL2* foi originalmente descoberto a partir da translocação t(14;18), um rearranjo de DNA que ocorre na fase pré-B de desenvolvimento (Akagi et al., 1994). A t(14;18) (q32;q21) determina uma translocação balanceada entre o protooncogene *BCL2* do cromossomo 18 e o

sítio ativo de transcrição do gene da cadeia pesada de Ig do cromossomo 14, resultando na superprodução de RNA mensageiro e em hiperexpressão da proteína anti-apoptótica BCL-2 (Akagi et al., 1994; Kotliar e Koziner, 1995; Meier et al., 2001).

Esta translocação ocorre em 70% a 85% dos linfomas foliculares (LF) e 20% a 30% dos LDGCB (Kotliar e Koziner, 1995; Meier et al., 2001; Guilherme et al., 2008).

Os pontos de quebra no 14q32 ocorrem na região de ligação (JH) do *IgH* em quase todos os casos. Já no 18q21, os pontos de quebra ocorrem em um segmento de 150pb localizado na parte codificante do *BCL2* (conhecido como MBR) em 50 a 65% dos casos, em um segmento de 500pb na região menor do *cluster* de 20 a 30kb do MBR (conhecido como mcr) em 10% dos casos ou, ainda, em pontos adicionais entre a MBR e a mcr nos demais casos (Gu et al., 2006).

Porém, a expressão de *BCL2* não é exclusivamente correlacionada com a hiperexpressão ocasionada pela presença da translocação t(14;18), sendo também encontrada em células normais, no subtipo ABC e outras malignidades que carecem desta alteração (Kramer et al., 1996, Iqbal et al., 2006).

Um dos mecanismos alternativos não associados à t(14;18) que regula a expressão de *BCL2* é o fator nuclear kappa B (NF-κB). O gene *BCL2* é um gene alvo para o NF-κB e em muitos pacientes com o subtipo ABC do LDGCB, que carecem da t(14;18), a regulação da expressão deste gene pode ser mediada por esta via. Outro mecanismo possível é a amplificação do locus cromossômico 18q21, no qual o *BCL2* reside. Estudos com hibridação genômica mostram que aproximadamente 20% dos pacientes com LDGCB

apresentam ganhos em 18q e que esta amplificação é mais comum em pacientes com subtipo ABC em comparação com o subtipo GCB, o que indica que a regulação de *BCL2* é diferente de acordo com o subtipo da doença (Davis et al., 2001; Iqbal et al., 2006).

Os resultados de diversos estudos que relatam a expressão de *BCL2* como indicador prognóstico em pacientes com LDGCB são contraditórios, porém, geralmente a hiperexpressão é associada à pior prognóstico (El-Hameed, 2005; Iqbal et al., 2006; Wu e Keating, 2006).

No estudo de Kramer et al. (1996), 42% dos pacientes com LDGCB apresentaram BCL-2 negativa, 13% BCL-2 positiva e 45% alta expressão de BCL-2. Não foram observadas diferenças significativas na RC e SG. Porém, a SLD foi significativamente menor nos casos com hiperexpressão (74% para linfomas BCL2 +/- contra 41% de BCL2++). Os autores acrescentaram, que estes resultados corroboram com o estudo do Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA).

El-Hameed (2005) analisou a frequência e utilidade clínica do rearranjo do gene *BCL2* e expressão da proteína BCL-2 em pacientes egípcios com LDGCB nodal *de novo*. Os resultados mostraram diferenças estatisticamente significantes para RC e SLD, sendo que os pacientes com a t(14;18) foram os que apresentaram pior prognóstico.

Amen et al. (2007) estratificaram pacientes com o subtipo CG de LDGCB em dois subgrupos, considerando como prognóstico favorável o subgrupo que apresentou BCL-2 e Ciclina D2 negativas e como desfavorável o subgrupo que apresentou expressão positiva para estas duas proteínas. A ausência da

expressão de BCL-2 e Ciclina D2 mostraram melhor SG (58,6% $\times$ 13,7%) e SLP (49,5% $\times$ 7,3%).

Em seu estudo de expressão gênica por PCR em tempo real, Malumbres et al. (2008) também descreveram que a expressão de *BCL2* está relacionada à pior SG e SLP.

Em 2006, Iqbal et al. avaliaram a expressão gênica por microarray e expressão proteica por imunohistoquímica em 240 pacientes com LDGCB tratados com CHOP. Não foram encontradas diferenças na sobrevida dos pacientes em relação à expressão de BCL-2 quando estes foram avaliados como um único grupo. Porém, quando os pacientes foram subdivididos em CG e ABC, o grupo ABC com expressão de BCL-2 positiva mostrou pior SG e SLP, que também foram observadas nas análises de expressão gênica.

Em 2011, Iqbal et al. fizeram um novo estudo para avaliar a expressão do mesmo gene e proteína em pacientes com LDGCB tratados com R-CHOP. Ao contrário do que foi relatado anteriormente, a expressão da proteína BCL-2 foi relacionada à pior SG e SLP em pacientes do subtipo GCB. Para análise de expressão gênica o mesmo prognóstico foi observado apenas para SLP. Com isso, os autores sugerem que o uso do Rituximabe trouxe melhorias para o subgrupo ABC e para pacientes do subgrupo GCB com expressão de BCL-2 negativa em relação aos pacientes GCB positivos e que, talvez, estes possam ser beneficiados com novos agentes que possam inibir a expressão de *BCL2*.

Visco et al. (2013) também encontraram pior prognóstico para pacientes do subgrupo GCB com BCL-2 positivo e tratados com R-CHOP. Porém, neste caso, os autores demonstraram através de uma análise estatística multivariada que esta expressão era dependente da presença da t(14;18).

Estudos recentes sugerem que o rearranjo do oncogene *MYC* ocorre em aproximadamente 10% dos pacientes com LDGCB e que, quando este é concomitante ao rearranjo de *BCL2* (condição referida como *double-hit*), confere pior prognóstico e piores resultados no tratamento (Niitsu et al., 2009; Johnson et al., 2012; Li et al., 2012; Pedersen et al., 2012; Bellas et al. 2014; Friedberg, 2015).

Johnson et al. (2012) encontraram a expressão de BCL-2 em 29% dos casos de LDGCB tratados com R-CHOP. Porém, os autores descreveram que a expressão da proteína foi associada ao subtipo ABC enquanto a presença da t(14;18), analisada por FISH, foi associada ao subtipo GCB. Além disso, os autores verificaram que houve um aumento tanto da expressão de BCL-2 quanto da presença de translocação t(14;18) relacionado à idade e que o impacto na SG e SLP foi pior quando a expressão de BCL-2 ocorreu junto com a expressão da proteína MYC.

Já os dados de Bellas et al. (2014) corroboram os achados de Visco et al. 2013, indicando que a expressão da proteína BCL-2 foi associada ao subtipo GCB e confirmam o descrito por Johnson et al. (2012) em relação ao fato de que a co-expressão de BCL-2 e MYC está associada à pior sobrevida.

Embora a literatura demonstre resultados significativamente piores para os pacientes que apresentam *double-hit*, ainda não existem estudos randomizados orientadores para o tratamento diferenciado destes pacientes. Novos estudos para verificar o papel de novos esquemas de quimioterapias para estes casos são necessários (Friedberg, 2015).

3.8.2.2- Gene *MDR1* e resistência a múltiplas drogas

A resistência a múltiplas drogas (MDR) representa um dos principais obstáculos à terapia do câncer, no qual as células tumorais apresentam resistência simultânea a diferentes classes de quimioterápicos estruturalmente e funcionalmente não relacionados (Wagner-Souza et al., 2003).

Vários fatores celulares contribuem para esta resistência: efluxo de drogas através da membrana celular ou entre citoplasma e núcleo; modificações na ativação ou inativação de drogas com as células do tumor; modificações nas enzimas, com alterações em seus níveis ou na afinidade pela droga; modificações no processo de reparo de DNA e modificações na habilidade do tumor em executar a morte celular programada (Liu et al., 2001).

O fenômeno de resistência por efluxo de drogas tem sido extensivamente estudado nos últimos anos, sendo descritos três processos distintos: a MDR clássica (pela expressão do gene *MDR1*), a MDR não P-glicoproteína e a MDR atípica (Liu et al., 2001). O processo que está melhor caracterizado é a via do gene de resistência a múltiplas drogas *MDR1*, o qual codifica a P-glicoproteína (P-gp). Esta proteína funciona como eficiente bomba de efluxo que transporta determinadas drogas para o exterior da célula, reduzindo suas concentrações intracelulares a níveis sub-letais (Wagner-Souza et al., 2003; Rezende et al., 2005).

Juliano e Ling foram os primeiros a isolar a P-gp em células resistentes de ovário de hamster, em 1976. Esta glicoproteína tem peso molecular de 170 KDa e dois sítios de ligação de ATP. Pertencente à família das proteínas transportadoras ABC possui múltiplas isoformas codificadas pela família do gene *MDR*, composta pelos genes *MDR1*, *MDR2* e *MDR3*. A responsável pela

resistência à droga em humanos é codificada pelo gene *MDR1*, localizado no braço longo do cromossomo 7 (7q21.1) (Rezende et al., 2005; Swerts et al., 2006).

A P-gp é expressa em vários tecidos humanos normais como córtex da adrenal, superfície canalicular de hepatócito, superfície apical da célula do túbulo contorcido primário do rim, mucosa do intestino delgado e grosso, glândula sebácea, endométrio do útero gravídico, trofoblasto placentário, ducto pancreático e célula epitelial de capilares do testículo e cérebro (Rezende et al., 2005). Yuen e Branimir (1994) descreveram que tecidos normais como intestino, colo, trato biliar, cérebro, rim e pâncreas expressam altos níveis de P-gp, o que sugere funções fisiológicas para este transportador e um papel de distribuição e excreção de drogas.

O mecanismo de MDR (*MDR1*) pode ser revertido por substâncias inibidoras de efluxo de droga, como Verapamil (VP), Trifluoperazina (TFP) e Clotrimazol (CSA), que atuam como bloqueadores de canal de cálcio, aumentando a concentração intracelular da droga e, conseqüentemente, o efeito citotóxico. Porém, o principal fator limitante para o uso destas substâncias é a necessidade de alta dosagem, que pode atingir o limite de toxicidade máxima, tornando-se intolerável. Por isso, moduladores menos tóxicos e mais potentes estão sendo pesquisados (Wagner-Souza et al., 2003).

Resultados de estudos de expressão do *MDR1* e da P-gp são ainda controversos. Porém, de forma geral, a hiperexpressão tende a estar presente em tumores tratados e refratários comparados aos obtidos ao diagnóstico e antes do tratamento. Em linfoma não tratado, a expressão da P-gp é

usualmente baixa, mas a mesma pode ser induzida ou selecionada após a quimioterapia inicial (Liu et al., 2001; Rezende et al., 2005).

Liu et al. (2001) avaliaram a expressão do gene *MDR1* por PCR em tempo real e da proteína Pg-p por IHQ em amostras de pacientes com linfoma de células B. Os resultados mostraram que 41,7% dos casos expressavam *MDR1*/Pg-p, o que corrobora com estudos anteriores, onde a expressão positiva foi observada entre 20 a 50% dos casos. Além disso, pacientes com *MDR1*/Pg-p positivos tiveram pior sobrevida quando comparados aos pacientes negativos (12,7 meses x 29 meses, respectivamente) e a alta expressão de *MDR1*/Pg-p foi associada com maior probabilidade de recaída.

Oshawa et al. (2005) analisaram a expressão de Pg-p pela técnica de IHQ em 41 pacientes com LDGCB tratados com CHOP. A proteína foi positiva em 37% dos indivíduos e as taxas de RC foram significativamente menores no grupo de pacientes com expressão positiva quando comparados aos casos negativos (20% x 58%, respectivamente).

Andreadis et al. (2007) avaliaram a expressão de *MDR1* por microarray em pacientes com LDGCB não tratados. Utilizando a mediana de expressão como ponto de corte, os autores descreveram que pacientes com expressão acima da mediana apresentaram pior SG quando comparados aos pacientes com baixa expressão.

Gündüz et al. (2012) analisaram amostras de pacientes com LNH, LH e linfadenopatias não malignas por PCR quantitativo para verificar a expressão de *MDR1*, *MRP* e *LRP*. Os autores descreveram que a expressão de *MDR1* foi positiva em 23,8% dos casos, mas que a expressão de todos os genes estudados foi similar em tecidos malignos e não malignos. Além disso, a

expressão não apresentou associação com estágio, resposta ao tratamento e sobrevida.

3.8.2.3- Fatores OCT e Gene OCT1

A expressão de genes IgH e outros genes importantes para o desenvolvimento de células B é controlada por fatores de transcrição pertencentes à grande família de proteínas do domínio POU (Sáez et al., 2002).

Estes fatores foram descritos pela primeira vez no final da década de 80 em genes promotores de imunoglobulinas (Igs) (Zhenilo et al., 2003) e participam da regulação da expressão de diversos genes através da ligação ao octâmero do DNA (ATG CAA AT) ou outras sequências regulatórias similares (Heckman et al., 2006).

Os membros mais importantes desta família são o *OCT2*, predominantemente expresso em células B e o *OCT1*, que apresenta expressão ubíqua (Sáez et al., 2002).

Diversos experimentos sugerem a importância destes fatores no desenvolvimento embrionário normal e na determinação do destino celular. A perda de OCT-1, por exemplo, é prejudicial para a eritropoiese normal, enquanto a perda de OCT-2 afeta a diferenciação das células B na fase terminal (Heckman et al., 2006).

O papel dos fatores OCT na regulação dos genes de Ig é controverso. Os fatores OCT alteram a expressão dos genes das Igs em neoplasias linfóides, mas a expressão e a função destes fatores dependem do estágio de diferenciação da célula maligna. Alguns autores, porém, não encontraram

correlação entre OCT2, nível de produção de Igs e estágio de diferenciação de linfócito B, mas sugerem que outros fatores da família OCT podem regular a transcrição das Igs (Kossakowska e Urbanski, 1991).

Alguns estudos mostraram expressão elevada de OCT-1 em linhagens de células B quando os níveis de expressão de OCT-2 e BOB.1/OBF.1 estão baixos, sugerindo que OCT-1 pode desempenhar um importante papel no controle de transcrição de imunoglobulinas durante esta fase de desenvolvimento da célula (Sáez et al., 2002; McCune et al. 2006).

A análise destes fatores de transcrição tem sido utilizada para o entendimento da diferenciação ligada ao fenótipo nos linfomas, permitindo correlacionar, além da linhagem, o estágio de diferenciação da célula (McCune et al., 2006). Porém, ainda existem poucos estudos na literatura que avaliaram a expressão destes fatores em linfoma.

Sáez et al. (2002) analisaram a expressão das proteínas OCT-1, OCT-2 e BOB.1/OBF.1 por IHQ em tecidos linfóides reacionais e tecidos de pacientes com vários subtipos de linfomas. Os resultados demonstraram que tecidos reacionais bem como tecidos de pacientes com linfoma co-expressam as três proteínas. Os casos de linfoma, incluindo 9 casos de LDGCB, apresentaram fraca expressão da proteína OCT-1 e expressão mais elevada de OCT-2 e BOB.1/OBF.1.

O estudo de McCune et al. (2006) corroborou estes resultados, uma vez que todos os casos de LNH expressaram as proteínas OCT-1 e OCT-2, sendo que a expressão de OCT-2 foi sempre mais forte do que a de OCT-1. Os autores descreveram, ainda, que OCT-1 foi expressa tanto em células de

linhagem T quanto B, indicando que este fator de transcrição não está restrito à uma única linhagem celular.

A análise preliminar da expressão de *OCT1*, *OCT2* e *BOB1* por PCR em tempo real não mostrou diferenças significativas nos níveis de RNA de células de linhagens B com e sem t(14;18). Porém, a redução dos fatores OCT e BOB-1 por RNA de interferência em células de linfoma com t(14;18) demonstrou que quando o alvo foi *OCT1* e *OCT2*, houve uma redução da expressão de *BCL2*, induzindo o processo de apoptose nestas células. Estes dados indicam que os fatores OCT e BOB-1 são necessários para a sobrevivência de células de linfoma, em parte, por regular a expressão de *BCL2*, desempenhando um importante papel na transformação maligna. Os autores sugerem que outros genes necessários para a sobrevivência ou proliferação das células também podem ser alvos destes fatores de transcrição tanto no desenvolvimento celular normal quanto maligno (Heckman et al., 2006).

3.9- Tratamento

A primeira droga antineoplásica foi introduzida Sidney Farber em 1948 para tratamento de leucemia (Miller, 2006). Atualmente existem diferentes classes de drogas: os antimetabólitos, a exemplo do Metotrexato; agentes que atuam danificando diretamente o DNA celular como Ciclofosfamida e Doxorubicina; os inibidores mitóticos como alcalóides da Vinca (Vincristina e Vinblastina) e inibidores de topoisomerase, como Etoposida. Entretanto, a sensibilidade tumoral aos diversos quimioterápicos não é homogênea, podendo ocorrer resistência primária ou secundária (Kaspers et al., 1999).

A utilização de múltiplas drogas combinadas foi o maior avanço para reduzir a resistência, mas diversos tumores persistem resistentes aos mais diferentes tipos de tratamento farmacológico (Rezende et al., 2005).

A partir da década de 70, o tratamento padrão para o LDGCB foi o regime CHOP, composto pelas drogas ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona. Porém, a partir de 2002, o surgimento dos anticorpos monoclonais modificou a abordagem dos linfomas agressivos. O Grupo GELA (Groupe d'Etude de Lymphome d'Adultes) realizou o primeiro estudo randomizado que demonstrou o benefício da adição do rituximabe, um anticorpo monoclonal IgG1 quimérico, anti-CD20, ao regime CHOP (R-CHOP) em pacientes idosos (Fisher et al., 1993; Colleoni e Inaoka, 2007; Illidge e Tolan, 2008).

O rituximabe foi o primeiro anticorpo aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) para tratamento de câncer. Inicialmente, foi utilizado para tratamento do linfoma folicular e LNH de baixo grau (Bonavida, 2006).

O uso de rituximabe no tratamento de primeira linha melhorou as taxas de RC em 75 a 80% dos pacientes e a sobrevida livre de eventos (SLE) de 29 para 47% nos pacientes com idade entre 60 e 80 anos e de 59 para 79% para pacientes entre 18 e 60 anos. Além disso, também houve melhora significativa na SG (Gisselbrecht et al., 2010).

Em 2010, uma associação de 12 diferentes países realizou um ensaio de colaboração em linfoma agressivo recorrente, que ficou conhecido como Estudo Coral. Neste ensaio multicêntrico randomizado de fase III, 396 pacientes com LDGCB refratários ao R-CHOP ou com recidiva foram distribuídos aleatoriamente em dois diferentes esquemas de tratamento: R-ICE

(rituximabe, ifosfamida, carboplatina e etoposida) ou R-DHAP (rituximabe, dexametasona, citarabina em altas doses e cisplatina). Os respondedores (n=206) receberam BEAM (carmustina, etoposida, citarabina e melfalan), seguido de transplante autólogo de medula óssea (ATMO) e foram randomizados para observação ou manutenção com rituximabe por um ano. Não foi observada diferença significativa entre os dois esquemas para SLE em 3 anos (26% *versus* 35%), SG em 3 anos (47% *versus* 51%) e resposta (63,5% *versus* 62,8%), com taxa de RC de 38% e insucesso de tratamento de 10% para ambos os regimes. Pior SLE foi relacionada a tratamento prévio com rituximabe, recaída inferior a 12 meses e IPI II ou III. Não houve eventos suficientes até o momento da análise dos dados do estudo para determinar o impacto do rituximabe administrado pós-transplante como terapia de manutenção. Os demais resultados indicam que pacientes com falha no tratamento de primeira linha com R-CHOP em menos de 12 meses após o uso do rituximabe têm prognóstico reservado e novos medicamentos para aumentar a taxa de resposta de esquemas de resgate e novas abordagens, incluindo o transplante alogênico devem ser explorados (Gisselbrecht et al, 2010).

3.10- Avaliação da resposta e seguimento

Os primeiros critérios de resposta universalmente aceitos para LNH, utilizados também para LH, foram publicados em 1999 pelo grupo de trabalho do Instituto Nacional do Câncer e revisados em 2007 pelo grupo de trabalho internacional (IWG) para incorporar a tomografia por emissão de pósitrons (PET-CT), imunohistoquímica e citometria de fluxo na avaliação da resposta.

Após vasta experiência com estes critérios e reconhecendo os progressos realizados após a sua publicação em 2011, foi realizado um workshop na 11ª Conferência Internacional em Linfoma Maligno em Lugano, na Suíça, com o objetivo de desenvolver melhores critérios de resposta para LH e LNH, relevantes para a comunidade médica e científica. Subcomissões focadas em questões clínicas e de imagem e uma subsequente oficina na 12ª Conferência Internacional em Linfomas Malignos de 2013, levaram à revisões posteriormente descritas e publicadas por Cheson et al. em 2014.

A avaliação de resposta ao tratamento deve ser realizada após o início da quimioterapia (no mínimo após três semanas, mas preferencialmente após de 6 a 8 semanas) e após o último ciclo de quimioterapia. Avaliações após 3 meses e 72 semanas após o término do tratamento também são recomendadas (Barrington et al., 2014).

O PET-CT é o exame de imagem mais indicado, especialmente para pacientes com RP, uma vez que o exame é mais sensível que a TC isoladamente. De acordo com o consenso da Conferência Internacional de Linfomas Malignos, recomenda-se utilizar uma escala de 5 pontos para avaliação do PET-CT, conforme descrito anteriormente no item 3.7.4 (Cheson, 2014; Barrington, 2014).

Na presença de massa residual metabolicamente ativa, se o tratamento de salvamento está sendo considerado, nova biópsia pode ser necessária. Se a doença residual é considerada improvável, o exame pode ser repetido posteriormente (Barrington et al., 2014).

Já a biópsia de medula óssea só deve ser repetida no final do tratamento nos casos em que houve acometimento inicial ou se houver

alterações hematológicas sugestivas de infiltração (Araújo et al., 2008; Tilly e Dreyling, 2010).

Para seguimento do paciente, com o objetivo de monitorar recaída ou eventos adversos relacionados ao tratamento, o bom julgamento clínico, história detalhada e exames físicos são os pilares principais do acompanhamento do paciente. Após a remissão, a probabilidade de recidiva diminui com o tempo. Devem ser realizados exames físicos a cada 3 meses durante os dois primeiros anos e a cada 6 meses durante o terceiro ano. Após este período, o acompanhamento passa a ser anual (Tilly e Dreyling, 2010; Cheson et al., 2014).

Os exames laboratoriais recomendados incluem hemograma completo, dosagem dos níveis séricos de DHL e exames radiológicos em 3, 6, 12 e 24 meses ou quando houver algum sintoma ou achado clínico suspeito (Tilly e Dreyling, 2010).

MÉTODOS

4 – Métodos

4.1- Casuística

Foram avaliados todos os pacientes com LDGCB *de novo* ao diagnóstico, provenientes do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) e do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), no período de janeiro de 2006 a janeiro de 2011 e que apresentavam os seguintes critérios de inclusão: tratamento de primeira linha com R-CHOP, HIV negativo, local do tumor primário diferente de Sistema Nervoso Central (SNC) e prontuários disponíveis.

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HC-FMUSP (Anexos A e B) seguindo os princípios éticos estabelecidos pela Declaração de Helsinki (Grady, 2002). Todos os participantes do estudo receberam informações sobre a pesquisa, incluindo justificativa, objetivos e procedimentos que seriam adotados. Após aprovada a sua participação, a mesma foi formalizada pelo preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). (Anexo C). No caso dos pacientes que foram a óbito, o TCLE foi assinado por um familiar.

4.1.1- Caracterização dos pacientes

Foram analisados pacientes de ambos os sexos, todos com diagnóstico de LDGCB, confirmados por exame anatomopatológico e Imunohistoquímica.

Além disso, foram inclusos tanto casos de linfoma de origem linfonodal quanto extralinfonodal, acometendo diferentes regiões. Todos receberam tratamento de primeira linha com R-CHOP.

4.2- Métodos

4.2.1- Revisão dos prontuários

Inicialmente, foi realizado levantamento de dados no arquivo eletrônico da Divisão de Anatomia Patológica do HC-FMUSP de todos os registros de pacientes atendidos entre Janeiro de 2006 e Janeiro de 2011, com provável diagnóstico de Linfoma. Destes, 260 prontuários foram separados para revisão dos dados de interesse, sendo 98 incluídos no estudo por atenderem aos critérios de inclusão de amostras (Figura 4).

Os pacientes com blocos de parafina indisponíveis (casos diagnosticados em outra instituição, casos em que o paciente retirou o bloco do arquivo da Divisão de Anatomia Patológica do HC-FMUSP ou com material insuficiente para as reações de Biologia Molecular) foram incluídos na análise de sobrevida para reduzir uma possível interferência de seleção em nosso estudo.

Quanto aos prontuários, para ser considerado como “não localizado”, o mesmo não foi encontrado no prontuário eletrônico do HC-FMUSP, no prontuário eletrônico do ICESP e nos prontuários manuscritos do HC-FMUSP e do Hospital-Dia, sendo estes solicitados por três vezes, em datas diferentes e sem constar registro de retirada para outro estudo.

Figura 4: Levantamento de dados para seleção de pacientes para o estudo.

A revisão detalhada dos prontuários dos pacientes incluídos no estudo para coleta dos dados de interesse (conforme indicado na Figura 5 e Anexo D) foi realizada com auxílio de um médico hematologista da equipe, utilizando as definições padronizadas para classificação das variáveis, conforme descrito na Revisão da Literatura, item 3.8.1.

Figura 5: Informações coletadas nos prontuários médicos dos pacientes selecionados para o estudo.

4.2.2- Estadiamento

Para o estadiamento, os pacientes foram avaliados através de dados de anamnese para a existência de sintomas constitucionais e exame físico completo na busca de adenomegalias periféricas e suas respectivas medidas. Massas tumorais maiores de 10 cm foram definidas como *bulky*. Os pacientes foram estadiados segundo a Classificação de Ann Arbor em até IV estádios clínicos. Para os pacientes com LNH primário de trato gastrointestinal foi aplicado o estadiamento de Lugano.

No protocolo de imagem, os pacientes foram submetidos à tomografia computadorizada de pescoço, tórax, abdome e pelve. A avaliação de medula

óssea foi realizada por biópsia de crista ilíaca posterior e análise histopatológica com imuno-histoquímica. Punção lombar e citologia oncológica foram realizadas em pacientes com LNH primário de seios da face, epidural, testículo, mama e IPI de alto risco.

4.2.3- Tratamento

Pacientes com doença volumosa e risco de síndrome de lise tumoral receberam uma pré-fase de quimioterapia citoreduzora com CVP (Tabela 4).

Tabela 4 - Protocolo CVP citoreduzidor

Fármaco	Dose (mg/m²)	Via	Dias
Ciclofosfamida	300	EV	D1
Vincristina	1,0 (máximo 2mg)	EV	D1
Prednisona	100 mg	VO	D1 a D5

Os pacientes foram tratados com o protocolo R-CHOP (Tabela 5) de 4 a 8 ciclos com intervalos de 21 dias, dependendo do estágio clínico inicial e do tipo de resposta. Pacientes com doença localizada foram tratados com 4 ciclos de quimioimunoterapia e radioterapia em campo envolvido de consolidação. Pacientes com doença avançada foram tratados com 6 a 8 ciclos de quimioimunoterapia. Casos com doença *bulky*, comprometimento de seios da face, testículo e ósseo foram consolidados com radioterapia adjuvante em campo envolvido. Pacientes com doença avançada que mantiveram doença residual localizada após re-estadiamento com PET-CT também foram consolidados com radioterapia. Para os pacientes com LNH primário de seios da face, epidural, testículo, mama e IPI de alto risco foi realizada quimioterapia

intratecal profilática com 4 ciclos de metotrexato (12 mg) e dexametasona (2mg).

Tabela 5 - Protocolo R-CHOP

Fármaco	Dose	Via	Dias
Rituximabe	375 mg/m ²	EV	D1
Ciclofosfamida	750 mg/ m ²	EV	D1
Doxorrubicina	50 mg/m ²	EV	D1
Vincristina	1,4 mg/m ² (máximo 2 mg)	EV	D1
Prednisona	100 mg/dia	VO	D1 a D5

4.2.4 – Avaliação de resposta e seguimento

A resposta ao tratamento foi avaliada segundo os critérios propostos por Cheson, 2007. Para essa análise, todos os pacientes foram submetidos à nova avaliação clínica, laboratorial e radiológica, incluindo CT após o quarto ciclo de quimioterapia e ao término do tratamento. Pacientes com medula óssea infiltrada ao diagnóstico realizaram nova BMO ao final do tratamento. Após o término do tratamento, os pacientes foram acompanhados e avaliados clínica e laboratorialmente a cada três meses nos primeiros dois anos de seguimento; a cada seis meses, nos primeiros cinco anos e, a seguir, anualmente.

Para avaliação da resposta clínica, utilizamos os critérios descritos a seguir (Cheson, 2007):

A. Resposta Completa (RC): desaparecimento completo de todos os elementos clínicos detectáveis da doença e sintomas relacionados à mesma;

B. Resposta Parcial (RP): diminuição mínima de 50% das seis maiores massas ou nódulos, que devem ser selecionados pelos critérios: ser

mensuráveis em duas dimensões, ser de diferentes regiões do corpo e incluir as áreas de mediastino e retroperitônio, caso estas sejam afetadas pela doença;

C. Recidiva / Progressão da Doença: aparecimento de uma nova lesão maior que 1,5 cm em qualquer eixo durante ou no final do tratamento, mesmo que as lesões iniciais estiverem diminuindo em tamanho ou, ainda, aumento de no mínimo 50% no tamanho das massas ou nódulos envolvidos;

D. Doença Estável: quando o paciente não consegue atingir os critérios necessários para RC ou RP e não há progressão da doença;

E. Sobrevida Global: é o tempo decorrido entre o diagnóstico do linfoma e a morte como resultado de uma causa qualquer;

F. Sobrevida Livre de Doença: é o tempo medido pelo momento de ocorrência de um estado livre de doença ou remissão completa e a nova ocorrência de doença, morte como resultado de linfoma ou toxicidade aguda do tratamento;

G. Sobrevida Livre de Progressão: é o tempo decorrido entre o diagnóstico do linfoma até a progressão da doença ou morte como resultado de uma causa qualquer. Reflete o crescimento do tumor;

A data do diagnóstico foi definida como a data do laudo da biópsia através da qual foi realizado o primeiro diagnóstico de LDGCB e na falta deste, a data da consulta na qual o diagnóstico foi confirmado.

Informações sobre o óbito foram obtidas nos prontuários médicos, no Cadastro Nacional de Falecidos (CNF) ou por contato telefônico com os familiares.

A progressão da doença foi definida como a primeira data de documentação de nova lesão ou aumento de lesão prévia.

A data da última avaliação foi obtida nos registros médicos, considerando-se a última data em que o paciente compareceu à consulta, ao pronto-socorro ou em internações. Quando a data da última avaliação era muito distante da data de última revisão do prontuário foi realizado contato telefônico para confirmar a informação. Considerou-se como eventos para censura, a alta ambulatorial, transferência para outro serviço e abandono de tratamento.

4.2.5- Preparo do material

Todas as amostras de biópsia armazenadas na Divisão de Anatomia Patológica do HC-FMUSP estavam fixadas em formalina e emblocadas em parafina (FFEP), conforme os métodos padrão.

Foram selecionados os blocos de parafina correspondentes à biópsia do momento de diagnóstico de cada caso incluído no estudo. Para cada amostra foram realizados quatro cortes com espessura de 20µm, por meio das técnicas histológicas de rotina. Os cortes foram colocados em microtubos de 1,5mL livres de DNase e RNase e posteriormente submetidos aos processos de extração de RNA e DNA.

4.2.6- Extração de RNA

Para extração de RNA utilizou-se o kit comercial *RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Optimized for FFPE Samples* (Ambion Inc., Austin, TX,

USA), com algumas modificações no protocolo, conforme descrito a seguir (Gouveia *et al.*, 2014).

Inicialmente, realizou-se o processo de desparafinização e rehidratação dos cortes. Para isso, foi adicionado 1mL de xilol PA (*Synth*®, *Diadema, SP, Brasil*), seguido de homogeneização em *Vortex Genie*® 2T (*Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA*), e incubação a 50°C por 5 minutos no *Termomixer Digital* (*Eppendorf AG, Hamburg, Germany*). Após a incubação, as amostras foram centrifugadas em velocidade máxima por 5 minutos na microcentrífuga 5418-R (*Eppendorf AG, Hamburg, Germany*). O xilol foi descartado e o botão celular lavado com etanol absoluto (*Merck KGaA, Darmstadt, Germany*) por 2 vezes, desprezando-se o sobrenadante após cada lavagem. A seguir, o botão celular foi lavado com 1mL de Tampão Fosfato Salino (PBS) com incubação por 5 minutos a temperatura ambiente, seguido de centrifugação em velocidade máxima por 5 minutos na microcentrífuga 5418-R (*Eppendorf AG, Hamburg, Germany*).

Após secagem completa do botão celular, foi iniciado o processo de digestão do tecido, acrescentando-se 200µL de tampão de digestão e 5µL de protease em cada amostra. Após incubação das amostras a 50°C por 15 minutos e 80°C por 15 minutos no *Termomixer Digital* (*Eppendorf AG, Hamburg, Germany*), realizou-se o isolamento do RNA, adicionando-se 790µL da solução Isolation Additive/Etanol (240µL de Isolation Additive + 550µL de Etanol PA) em cada amostra. A seguir, as amostras foram transferidas para as colunas de purificação e lavadas com os tampões de lavagem fornecidos pelo kit (Wash 1 e Wash 2/3), conforme instruções do fabricante.

A digestão com DNase foi realizada com mix contendo 6µL de tampão DNase 10x, 4µL de DNase e 50µL de água livre de nucleases, e seguida pela lavagem com os tampões Wash 1 e Wash 2/3, conforme recomendações do fabricante.

Ao final do processo, a coluna foi transferida para um microtubo estéril de 1,5mL e adicionou-se 60µL da solução de eluição do kit. Após incubação de 5 minutos a temperatura ambiente, centrifugou-se as amostras em velocidade máxima por 1 minuto na microcentrífuga 5418-R (*Eppendorf AG, Hamburg, Germany*). Na sequência, as mesmas foram imediatamente estocadas a -80°C até o momento do uso.

4.2.7- Quantificação e análise da qualidade do RNA

A concentração e a pureza das amostras de RNA foram determinadas por espectrofotometria no equipamento NanoDrop®ND-2000 (*Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE*). Foram consideradas adequadas, as amostras com um mínimo de 50ng/µL e grau de pureza (A280/A260nm) próximo a 2,0.

4.2.8- Transcrição reversa (cDNA)

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir do protocolo descrito a seguir (Carvalho et al., 2010), utilizando o kit SuperScript III (*Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA*).

Inicialmente, foram misturados em um microtubo estéril de 1,5 mL, os seguintes reagentes: 1µL de Random primers (20-200ng), 3µL de RNA total (600ng), 1µL de DNTP (10mM de cada) e 7µL de água ultrapura. A reação foi aquecida a 65°C por 5 minutos no Termomixer Digital (*Eppendorf AG*,

Hamburg, Germany) e em seguida colocada no gelo. Os tubos foram centrifugados brevemente na microcentrífuga 5418-R (*Eppendorf AG, Hamburg, Germany*) para retirar o vapor da tampa e foram acrescentados 4µL de tampão First-Strand Buffer 5x e 2µL de DTT 0,1M. Após homogeneizar gentilmente o conteúdo, adicionou-se 1µL da enzima transcriptase reversa e incubou-se a reação a 25°C por 10 minutos; 42°C por 50 minutos e a 70°C por 15 minutos no Termomixer Digital (*Eppendorf AG, Hamburg, Germany*). O cDNA resultante foi estocado a -20°C até o momento do uso.

4.2.9- PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Para estudo da expressão dos genes *BCL2*, *MDR1* e *OCT1*, foi utilizado o método de quantificação relativa pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Segundo Pfaffl (2001), esta técnica além de ser altamente sensível e precisa, permite a quantificação de transcritos raros e pequenas alterações na expressão gênica.

A quantificação relativa é determinada pela expressão do gene alvo em relação à expressão de um ou mais genes referência, utilizados para normalizar a fração de RNA mensageiro (RNAm). Os genes referência são genes constitutivamente expressos e necessários para manutenção de qualquer célula. O gene referência ideal é aquele que apresentar expressão constante em todos os tecidos e fases do desenvolvimento, bem como não ser afetado por tratamentos experimentais. Além disso, para o sucesso da reação de qRT-PCR, outras variáveis precisam ser controladas, incluindo a quantidade de material inicial, a eficiência das reações e a utilização de uma amostra

calibradora (controle) à qual devem ser comparadas as amostras desconhecidas (Pfaffl, 2001; Vandesompele, 2002).

De acordo com o estudo realizado por Lossos *et al.* (2003), os três melhores genes de referência para normalização da qRT-PCR em diferentes subtipos de linfoma (incluindo o LDGCB) são os genes *PRKG1*, *TBP* e *GAPDH*. Porém, conseguimos reproduzir os achados apenas para os primers e sondas dos genes *PRKG1* e *GAPDH*, os quais foram utilizados como genes de referência para o presente estudo.

Já em relação aos genes alvo, para os genes *BCL2* e *MDR1* utilizou-se uma sequência de primers e sondas propostas por Shen *et al.*, 2004 e Fujimaki *et al.*, 2002, respectivamente. Para o gene *OCT1*, os primers e sondas foram desenhados com auxílio do programa Primer Express (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*).

Para o controle negativo da reação foi utilizada água ultrapura. Um *pool* de cDNA contendo cinco amostras de amígdala reacionais foi utilizada como amostra calibradora.

Todos os primers e sondas utilizados foram sintetizados pela empresa *Life Technologies (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)*. Antes da síntese, estes oligonucleotídeos foram conferidos em relação à sua autenticidade e especificidade para o RNA e para a espécie humana na ferramenta Primer-BLAST do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Além disso, todos os primers foram sintetizados em regiões de éxons para evitar a possibilidade de contaminação com DNA genômico (Figura 6).

Figura 6 - Alinhamento dos primers no Primer-Blast do NCBI.
 Legenda: A, B, C, D e E indicam o alinhamento dos primers com as sequências de RNAm dos genes *PRKG1*, *GAPDH*, *BCL2*, *MDR1* e *OCT1*, respectivamente.
 As linhas pretas indicam as regiões de éxons e as azuis representam as sequências de primers (F e R).

As sequências de primers e sondas utilizadas no presente estudo estão descritos na tabela a seguir (Tabela 6).

Tabela 6 – Primers e sondas dos genes referência e genes alvo utilizados nas reações de PCR quantitativo em tempo real e tamanho dos produtos esperados

GENE	SEQÜÊNCIA DOS PRIMERS (5'-3') E SONDAS	TAMANHO DO PRODUTO (pb)
PRKG1	F: GGGAAAAGATGCTTCTGGGAA R: TTGGAAAGTGAAGCTCGGAAA Sonda: FAM-AAGGTTAAAGCCGAGCCA-TAMRA	75
GAPDH	F: AGCCGAGCCACATCGCT R: TGGCAACAATATCCACTTTACCAGAGT Sonda: FAM-CCCTGGTGACCAGGC-TAMRA	122
BCL2	F: TTGCTTTACGTGGCCTGTTTC R: GAAGACCCTGAAGGACAGCCAT Sonda: FAM-CCCACCCAGAGCCCTCCTGCC-TAMRA	94
MDR1	F: TGCTCAGACAGGATGTGAGTTG R: TTACAGCAAGCCTGGAACCTAT Sonda: FAM-AGCATTGACTACGACGCTCGCCAA-TAMRA	120
OCT1	F: 5'- CAGTGCAGCAACTACCCTCA-3' R: 5'-GGAGTGGAGGTGGTCTGTGT-3' Sonda: FAM-ACCAGGAGGGGAAGGCCCCACAG-TAMRA	246
Legenda: pb = pares de base		

Para as reações de qRT-PCR, utilizou-se o sistema TaqMan Universal PCR Master Mix (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*), conforme protocolo de Carvalho et al., 2010, descrito a seguir.

Preparou-se um mix contendo 12,5µL de tampão TaqMan PCR Master Mix; 1,25µL do ensaio primers e sondas (20x) e 6,25µL de água ultrapura. Adicionou-se 20µL do mix e 5µL de cDNA (200ng/µL) em cada poço da placa. Para a amplificação, utilizou-se o aparelho StepOne Plus™ (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*), sendo as condições de ciclagem: 50°C por 2 minutos; 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Todas as reações foram realizadas em duplicata.

Para análise dos dados, dois modelos matemáticos podem ser utilizados. Para escolha do melhor modelo, é necessário comparar a eficiência de amplificação dos genes alvo e referência. Se as eficiências de amplificação destes genes forem aproximadamente iguais é utilizado o método proposto por Livak e Schmittgen (2001) e se as eficiências não forem comparáveis é utilizado o modelo de Pfaffl (2001).

Assim, para determinar a eficiência de amplificação dos genes alvo e referência do presente estudo, foram feitas curvas de diluição seriada da amostra calibradora, partindo de 500ng de cDNA e fazendo uma diluição seriada de 1:5 com até 5 pontos (500ng, 100ng, 20ng, 4ng e 0,8ng). Esta curva de diluição seriada foi amplificada para cada um dos genes alvo e referência, conforme protocolo descrito anteriormente para as reações de qRT-PCR.

Para verificar se as eficiências de amplificação de genes alvo e referência são semelhantes, o ΔCT (CT alvo - CT endógeno) foi plotado em um gráfico contra o logaritmo da concentração de cDNA utilizada nos pontos da diluição seriada. Se a inclinação da reta for menor ou igual a 0,1, as eficiências de amplificação são semelhantes e se forem maior que 0,1, as eficiências não são comparáveis.

Para o presente estudo, as eficiências de todos os genes estudados foram maior que 0,1, como evidenciado nas figuras 7 a 12. Por isso, o modelo matemático empregado para a análise dos dados obtidos pelas reações de qRT-PCR foi o proposto por Pfaffl (2001), levando em consideração a normalização por mais de um gene endógeno através do geNorm (Vandesompele, 2002).

Figura 7 – Avaliação da eficiência de amplificação dos genes *BCL2* e *PRKG1*.

Legenda: **A** e **B** mostram a curva padrão obtida a partir da amplificação de cada ponto da diluição seriada para os genes *BCL2* e *PRKG1*, respectivamente. **C** mostra a correlação entre o logaritmo de concentração de amostra e o ΔCT dos genes *BCL2* e *PRKG1*.

Figura 8 – Avaliação da eficiência de amplificação dos genes *MDR1* e *PRKG1*.

Legenda: **A** e **B** mostram a curva padrão obtida a partir da amplificação de cada ponto da diluição seriada para os genes *MDR1* e *PRKG1*, respectivamente. **C** mostra a correlação entre o logaritmo de concentração de amostra e o ΔCT dos genes *MDR1* e *PRKG1*.

Figura 9 – Avaliação da eficiência de amplificação dos genes *OCT1* e *PRKG1*.

Legenda: **A** e **B** mostram a curva padrão obtida a partir da amplificação de cada ponto da diluição seriada para os genes *OCT1* e *PRKG1*, respectivamente. **C** mostra a correlação entre o logaritmo de concentração de amostra e o ΔC_t dos genes *OCT1* e *PRKG1*.

Figura10 – Avaliação da eficiência de amplificação dos genes *BCL2* e *GAPDH*.

Legenda: **A** e **B** mostram a curva padrão obtida a partir da amplificação de cada ponto da diluição seriada para os genes *BCL2* e *GAPDH*, respectivamente. **C** mostra a correlação entre o logaritmo de concentração de amostra e o ΔCT dos genes *BCL2* e *GAPDH*.

Figura 11 – Avaliação da eficiência de amplificação dos genes *MDR1* e *GAPDH*.

Legenda: **A** e **B** mostram a curva padrão obtida a partir da amplificação de cada ponto da diluição seriada para os genes *MDR1* e *GAPDH*, respectivamente. **C** mostra a correlação entre o logaritmo de concentração de amostra e o ΔCT dos genes *MDR1* e *GAPDH*.

Figura12 – Avaliação da eficiência de amplificação dos genes *OCT1* e *GAPDH*.

Legenda: **A** e **B** mostram a curva padrão obtida a partir da amplificação de cada ponto da diluição seriada para os genes *OCT1* e *GAPDH*, respectivamente. **C** mostra a correlação entre o logaritmo de concentração de amostra e o ΔCT dos genes *OCT1* e *GAPDH*.

De acordo com o método descrito por Pfaffl (2001), a taxa de expressão relativa (R) é baseada na seguinte equação:

$$R = \frac{(\text{Eficiência}_{\text{alvo}})^{CT(\text{amostra calibradora} - \text{amostra teste})}}{(\text{Eficiência}_{\text{endógeno}})^{CT(\text{amostra calibradora} - \text{amostra teste})}}$$

$$\text{Eficiência} = -1 + (10^{-1/\text{slope}})$$

Como foi empregada a normalização por mais de um gene referência, foi utilizada a média geométrica dos genes referência proposta por Vandesompele et al., 2002. Neste caso, a expressão relativa dos genes alvo

corrigida por mais de um gene referência (NRQ) é baseada na seguinte equação:

$$NRQ = \frac{(Eficiência_{alvo})^{CT(amostra\ calibradora - amostra\ teste)}}{[(Eficiência_{endógeno\ 1})^{CT(amostra\ calibradora - amostra\ teste)} * (Eficiência_{endógeno\ 2})^{CT(amostra\ calibradora - amostra\ teste)}]^{0,5}}$$

4.2.10- Extração de DNA

Para a extração de DNA de amostras FFEP, utilizou-se o protocolo descrito por Carvalho et al., 2010, com algumas modificações propostas por nossa equipe (Gouveia et al., 2016), conforme descrito a seguir.

Inicialmente, realizou-se o processo de desparafinização e rehidratação dos cortes, conforme descrito anteriormente no processo de extração de RNA.

Após secagem completa do botão celular, foram adicionados 480µL de tampão Tris-EDTA (TE) e 20µL de proteinase K (200mg/mL) em cada amostra. Estas foram incubadas a 37°C por 16 horas no Termomixer Digital (*Eppendorf AG, Hamburg, Germany*). A temperatura foi então elevada a 90°C por 10 minutos para inativação da proteinase K.

Foram acrescentados 1mL da mistura Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (*Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA*) na proporção 25:24:1, respectivamente. Após homogeneização no Vortex Genie® 2T (*Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA*), as amostras foram centrifugadas a 13000rpm por 15 minutos na microcentrífuga 5418-R (*Eppendorf AG, Hamburg, Germany*). O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5mL livre de DNase e RNase, foi adicionado 1mL da mistura

Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1) e repetido o processo de centrifugação nas mesmas condições.

O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5mL livre de DNase e RNase e foram adicionados 20µL de Acetato de Sódio 3M e 900µL de Etanol Absoluto (*Merck KGaA, Darmstadt, Germany*). As amostras foram homogeneizadas por inversão e incubadas por pelo menos 30 minutos à temperatura de -20°C.

Após o período de incubação, as amostras foram transferidas para a coluna do kit comercial *QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)* e centrifugadas a 8000rpm por 1 minuto na microcentrífuga 5418-R (*Eppendorf AG, Hamburg, Germany*). O filtrado foi descartado e a coluna recolocada em um novo tubo. Foram adicionados 500µL do tampão de lavagem AW1, fornecido pelo kit, e as amostras foram centrifugadas a 8000rpm por 1 minuto na microcentrífuga 5418-R (*Eppendorf AG, Hamburg, Germany*).

Após descarte do filtrado e transferência da coluna para um novo tubo, foi realizada uma segunda lavagem com 500µL do tampão AW2. As amostras foram centrifugadas a 14000rpm por 3 minutos na microcentrífuga 5418-R (*Eppendorf AG, Hamburg, Germany*).

As colunas foram transferidas para um microtubo de 1,5mL livre de DNases e RNases, foram adicionados 200µL de tampão de eluição (AE) no centro da coluna e as amostras foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 8000rpm por 1 minuto na microcentrífuga 5418-R (*Eppendorf AG, Hamburg, Germany*). As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

4.2.11- Quantificação e análise da qualidade do DNA

A concentração e a pureza das amostras de DNA foram determinadas por espectrofotometria no equipamento NanoDrop®ND-2000 (*Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE*). Foram consideradas adequadas amostras com relações de absorbância (A280/A260nm) entre 1,7 e 1,9.

4.2.12- Detecção da translocação t(14;18)

As reações para detecção da translocação t(14;18) foram realizadas pela técnica de Nested-PCR, conforme o protocolo de Nambiar et al., 2008 descrito a seguir. Para todas as reações foi utilizado o kit comercial *Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)*.

Todos os primers utilizados, descrito na tabela 7, foram sintetizados pela empresa *Life Technologies (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)*.

Na primeira etapa da Nested-PCR foram utilizados 5,0µL de Tampão 10x; 1,0µL de DNTP 10mM; 2,0µL de MgCl₂ 50mM; 1,0µL do primer *BCL2*(1) 10pmol/µL; 1,0µL do primer *IGH*(1) 10pmol/µL; 0,2µL de TaqPlatinum 500U; 5,0 µL da amostra (DNA) e 34,8µL de água ultrapura. Para a amplificação, utilizou-se o termociclador Mastercycler Gradient (*Eppendorf AG, Hamburg, Germany*), sendo o programa: 95°C por 5 minutos; 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, 58°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos; 72°C por 5 minutos.

Na segunda etapa da Nested-PCR foram utilizados 5,0µL de Tampão 10x; 1,0µL de DNTP 10mM; 2,0µL de MgCl₂ 50mM; 1,0µL do primer *BCL2*(2) 10pmol/µL; 1,0µL do primer *IGH*(2) 10pmol/µL; 0,2µL de TaqPlatinum 500U; 5,0 µL da amostra (produto da primeira etapa da Nested-PCR) e 34,8µL de água ultrapura. Para a amplificação, utilizou-se o termociclador Mastercycler

Gradient (*Eppendorf AG, Hamburg, Germany*), sendo o programa: 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos; 72°C por 10 minutos.

Tabela 7 – Primers utilizados nas reações de Nested-PCR para detecção da t(14;18)

Etapa da Nested-PCR	SEQÜÊNCIA DOS PRIMERS (5´-3´)
Primeira etapa	<i>BCL2</i> (1): CAGCCTTGAAACATTGATGG <i>IGH</i> (1): ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT
Segunda etapa	<i>BCL2</i> (2): TATGGTGGTTTGACCTTTAG <i>IGH</i> (2): GTGACCAGGGTCCCTTGGCCCCAG

4.2.13- Reações de Imunohistoquímica

Para realização das reações de IHQ com o objetivo de verificar a expressão das proteínas BCL-2, Pg-p e OCT-1, foram feitos cortes de 4µm dos blocos de parafina dos pacientes incluídos no estudo.

Cada corte foi transferido para uma lâmina de vidro previamente tratada com 3-aminopropil-trietoxisilano e incubado a 60°C por 30 minutos e a temperatura ambiente por 10 minutos. Após este período de incubação, os cortes foram imersos em concentrações decrescentes de etanol, seguidos por lavagens em água corrente e destilada.

Para bloqueio da atividade de peroxidase endógena foram realizadas cinco imersões de 5 minutos em solução de peróxido de hidrogênio a 20 volumes. A seguir, foi realizado um pré-tratamento para a recuperação dos antígenos, onde os cortes foram imersos em solução de ácido cítrico 0,01M

(pH 6,0) e aquecidos em panela de pressão por 3 minutos e meio. Foram realizadas lavagens sucessivas em água corrente, água destilada e PBS, sendo este processo repetido três vezes.

Foi realizada a incubação com o anticorpo primário (específico para o antígeno) diluído em solução de albumina a 1% e PBS em câmara úmida a 4°C por 18 horas. A seguir, foram realizadas três lavagens com PBS e a incubação com o anticorpo secundário conjugado com o polímero (Reveal SPB125H, marca Spring) a 37°C por 30 minutos. Após a incubação, foram realizadas mais três lavagens com tampão PBS.

Para a revelação, foi empregado o cromógeno 3,3 diaminobenzidina a 37°C por 30 minutos, seguido de lavagem em água corrente e água destilada, contra-coloração leve com Hematoxilina de Harris e nova lavagem em água corrente e destilada.

As lâminas foram desidratadas por imersão em concentrações crescentes de álcool, sendo uma imersão em etanol a 75%, duas imersões em etanol a 95%, duas imersões em etanol absoluto e três imersões em xilol.

As lâminas foram montadas com lamínulas e *Entellan* e as leituras foram realizadas com auxílio da médica patologista da equipe.

A Tabela 8 descreve os anticorpos, marca e diluições utilizados neste processo.

Tabela 8 - Anticorpos utilizados nas reações de Imunohistoquímica

ANTICORPO	MARCA	CLONE	DILUIÇÃO
BCL-2	Zeta	E-17	1:400
P-gp	Abcam	JSB-1	1:400
OCT-1	Abcam	Policlonal	1:100

Para leitura das lâminas, foram adotados os critérios definidos de acordo com as referências a seguir. Em todos os casos a classificação foi feita levando em consideração a porcentagem de células positivas. Assim:

- **Proteína BCL-2:** utilizou-se o preconizado por Hu et al., 2013, que determina valor de corte de 70% de positividade para a proteína BCL-2;
- **Proteína Pg-p:** Utilizou-se o preconizado por McCluggage et al. (2010), que classificou as amostras como: 0 para casos negativos; 1+ quando menos que 10% são células positivas; 2+ se de 10% a 50% das células são positivas; 3+ se mais de 50% das células são positivas;
- **Proteína OCT-1:** Utilizou-se o descrito por Sáez et al. (2002), onde a amostra é classificada como: 0 quando a expressão é ausente; 1+ quando a expressão é fraca; 2+ para expressão moderada e 3+ para expressão intensa.

4.2.14- Análise Estatística

Para verificar a possível existência de associação entre os dados clínicos e laboratoriais estudados e a taxa de remissão completa foi utilizado o Teste Exato de Fisher ou Teste de Razão de Verossimilhanças (Kirkwood e Sterne, 2006).

Para avaliação da SG, SLD e SLP foram estimados os tempos médios de sobrevida segundo as características de interesse com uso da função Kaplan-Meier (Kleinbaum, 1996).

O teste de *log rank* foi utilizado para comparar as curvas de sobrevida e determinar se houve associação entre as características clínicas e laboratoriais e a SG, SLD e SLP. Além disso, foram estimados os riscos relativos (HR: Hazard Ratio) com intervalos de confiança de 95% a partir do uso da regressão de Cox bivariada. Para as variáveis que influenciaram de forma significativa nos tempos de sobrevida foi verificada a influência conjunta das mesmas na SG, SLD e SLP através da análise multivariada pela regressão múltipla de Cox (Kleinbaum, 1996). Primeiramente foi criado o modelo sem as variáveis de expressão, devido ao fato da amostra ser menor nestas variáveis, já que nem todos os casos incluídos no estudo tinham blocos de parafina disponíveis. Porém, após o ajuste do modelo foram introduzidas as variáveis de expressão gênica e proteica para verificar se as mesmas influenciaram na sobrevida dos pacientes (Kirkwood e Sterne, 2006).

A amostra foi estratificada segundo estadio, IPI e faixa etária e a expressão gênica e proteica foi avaliada com uso de frequências absolutas e relativas para verificar a existência de associação entre estas variáveis com uso do Teste Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher. Além disso, foram calculadas a SG e SLP para cada um destes subgrupos com uso de regressão de Cox e com estimativas do Risco Relativo, utilizando um intervalo de confiança de 95% (Kirkwood e Sterne, 2006).

Os testes foram realizados com nível de significância de 5% e foi utilizado o software IBM SPSS Statistics, versão 20.0.

RESULTADOS

5 – Resultados

5.1- Revisão dos prontuários

5.1.1- Dados clínicos e laboratoriais

Em 16,3% (n=16/98) dos pacientes incluídos no estudo não foi possível obter todos os dados clínicos e laboratoriais a partir dos prontuários médicos, pois as informações estavam incompletas. Porém, todos os pacientes foram incluídos na análise de SG para evitar viés por seleção de amostragem, mas foram excluídos da análise da variável ausente.

Dos 98 pacientes avaliados 50,0% (n=49/98) foram do sexo masculino e 50% do sexo feminino.

A idade dos pacientes variou de 15 a 84 anos, com mediana de 54,5 anos, sendo 58,2% (n=57/98) de idade menor que 60 anos e 41,8% (n=41/98) igual ou superior a 60 anos.

Infiltração de medula óssea foi observada em 13,3% dos pacientes (n=13/98) e de Sistema Nervoso Central em 2% (n=2/98).

Informações de acometimento extralinfonodal foram obtidas em 93,9% (n=92/98) dos casos. Destes, 92,4% (n=85/92) apresentaram menos de dois sítios extralinfonodais acometidos e 7,6% (n=7/92) envolvimento de dois ou mais sítios.

A *performance status* (estado funcional) foi avaliável em 90/98 pacientes, dos quais 44,5% (n=40/90) apresentaram escore superior a 2 e 55,5% (n=50/90) menor ou igual a 2.

A presença de sintomas B foi avaliável em 92/98 pacientes e foi observada em 71,7% (n=66/92) dos pacientes.

Massa do tipo *bulky* foi observada em 48,9% (n=44/90) dos casos avaliáveis.

O estágio clínico foi avaliável em 92 pacientes, dos quais 42,6% (n=40/94) apresentaram estágio I ou II e 57,4% (n=54/94) estágio III ou IV.

O IPI foi categorizado como baixo-risco (BR) ou risco intermediário-baixo (IB) em 47,3% (n=44/93) dos casos e risco intermediário-alto (IA) ou alto risco (AR) em 52,7% (n=49/93) dos casos. Já a DHL sérica elevada foi observada em 83,9% (n=78/93).

A tabela 9 apresenta um resumo das características clínicas e laboratoriais dos pacientes avaliados.

Tabela 9- Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LDGCB

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAS	%	N (observado/total)
<u>Sexo</u>		
Feminino	50,0	49/98
Masculino	50,0	49/98
<u>Idade</u>		
<60 anos	58,2	57/98
≥ 60 anos	41,8	41/98
<u>Acometimento da medula óssea</u>		
Presente	13,3	13/98
Ausente	86,7	85/98
<u>Acometimento do Sistema Nervoso Central</u>		
Presente	2,0	2/98
Ausente	98,0	96/98
<u>Número de sítios extralinfonodais</u>		
<2	92,4	85/92
≥2	7,6	7/92
Ausência de dados	6,1	6/98
<u>Performance Status</u>		
≤2	55,5	50/90
>2	44,5	40/90
Ausência de dados	9,2	8/98
<u>Sintomas B</u>		
Presente	71,7	66/92
Ausente	28,3	26/92
Ausência de dados	6,1	6/98
<u>Bulky</u>		
Presente	48,9	44/90
Ausente	51,1	46/90
Ausência de dados	8,2	8/98
<u>Estádio Clínico</u>		
I e II	42,6	40/94
III e IV	57,4	54/94
Ausência de dados	4,1	4/98
<u>Índice de Prognóstico Internacional</u>		
Baixo / Intermediário Baixo	47,3	44/93
Intermediário-Alto / Alto	52,7	49/93
Ausência de dados	5,1	5/98
<u>Nível de Desidrogenase Láctica</u>		
Normal	16,1	15/93
Alto	83,9	78/93
Ausência de dados	5,1	5/98

5.1.2 - Resposta ao tratamento

Dos 98 pacientes avaliados, 23,5% (n=23/98) foram a óbito antes do início do tratamento. Dos demais (n=75/98), 85,3% (n=64/75) obtiveram remissão completa (RC); 4,0% (n=3/75) remissão parcial (RP) e 9,3% (n=6/75) foram refratários primários. Oito por cento (n=6/75) recidivaram. Até a data da última avaliação, 42,8% (n=42/98) dos pacientes foram a óbito. Óbito ocorreu em 100% dos pacientes refratários primários (n=6/6); em 100% (n=3/3) dos pacientes com RP; em 12,5% (n=8/64) dos pacientes que obtiveram RC e em 83,3% (n=5/6) dos recidivados, além dos 23 pacientes que não conseguiram iniciar o tratamento. Censura por perda de seguimento ocorreu em 2,0% (n=2/98) dos pacientes. A tabela 10 apresenta o resumo das respostas ao tratamento.

Tabela 10- Resposta ao tratamento dos pacientes com LDGCB

RESPOSTA AO TRATAMENTO	%	N (observado/total)
Remissão Parcial	4,0	03/75
Remissão Completa	85,3	64/75
Refratário ao primeiro tratamento	8,0	06/75
Recidiva	8,0	06/75
Óbito	42,8	42/98

5.2- Expressão Gênica por qRT-PCR

O bloco de parafina para extração de RNA e análise de expressão gênica pela técnica de qRT-PCR estava disponível em 78,6% (n=77/98) dos casos. Em 11,2% (n=11/98) o bloco não foi encontrado nos arquivos da Divisão

de Anatomia Patológica do HC-FMUSP (para casos em que o paciente foi diagnosticado em outra instituição ou retirou o bloco) e em 10,2% (n=10/98) o material embocado foi insuficiente para obtenção dos cortes histológicos para extração de RNA.

Como a população estudada apresentou uma distribuição não normal, verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, foram utilizados os valores medianos de expressão para as análises de sobrevida. A mediana de expressão dos genes *BCL2*, *MDR1* e *OCT1* foi de 6,27, zero (0) e 24,49, respectivamente. O impacto destes valores nas taxas de RC, SG, SLD e SLP será descrito nos itens 5.4 e 5.5.

5.3- Expressão proteica por Imunohistoquímica (IHQ)

As colorações de IHQ foram avaliáveis em 59,2% (n=58/98) dos casos para BCL-2 e em 58,2% (n=57/98) para Pg-p e OCT-1.

Houve positividade para BCL2 em 69,0% (n=40/58) dos casos (Figura 13) e 31,0% (n=18/58) foram negativos. Dos 57 casos avaliados para Pg-p 87,7% (n=50/57) foram positivos e 12,3% (n=7/57) negativos. Para OCT-1, 84,2% (n=48/57) foram positivos e 15,8% (n=09/57) negativos. Dos 50 casos positivos para Pg-p, 18,0% (n=09/50) foram categorizados em 1+/3+; 30,0% (n=15/50) em 2+/3+ (Figura 14) e 52% (n=26/50) em 3+/3+ (Figura 15). Para OCT-1, 12,5% (n=6/48) foram categorizados em 1+/3+; 10,4% (n=5/48) em 2+/3+ (Figura 16) e 77,1% (n=37/48) em 3+/3+ (Figura 17). A tabela 11 apresenta o resumo da expressão das proteínas e as figuras 13 a 17 exemplificam fotos de lâminas de IHQ de alguns casos.

Tabela 11- Expressão proteica por IHQ nos pacientes com LDGCB

		BCL-2		Pg-p		OCT-1	
		N	%	N	%	n	%
Positivo	+1/+3	40/58	69,0	9/50	18	6/48	12,5
	+2/+3			15/50	30	5/48	10,4
	+3/+3			26/50	52	37/48	77,1
Negativo		18/58	31,0	7/57	12,3	09/57	15,8
Não-avaliável		06/64	9,4	06/64	9,4	06/64	9,4
Material insuficiente		23/98	23,5	24/98	24,5	24/98	24,5
Bloco indisponível		11/98	11,2	11/98	11,2	11/98	11,2

Figura 13 - Lâmina de Imunohistoquímica demonstrando expressão positiva de BCL-2. Aumento: 200x.

Figura 14- Lâmina de Imunohistoquímica, demonstrando expressão da proteína Pg-p em 10% a 50% das células (+2/+3). Aumento: 200x.

Figura 15- Lâmina de Imunohistoquímica, demonstrando expressão da proteína Pg-p em mais de 50% das células (+3/+3). Aumento: 200x.

Figura 16- Lâmina de Imunohistoquímica, demonstrando expressão positiva moderada (+2/+3) para a proteína OCT-1. Aumento: 200x.

Figura 17- Lâmina de Imunohistoquímica, demonstrando expressão positiva intensa (+3/+3) para a proteína OCT-1. Aumento: 400x.

5.4- Avaliação de Remissão

A associação das variáveis clínicas e laboratoriais, de expressão gênica e de expressão proteica com a RC foi realizada pelos Testes de Qui-quadrado, Teste Exato de Fisher ou Teste de Razão de Verossimilhanças. Os resultados não evidenciaram correlação estatisticamente significativa entre obtenção de RC e as respectivas variáveis estudadas (tabelas 12 e 13).

Tabela 12 - Associação entre variáveis clínicas e laboratoriais com a Remissão Completa pelo Teste Exato de Fisher

Remissão Completa							
Variável	Não		Sim		Total		p valor
	N	%	n	%	N	%	
Sexo							0,479
Feminino	3	33,3	33	51,6	36	49,3	
Masculino	6	66,7	31	48,4	37	50,7	
Idade							0,068
< 60 anos	3	33,3	43	67,2	46	63	
60 anos ou mais	6	66,7	21	32,8	27	37	
Acometimento MO							>0,999
Não	8	88,9	53	82,8	61	83,6	
Sim	1	11,1	11	17,2	12	16,4	
Acometimento SNC							>0,999
Não	9	100	62	96,9	71	97,3	
Sim	0	0	2	3,1	2	2,7	
Nº Sítios extralinfonodais							0,305
< 2	7	87,5	61	96,8	68	95,8	
2 ou mais	1	12,5	2	3,2	3	4,2	
Performance Status							0,712
2 ou menos	3	37,5	30	49,2	33	47,8	
> 2	5	62,5	31	50,8	36	52,2	
Bulky							>0,999
Ausente	5	55,6	32	50	37	50,7	
Presente	4	44,4	32	50	36	49,3	
Sintomas B							0,262
Ausente	1	11,1	21	32,8	22	30,1	
Presente	8	88,9	43	67,2	51	69,9	
Estádio Clínico							0,085
I ou II	2	22,2	35	54,7	37	50,7	
III ou IV	7	77,8	29	45,3	36	49,3	
IPI							0,481
Baixo/Intermediário-baixo	4	44,4	38	59,4	42	57,5	
Intermediário-Alto/Alto	5	55,6	26	40,6	31	42,5	
DHL							0,675
Normal	1	11,1	14	21,9	15	20,5	
Alto	8	88,9	50	78,1	58	79,5	

Tabela 13- Associação entre as variáveis de expressão gênica e protéica com Remissão Completa pelo Teste Exato de Fisher

Remissão Completa							p valor
Variável	Não		Sim		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Expressão <i>BCL2</i>							>0,999 *
Negativo	1	11,1	10	20	11	18,6	
Positivo	8	88,9	40	80	48	81,4	
Expressão <i>BCL2</i>							0,277 *
Abaixo da mediana	3	33,3	29	58	32	54,2	
Maior ou igual a mediana	6	66,7	21	42	27	45,8	
Expressão <i>MDR1</i>							>0,999 *
Negativo	5	55,6	28	56	33	55,9	
Positivo	4	44,4	22	44	26	44,1	
Expressão <i>OCT1</i>							>0,999 *
Negativo	1	11,1	6	12	7	11,9	
Positivo	8	88,9	44	88	52	88,1	
Expressão <i>OCT1</i>							0,464 *
Abaixo da mediana	4	44,4	31	62	35	59,3	
Maior ou igual a mediana	5	55,6	19	38	24	40,7	
IHQ <i>BCL-2</i>							0,290 *
Negativo	0	0	14	35	14	31,8	
Positivo	4	100	26	65	30	68,2	
IHQ Pg-p							0,399 #
Negativo	0	0	4	10,3	4	9,3	
1+	1	25	4	10,3	5	11,6	
2+	2	50	9	23,1	11	25,6	
3+	1	25	22	56,4	23	53,5	
IHQ Pg-p							>0,999 *
Negativo	0	0	4	10,3	4	9,3	
Positivo	4	100	35	89,7	39	90,7	
IHQ <i>OCT-1</i>							0,265 #
Negativo	0	0	8	20,5	8	18,6	
1+	0	0	3	7,7	3	7	
2+	0	0	5	12,8	5	11,6	
3+	4	100	23	59	27	62,8	
IHQ <i>OCT-1</i>							>0,999 *
Negativo	0	0	8	20,5	8	18,6	
Positivo	4	100	31	79,5	35	81,4	

Legenda: * Resultado do teste exato de Fisher; # Resultado do teste da razão de verossimilhanças.

A estratificação da casuística por IPI e estágio clínico em relação à expressão gênica e proteica não evidenciou associação estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (tabelas 14 e 15). Porém, em relação à idade, houve associação estatisticamente significativa entre pacientes com idade ≥ 60 anos e expressão do gene *OCT1* $\geq$ à mediana (Tabela 14), sendo que este subgrupo apresentou pior prognóstico ($p = 0,029$). Não houve associação estatisticamente significativa entre idade e expressão dos genes *BCL2* e *MDR1* ou com as proteínas BCL-2, Pg-p e OCT-1 (tabela 16).

Tabela 14 - Associação entre IPI e expressão gênica e proteica obtidos pelo Teste de Qui-quadrado

IPI							
Variável	Baixo/Intermediário-baixo		Intermediário-Alto/Alto		Total		p valor
	N	%	N	%	N	%	
Expressão <i>BCL2</i>							0,818 *
Negativo	5	13,9	6	15,8	11	14,9	
Positivo	31	86,1	32	84,2	63	85,1	
Expressão <i>BCL2</i>							0,821 *
Abaixo da mediana	18	50	18	47,4	36	48,6	
Maior ou igual a mediana	18	50	20	52,6	38	51,4	
Expressão <i>MDR1</i>							0,363 *
Negativo	18	50	23	60,5	41	55,4	
Positivo	18	50	15	39,5	33	44,6	
Expressão <i>OCT1</i>							>0,999 #
Negativo	3	8,3	4	10,5	7	9,5	
Positivo	33	91,7	34	89,5	67	90,5	
Expressão <i>OCT1</i>							0,642 *
Abaixo da mediana	19	52,8	18	47,4	37	50	
Maior ou igual a mediana	17	47,2	20	52,6	37	50	
IHQ <i>BCL-2</i>							0,771 *
Negativo	9	32,1	8	28,6	17	30,4	
Positivo	19	67,9	20	71,4	39	69,6	
IHQ <i>Pg-p</i>							0,422 #
Negativo	2	7,1	4	14,8	6	10,9	
Positivo	26	92,9	23	85,2	49	89,1	
IHQ <i>OCT-1</i>							0,729 #
Negativo	4	14,3	5	18,5	9	16,4	
Positivo	24	85,7	22	81,5	46	83,6	

Legenda: * Resultado do Teste de Qui-quadrado; # Teste Exato de Fisher.

Tabela 15 - Associação entre estágio clínico e expressão gênica e proteica obtidos pelo resultado do Teste de Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher.

Estádio							
Variável	I ou II		III ou IV		Total		p valor
	N	%	n	%	N	%	
Expressão <i>BCL2</i>							>0,999 #
Negativo	5	15,6	6	14,3	11	14,9	
Positivo	27	84,4	36	85,7	63	85,1	
Expressão <i>BCL2</i>							0,107 *
Abaixo da mediana	19	59,4	17	40,5	36	48,6	
Maior ou igual a mediana	13	40,6	25	59,5	38	51,4	
Expressão <i>MDR1</i>							0,73 *
Negativo	17	53,1	24	57,1	41	55,4	
Positivo	15	46,9	18	42,9	33	44,6	
Expressão <i>OCT1</i>							0,457 #
Negativo	4	12,5	3	7,1	7	9,5	
Positivo	28	87,5	39	92,9	67	90,5	
Expressão <i>OCT1</i>							0,639 *
Abaixo da mediana	17	53,1	20	47,6	37	50	
Maior ou igual a mediana	15	46,9	22	52,4	37	50	
IHQ <i>BCL-2</i>							0,432 *
Negativo	8	36,4	9	26,5	17	30,4	
Positivo	14	63,6	25	73,5	39	69,6	
IHQ <i>Pg-p</i>							>0,999 #
Negativo	2	9,1	4	12,1	6	10,9	
Positivo	20	90,9	29	87,9	49	89,1	
IHQ <i>OCT-1</i>							0,727 #
Negativo	3	13,6	6	18,2	9	16,4	
Positivo	19	86,4	27	81,8	46	83,6	

Legenda: * Resultado do Teste de Qui-quadrado; # Resultado do Teste Exato de Fisher.

Tabela 16 - Associação entre idade e expressão gênica e proteica obtidos pelo resultado do Teste de Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher

Idade (Anos)							
Variável	< 60		≥ 60		Total		p valor
	N	%	N	%	N	%	
Expressão <i>BCL2</i>							0,183 #
Negativo	9	19,6	2	6,5	11	14,3	
Positivo	37	80,4	29	93,5	66	85,7	
Expressão <i>BCL2</i>							0,125 *
Abaixo da mediana	26	56,5	12	38,7	38	49,4	
Maior ou igual a mediana	20	43,5	19	61,3	39	50,6	
Expressão <i>MDR1</i>							0,202 *
Negativo	29	63	15	48,4	44	57,1	
Positivo	17	37	16	51,6	33	42,9	
Expressão <i>OCT1</i>							0,695 #
Negativo	5	10,9	2	6,5	7	9,1	
Positivo	41	89,1	29	93,5	70	90,9	
Expressão <i>OCT1</i>							0,029 *
Abaixo da mediana	28	60,9	11	35,5	39	50,6	
Maior ou igual a mediana	18	39,1	20	64,5	38	49,4	
IHQ <i>BCL-2</i>							0,509 *
Negativo	12	34,3	6	26,1	18	31	
Positivo	23	65,7	17	73,9	40	69	
IHQ Pg-p							0,230 #
Negativo	6	17,1	1	4,5	7	12,3	
Positivo	29	82,9	21	95,5	50	87,7	
IHQ <i>OCT-1</i>							0,458 #
Negativo	7	20	2	9,1	9	15,8	
Positivo	28	80	20	90,9	48	84,2	

Legenda: * Resultado do Teste de Qui-quadrado; # Resultado do Teste Exato de Fisher.

5.5- Análises de Sobrevida

O tempo de sobrevida dos pacientes variou de 1 dia a 2451 dias (aproximadamente 81,7 meses ou 6,8 anos), com mediana de seguimento de 962 dias (aproximadamente 32 meses ou 2,67 anos).

O tempo mediano de sobrevida e a porcentagem de sobrevida em 5 anos foram estimadas diretamente dos gráficos para as variáveis de interesse, conforme descrito por Botelho et al., 2009.

As curvas de SG, SLD e SLP foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier (Kaplan e Meier, 1958). O teste de *log-rank* foi utilizado para determinar a associação entre as variáveis clínicas, laboratoriais, de expressão gênica e proteica com a SG, SLD, SLP. Para construção do modelo de análise multivariada foi utilizado o método de *stepwise* para seleção de variáveis para regressão linear (Cox, 1972).

5.5.1- Sobrevida Global (SG)

As análises de SG para as variáveis clínicas e laboratoriais evidenciaram diferenças estatisticamente significativas quanto à idade, número de sítios extralinfonodais, estágio clínico, IPI e DHL. As demais variáveis não mostraram diferenças significativas (Tabela 17).

Tabela 17 – Estimativa dos tempos medianos de Sobrevida Global dos pacientes em relação às características clínicas e laboratoriais.

Variável	Tempo médio estimado (dias)	Tempo Mediano estimado (dias)	IC (95%)		HR	IC (95%)		p valor
			Inferior	Superior		Inferior	Superior	
Sexo								0,745
Feminino	1306,94	NA	1042,26	1571,62	1,00			
Masculino	1401,56	1920,0	1079,39	1723,73	1,11	0,60	2,03	
Idade								0,010
< 60 anos	1698,45	NA	1421,57	1975,33	1,00			
≥ 60 anos	1060,62	510,0	729,72	1391,51	2,20	1,19	4,05	
Acometimento MO								0,127
Não	1375,25	1920,0	1126,26	1624,24	1,00			
Sim	1680,43	NA	1297,15	2063,72	0,41	0,13	1,34	
Acometimento SNC								0,939
Não	1446,07	1920,0	1213,48	1678,67	1,00			
Sim	855,50	NA	339,24	1371,76	1,08	0,15	7,88	
Nº Sítios extralinfonodais								0,004
< 2	1581,32	NA	1343,65	1818,99	1,00			
2 ou mais	471,57	NA	0,00	1008,26	3,68	1,42	9,53	
Performance Status								0,117
2 ou menos	1727,52	NA	1417,71	2037,33	1,00			
> 2	1385,64	1560,0	1066,21	1705,07	1,73	0,86	3,49	
Bulky								0,850
Ausente	1591,04	NA	1267,97	1914,11	1,00			
Presente	1503,56	NA	1199,14	1807,97	1,07	0,54	2,09	
Sintomas B								0,193
Ausente	1820,26	NA	1422,98	2217,54	1,00			
Presente	1370,47	1920,0	1111,81	1629,13	1,72	0,75	3,93	
Estádio Clínico								<0,001
I ou II	1992,20	NA	1709,20	2275,20	1,00			
III ou IV	1015,17	570,0	763,84	1266,50	3,89	1,76	8,60	
IPI								<0,001
Baixo/Intermediário-baixo	1976,93	NA	1703,42	2250,44	1,00			
Intermediário-Alto/Alto	998,83	570,0	735,00	1262,67	3,89	1,82	8,32	
DHL								0,010
Normal	2294,33	NA	1997,68	2590,99	1,00			
Alto	1324,41	1920,0	1085,91	1562,91	8,71	1,19	63,58	

Legenda: NA= não atingida

Pacientes com idade ≥ 60 anos ($n=41/98$) apresentaram menor SG ($p=0,010$), com HR 2,2 vezes maior de óbito em relação aos pacientes com idade inferior a 60 anos ($n=57/98$) (Figura 18). O tempo mediano de SG não foi atingido para pacientes < 60 anos e foi de 510 dias (aproximadamente 17 meses) para o grupo com idade ≥ 60 anos. A SG em cinco anos foi de 62% para pacientes com idade < 60 anos e de 45,5% para aqueles com idade ≥ 60 anos.

Figura 18 – Curva de SG em relação à idade.

Pacientes com número de sítios extralinfonodais ≥ 2 ($n=7/92$) apresentaram menor SG ($p=0,004$), com um HR 3,68 vezes maior quando comparados aos pacientes com número de sítios extralinfonodais < 2 ($n=85/92$).

(Figura 19). O tempo mediano de SG não foi atingido para ambos os grupos. Já a SG em cinco anos foi de 60% para os pacientes com menos de 2 sítios extralinfonodais e não foi atingido para o grupo com número de sítios extralinfonodais ≥ 2 .

Figura 19 – Curva de SG em relação ao número de sítios extralinfonodais.

Pacientes com estágio III ou IV ($n=54/94$) apresentaram diferença estatisticamente significativa para a SG ($p<0,001$), com HR 3,89 vezes maior de óbito quando comparados com estágio I ou II ($n=40/94$). (Figura 20). O tempo mediano de SG não foi atingido para pacientes com estágio I ou II e foi de 570 dias (aproximadamente 19 meses) para pacientes com estágio III ou IV. Além

disso, o tempo de SG em cinco anos foi de 82% para estágio I ou II e de 37% para estágio III e IV.

Figura 20 – Curva de SG em relação ao estágio clínico.

Pacientes com IPI Intermediário-Alto (IA) e Alto Risco (AR) ($n=49/93$) apresentaram diferença estatisticamente significante para SG ($p < 0,001$), com HR 1,82 vezes maior de óbito, quando comparados a pacientes com IPI Intermediário-Baixo (IB) e Baixo Risco (BR) ($n=44/93$). (Figura 21). O tempo mediano de SG não foi atingido para IPI IB e BR e foi de 570 dias (19 meses) para IPI IA e AR ($p < 0,001$). A SG em cinco anos foi de 39% para IA/AR e de 81% para IB e BR.

Figura 21 – Curva de SG em relação ao IPI.

Níveis de DHL elevados ($n=78/93$) foram associados com menor SG ($p=0,010$), com HR 8,71 vezes maior de óbito do que pacientes com níveis normais ($n=15/93$). (Figura 22). O tempo mediano de SG não foi atingido para pacientes com índices de DHL normal e foi de 1920 dias (64 meses) para pacientes com níveis de DHL elevado. A SG em cinco anos foi de 93% para o grupo com DHL normal e 52% para o grupo com níveis elevados da enzima.

Figura 22 – Curva de SG em relação ao nível de DHL.

As demais variáveis clínicas analisadas como sexo, acometimento de MO ou SNC, *performance status*, *bulky* e sintomas B não mostraram diferenças de SG (Tabela 17 e Figuras 23 a 28).

Figura 23 – Curva de SG em relação ao sexo.

Figura 24 – Curva de SG em relação ao acometimento de MO.

Figura 25 – Curva de SG em relação ao acometimento de SNC.

Figura 26 – Curva de SG em relação ao *performance status*.

Figura 27 – Curva de SG em relação à presença de *Bulky*.

Figura 28 – Curva de SG em relação à presença de sintomas B.

Em relação às análises de expressão gênica, 49,4% (n=38/77) dos pacientes apresentaram expressão de *OCT1* maior ou igual à mediana e 50,6% (n=39/77) abaixo da mediana. Pacientes com expressão $\geq$ à mediana apresentaram pior SG (p=0,010), com HR 2,45 vezes maior (Tabela 18 e Figura 29). O tempo mediano de SG não foi atingido para o grupo com expressão < que a mediana e foi de 840 dias (28 meses) para pacientes com expressão de *OCT1* $\geq$ à mediana. A SG em cinco anos foi de 69% e 30% para o primeiro e segundo grupo, respectivamente.

A expressão dos genes *BCL2* e *MDR1* não mostraram diferenças estatisticamente significantes em relação à SG (Tabela 18 e Figuras 30 e 31).

Figura 29 – Curva de SG em relação à expressão do gene *OCT1*.

Figura 30 – Curva de SG em relação à expressão do gene *BCL2*.

Figura 31 – Curva de SG em relação à expressão do gene *MDR1*.

Para a expressão das proteínas BCL-2, Pg-p e OCT-1 não foram observadas diferenças estatisticamente significantes para SG (Tabela 18 e Figuras 32 a 34).

Figura 32 – Curva de SG em relação à expressão da proteína BCL-2.

Figura 33 – Curva de SG em relação à expressão da proteína Pg-p.

Figura 34 – Curva de SG em relação à expressão da proteína OCT-1.

A tabela 18 evidencia a estimativa dos tempos medianos de SG em relação à expressão gênica e proteica.

Tabela 18 – Estimativa dos tempos medianos de Sobrevida Global dos pacientes em relação às variáveis de expressão gênica e proteica.

Variável	Tempo médio estimado (dias)	Tempo Mediano estimado (dias)	IC (95%)		HR	IC (95%)		p valor
			Inferior	Superior		Inferior	Superior	
Expressão <i>BCL2</i>								0,169
Negativo	1553,68	NA	1220,63	1886,73	1,00			
Positivo	1291,46	1605,0	1023,25	1559,66	2,25	0,69	7,35	
Expressão <i>BCL2</i>								0,068
Abaixo da mediana	1590,37	1920,0	1266,49	1914,26	1,00			
Maior ou igual a mediana	1029,32	510,0	728,39	1330,25	1,87	0,94	3,69	
Expressão <i>MDR1</i>								0,678
Negativo	1315,61	1560,0	1024,04	1607,17	1,00			
Positivo	1273,60	1920,0	902,20	1645,00	1,15	0,59	2,24	
Expressão <i>OCT1</i>								0,097
Negativo	1812,86	NA	1351,69	2274,03	1,00			
Positivo	1283,86	1605,0	1023,35	1544,36	4,63	0,63	33,90	
Expressão <i>OCT1</i>								0,010
Abaixo da mediana	1671,80	NA	1360,45	1983,15	1,00			
Maior ou igual a mediana	878,08	510,0	620,15	1136,01	2,45	1,21	4,96	
IHQ <i>BCL-2</i>								0,075
Negativo	1659,97	NA	1270,01	2049,94	1,00			
Positivo	1108,55	1590,0	844,50	1372,61	2,57	0,88	7,52	
IHQ <i>Pg-p</i>								0,539
Negativo	1308,29	NA	566,35	2050,23	1,00			
1+	844,22	60,0	247,03	1441,41	2,18	0,49	9,71	
2+	1218,19	1950,0	723,32	1713,06	1,36	0,34	5,43	
3+	1353,24	1560,0	1069,89	1636,59	1,02	0,26	4,00	
IHQ <i>Pg-p</i>								0,697
Negativo	1308,29	NA	566,35	2050,23	1,00			
Positivo	1238,49	1590,0	996,00	1480,99	1,29	0,36	4,58	
IHQ <i>OCT-1</i>								0,072
Negativo	1802,00	1920,0	1402,16	2201,84	1,00			
1+	597,33	420,0	40,27	1154,40	6,65	1,20	36,82	
2+	1570,00	NA	1028,30	2111,70	0,98	0,09	10,87	
3+	1214,37	1590,0	897,96	1530,78	2,97	0,69	12,81	
IHQ <i>OCT-1</i>								0,121
Negativo	1802,00	1935,0	1402,16	2201,84	1,00			
Positivo	1227,23	1590,0	947,65	1506,82	2,98	0,70	12,66	

Legenda: NA= não atingida

Os resultados obtidos a partir do modelo de regressão múltipla de Cox para SG mostraram que a idade ≥ 60 anos e o IPI IA ou AR foram variáveis independentes para SG e com maior risco de óbito ($p < 0,05$) (Tabela 19).

Tabela 19 – Resultado da análise de regressão múltipla de Cox para SG dos pacientes incluídos no estudo.

Variável	HR	IC (95%)		p valor
		Inferior	Superior	
Idade (≥ 60 anos)	2,53	1,31	4,89	0,006
IPI (Intermediário-Alto/Alto)	4,32	2,01	9,32	<0,001

5.5.2- Sobrevida Livre de Doença (SLD)

Apenas o acometimento do SNC apresentou diferença estatisticamente significativa para SLD (Figura 38). As demais variáveis clínicas e laboratoriais bem como a expressão gênica e proteica não evidenciaram diferenças significativas (Tabelas 20 e 21).

Tabela 20 – Estimativa dos tempos medianos de Sobrevida Livre de Doença em relação aos dados clínicos e laboratoriais.

Variável	Tempo médio estimado (dias)	Tempo mediano estimado (dias)	IC (95%)		HR	IC (95%)		p valor
			Inferior	Superior		Inferior	Superior	
Sexo								
Feminino	1522,02	NA	1348,58	1695,46	1,00			
Masculino	1911,48	NA	1666,83	2156,13	0,82	0,22	3,07	0,770
Idade								
< 60 anos	1907,29	NA	1706,62	2107,97	1,00			
≥ 60 anos	1726,37	NA	1443,17	2009,57	1,33	0,33	5,40	
Acometimento MO								0,645
Não	1909,98	NA	1722,67	2097,30	1,00			
Sim	1329,60	NA	1201,25	1457,95	1,45	0,30	6,96	
Acometimento SNC								0,050
Não	1912,58	NA	1740,98	2084,19	1,00			
Sim	443,50	NA	125,43	761,57	9,03	0,99	82,04	
Nº Sítios extralinfonodais								0,565
< 2	1876,14	NA	1694,28	2058,00	1,00			
≥ 2	1398,00	NA	1398,00	1398,00	#			
Performance Status								0,272
≤ 2	2050,99	NA	1874,66	2227,32	1,00			
> 2	1708,92	NA	1485,46	1932,39	2,43	0,47	12,54	
Bulky								0,734
Ausente	1924,55	NA	1690,70	2158,39	1,00			
Presente	1704,83	NA	1474,78	1934,89	1,26	0,34	4,68	
Sintomas B								0,508
Ausente	1960,42	NA	1674,54	2246,30	1,00			
Presente	1709,43	NA	1516,26	1902,60	1,69	0,35	8,17	
Estádio Clínico								0,133
I ou II	2013,84	NA	1831,77	2195,91	1,00			
III ou IV	1398,07	NA	1193,90	1602,24	2,77	0,69	11,12	
IPI								0,116
Baixo/Intermediário-baixo	2017,60	NA	1838,88	2196,31	1,00			
Intermediário-Alto/Alto	1400,83	NA	1196,05	1605,61	2,89	0,72	11,56	
DHL								0,123
Normal	2183,00	NA	2183,00	2183,00	1,00			
Alto	1679,43	NA	1493,69	1865,18	#			

Legenda: NA= não atingida.

Tabela 21 – Estimativa dos tempos medianos de Sobrevida Livre de Doença em relação aos dados de expressão gênica e proteica.

Variável	Tempo médio estimado (dias)	Tempo mediano estimado (dias)	IC (95%)		HR	IC (95%)		p valor
			Inferior	Superior		Inferior	Superior	
Expressão <i>BCL2</i>								0,920
Negativo	1425,98	NA	1102,63	1749,32	1,00			
Positivo	1822,85	NA	1583,74	2061,96	0,92	0,19	4,46	
Expressão <i>BCL2</i>								0,860
Abaixo da mediana	1824,53	NA	1543,73	2105,33	1,00			
Maior ou igual a mediana	1434,10	NA	1208,25	1659,95	1,13	0,30	4,21	
Expressão <i>MDR1</i>								0,336
Negativo	1518,39	NA	1372,66	1664,11	1,00			
Positivo	1726,93	NA	1377,04	2076,82	1,89	0,51	7,05	
Expressão <i>OCT1</i>								0,773
Negativo	1540,00	NA	1288,78	1791,22	1,00			
Positivo	1789,27	NA	1545,79	2032,75	1,36	0,17	10,92	
Expressão <i>OCT1</i>								0,717
Abaixo da mediana	1794,83	NA	1518,69	2070,98	1,00			
Maior ou igual a mediana	1334,63	NA	1188,43	1480,83	0,77	0,19	3,10	
IHQ <i>BCL-2</i>								0,614
Negativo	1493,04	NA	1274,11	1711,97	1,00			
Positivo	1376,01	NA	1153,30	1598,72	1,51	0,30	7,48	
IHQ <i>Pg-p</i>								0,551
Negativo	1529,50	NA	1284,22	1774,78	1,00			
1+	1597,00	NA	1597,00	1597,00	#			
2+	1386,00	NA	1213,61	1558,39	0,69	0,04	11,09	
3+	1293,46	NA	1031,36	1555,55	1,85	0,22	15,73	
IHQ <i>Pg-p</i>								0,804
Negativo	1529,50	NA	1284,22	1774,78	1,00			
Positivo	1410,42	NA	1224,41	1596,44	1,31	0,16	10,85	
IHQ <i>OCT-1</i>								0,860
Negativo	1520,80	NA	1211,91	1829,69	1,00			
1+	911,00	NA	280,47	1541,53	3,30	0,21	52,98	
2+	1365,80	NA	841,28	1890,32	1,71	0,11	27,30	
3+	1394,43	NA	1187,25	1601,61	1,81	0,21	15,57	
IHQ <i>OCT-1</i>								0,535
Negativo	1520,80	NA	1211,91	1829,69	1,00			
Positivo	1374,35	NA	1180,72	1567,98	1,92	0,24	15,63	

Legenda: NA= não atingida.

As figuras 35 a 51 correspondem aos gráficos de SLD para dados clínicos e laboratoriais e dados de expressão gênica e proteica dos pacientes estudados.

Figura 35 – Curva de SLD em relação ao sexo.

Figura 36 – Curva de SLD em relação à idade.

Figura 37 – Curva de SLD em relação ao acometimento da MO.

Figura 38 – Curva de SLD em relação ao acometimento do SNC.

Figura 39 – Curva de SLD em relação ao número de sítios extralinfonodais.

Figura 40 – Curva de SLD em relação ao *performance status*.

Figura 41 – Curva de SLD em relação à presença de *Bulky*.

Figura 42 – Curva de SLD em relação à presença de sintomas B.

Figura 43 – Curva de SLD em relação ao estágio clínico.

Figura 44 – Curva de SLD em relação ao IPI.

Figura 45 – Curva de SLD em relação aos níveis de DHL.

Figura 46 – Curva de SLD em relação à expressão do gene *BCL2*.

Figura 47 – Curva de SLD em relação à expressão do gene *MDR1*.

Figura 48 – Curva de SLD em relação à expressão do gene *OCT1*.

Figura 49 – Curva de SLD em relação à expressão da proteína BCL-2.

Figura 50 – Curva de SLD em relação à expressão da proteína Pg-p.

Figura 51 – Curva de SLD em relação à expressão da proteína OCT-1.

5.5.3- Sobrevida Livre de Progressão (SLP)

Assim como para a SG, as análises de SLP para as variáveis clínicas e laboratoriais mostraram diferenças estatisticamente significativas para idade, número de sítios extralinfonodais, estágio, IPI e níveis de DHL. As demais variáveis clínicas não mostraram diferenças de SLP significativas (Tabela 22).

Tabela 22 – Estimativa dos tempos medianos de Sobrevida Livre de Progressão em relação aos dados clínicos e laboratoriais.

Variável	Tempo médio estimado (dias)	Tempo mediano estimado (dias)	IC (95%)		HR	IC (95%)		Progressão	Total N	%	p valor
			Inferior	Superior		Inferior	Superior				
Sexo											0,935
Feminino	1255,36	NA	986,11	1524,62	1,00			21	49	42,9	
Masculino	1398,26	1950,0	1074,84	1721,68	1,03	0,56	1,87	22	49	44,9	
Idade											0,011
< 60 anos	1666,65	NA	1388,90	1944,40	1,00			20	57	35,1	
≥ 60 anos	1036,20	525,0	699,76	1372,64	2,14	1,17	3,92	23	41	56,1	
Acometimento MO											0,292
Não	1365,13	1950,0	1114,04	1616,22	1,00			39	85	45,9	
Sim	1349,35	1410,0	1031,54	1667,16	0,58	0,21	1,62	4	13	30,8	
Acometimento SNC											0,961
Não	1409,46	1950,0	1173,30	1645,62	1,00			42	96	43,8	
Sim	847,00	450,0	318,96	1375,04	1,05	0,14	7,66	1	2	50,0	
Nº de Sítios extralinfonodais											0,005
< 2	1540,91	1950,0	1298,36	1783,45	1,00			33	85	38,8	
≥ 2	471,57	30,0	0,00	1008,26	3,58	1,38	9,26	5	7	71,4	
Performance Status											0,075
≤ 2	1718,64	NA	1405,63	2031,65	1,00			12	40	30,0	
> 2	1322,85	1440,0	1000,47	1645,23	1,86	0,93	3,71	24	50	48,0	
Bulky											0,983
Ausente	1518,65	1950,0	1187,44	1849,87	1,00			18	46	39,1	
Presente	1494,27	NA	1185,50	1803,05	0,99	0,51	1,93	17	44	38,6	
Sintomas B											0,135
Ausente	1820,59	NA	1423,11	2218,07	1,00			7	26	26,9	
Presente	1308,37	1920,0	1043,03	1573,71	1,86	0,81	4,24	30	66	45,5	
Estádio Clínico											<0,001
I ou II	1982,33	NA	1694,29	2270,36	1,00			8	40	20,0	
III ou IV	921,90	525,0	686,98	1156,82	4,40	1,93	10,05	31	54	57,4	
IPI											<0,001
Intermediário-baixo/Baixo	1961,86	NA	1680,31	2243,41	1,00			9	44	20,5	
Intermediário-Alto/Alto	908,20	615,0	662,76	1153,64	4,36	1,99	9,56	29	49	59,2	
DHL											0,008
Normal	2293,33	NA	1994,79	2591,88	1,00			1	15	6,7	
Alto	1279,11	1440,0	1036,72	1521,50	9,12	1,25	66,52	37	78	47,4	

Legenda: NA= não atingida.

Pacientes com idade ≥ 60 anos ($n=41/98$) apresentaram diferença de SLP estatisticamente significativa ($p=0,011$), com um HR 2,14 vezes maior de progressão em relação aos pacientes com idade inferior a 60 anos ($n=57/98$) (Figura 52). O tempo mediano de SLP não atingido para pacientes com idade < 60 anos e foi de 480 dias (16 meses) para aqueles com idade ≥ 60 anos. A SLP de 5 anos foi de 61% e 47% para os pacientes com idade <60 anos e ≥ 60 anos, respectivamente.

Figura 52 – Curva de SLP em relação à idade.

Pacientes com número de sítios extralinfonodais ≥ 2 ($n=7/92$) apresentaram diferença de SLP estatisticamente significativa ($p=0,005$), com HR 3,58 vezes maior de progressão em relação aos pacientes com menor

número de sítios extralinfonodais ($n=85/92$). (Figura 53). O tempo mediano de SLP foi de 1920 dias (64 meses) para pacientes com número de sítios extralinfonodais < 2 e não foi atingido para pacientes com número de sítios extralinfonodais ≥ 2 . A SLP de 5 anos foi de 49% para pacientes com menos de 2 sítios extralinfonodais e não foi atingida para pacientes com dois ou mais sítios.

Figura 53 – Curva de SLP em relação ao número de sítios extralinfonodais.

Pacientes com estágio III ou IV ($n=54/94$) apresentaram diferença de SLP estatisticamente significativa ($p<0,001$), com HR 1,93 vezes maior de progressão em relação aos pacientes com estágio I ou II ($n=40/94$). (Figura 54). O tempo mediano de SLP não foi atingido para pacientes com estágio I ou

II e foi de 570 dias (19 meses) para estádios III ou IV. Já a SLP em 5 anos foi de 82% para estágio I e II e de 35% para estágio III e IV.

Figura 54 – Curva de SLP em relação ao estágio clínico.

Pacientes com IPI IA ou AR (n=49/93) apresentaram diferença de SLP estatisticamente significante ($p<0,001$), com HR 1,99 vezes maior de progressão em relação aos pacientes com IPI BR e IB (n=44/93) (Figura 55). O tempo mediano de SLP não foi atingido para pacientes com IPI IB e BR e foi de 570 dias (19 meses) para pacientes com IPI IA e AR. A SLP em 5 anos foi de 81% para o grupo com IPI IB e BR e de 35% para o grupo com IPI IA e AR.

Figura 55 – Curva de SLP em relação ao IPI.

Pacientes com níveis de DHL elevados ($n=78/93$) apresentaram diferença de SLP estatisticamente significante ($p=0,008$), com HR 1,25 vezes maior de progressão em relação aos pacientes com níveis normais de DHL ($n=39/77$) (Figura 56). O tempo mediano de SLP não foi atingido para pacientes com DHL normal e foi de 1920 dias (64 meses) para pacientes com DHL elevado. A SLP em 5 anos foi de 94% para pacientes com níveis normais de DHL e de 50% para pacientes com níveis elevados.

Figura 56 – Curva de SLP em relação aos níveis de DHL.

As demais variáveis clínicas analisadas (sexo, acometimento de MO, acometimento de SNC, *performance status*, presença de *bulky* e sintomas B) não mostraram diferenças de SLP significativas (Figuras 57 a 62).

Figura 57 – Curva de SLP em relação ao sexo.

Figura 58 – Curva de SLP em relação ao acometimento da MO.

Figura 59 – Curva de SLP em relação ao acometimento do SNC.

Figura 60 – Curva de SLP em relação ao *performance status*.

Figura 61 – Curva de SLP em relação à presença de *bulky*.

Figura 62 – Curva de SLP em relação à presença de sintomas B.

Em relação às análises de SLP para expressão gênica (Tabela 23), 48% (n=37/77) apresentaram expressão de *BCL2* abaixo da mediana e 52,0% (n=40/77) $\geq$ à mediana. Estes pacientes apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados à pacientes que apresentaram expressão abaixo da mediana ($p=0,040$), com risco de progressão 1,02 vezes mais elevado (Figura 63). O tempo mediano de SLP foi de 1890 dias (63 meses) para pacientes com expressão $<$ que a mediana e de 1350 dias (45 meses) para pacientes com expressão $\geq$ à mediana. A SLP em 5 anos foi de 64% para pacientes com expressão de *BCL2* $<$ que a mediana e de 38% para pacientes com expressão $\geq$ à mediana.

A expressão do gene *MDR1* não mostrou diferença estatisticamente significativa em relação à SLP (Figura 64).

Em relação à expressão de *OCT1*, 50,6% (n=39/77) dos pacientes apresentaram expressão $<$ que a mediana e 49,4% (n=38/77) $\geq$ à mediana. Foi observada diferença estatisticamente significativa em relação à expressão de *OCT-1* ($p=0,016$), pois a expressão $\geq$ à mediana correlacionou-se com risco 1,14 vezes maior de progressão quando comparado a pacientes com expressão $<$ que a mediana (Figura 64). O tempo mediano de SLP foi de 1950 dias (65 meses) para pacientes com expressão de *OCT1* $<$ que a mediana e de 510 dias (17 meses) para pacientes com expressão $\geq$ à mediana. A SLP em 5 anos foi de 63% para pacientes com expressão $<$ que a mediana e de apenas 37% para pacientes com expressão $\geq$ à mediana.

Tabela 23 – Estimativa dos tempos medianos de Sobrevida Livre de Progressão em relação aos dados de expressão gênica e proteica.

Variável	Tempo médio estimado (dias)	Tempo mediano estimado (dias)	IC (95%)		HR	IC (95%)		Progressão	Total N	%	p valor
			Inferior	Superior		Inferior	Superior				
Expressão <i>BCL2</i>											
Negativo	1515,68	NA	1138,51	1892,85	1,00			3	11	27,3	0,155
Positivo	1243,71	1440,0	973,53	1513,90	2,30	0,70	7,52	33	66	50,0	
Expressão <i>BCL2</i>											
Abaixo da mediana	1574,43	1920,0	1244,51	1904,35	1,00			14	38	36,8	0,040
Maior ou igual a mediana	944,87	480,0	665,51	1224,23	2,02	1,02	4,02	22	39	56,4	
Expressão <i>MDR1</i>											
Negativo	1276,50	1440,0	985,34	1567,67	1,00			20	44	45,5	0,827
Positivo	1251,48	1920,0	873,73	1629,22	1,08	0,56	2,08	16	33	48,5	
Expressão <i>OCT1</i>											
Negativo	1523,57	NA	1051,44	1995,70	1,00			2	7	28,6	0,280
Positivo	1275,34	1440,0	1012,10	1538,57	2,16	0,52	9,00	34	70	48,6	
Expressão <i>OCT1</i>											
Abaixo da mediana	1596,54	1920,0	1274,55	1918,53	1,00			14	39	35,9	0,016
Maior ou igual a mediana	860,12	510,0	596,80	1123,45	2,27	1,14	4,51	22	38	57,9	
IHQ <i>BCL-2</i>											
Negativo	1557,39	1920,0	1165,34	1949,43	1,00			6	18	33,3	0,136
Positivo	1091,45	1440,0	821,31	1361,59	2,07	0,78	5,53	20	40	50,0	
IHQ <i>Pg-p</i>											
Negativo	1196,00	1380,0	498,84	1893,16	1,00			4	7	57,1	0,582
1+	840,78	60,0	241,62	1439,94	1,57	0,41	6,04	5	9	55,6	
2+	1210,59	1890,0	711,14	1710,05	0,96	0,28	3,29	7	15	46,7	
3+	1334,13	NA	1036,77	1631,48	0,74	0,22	2,45	10	26	38,5	
IHQ <i>Pg-p</i>											
Negativo	1196,00	1395,0	498,84	1893,16	1,00			4	7	57,1	0,881
Positivo	1224,03	1935,0	976,68	1471,38	0,92	0,31	2,74	22	50	44,0	
IHQ <i>OCT-1</i>											
Negativo	1802,00	1920,0	1402,16	2201,84	1,00			2	9	22,2	0,072
1+	582,67	30,0	22,09	1143,24	6,72	1,21	37,41	4	6	66,7	
2+	1570,00	NA	1028,30	2111,70	1,10	0,10	12,23	1	5	20,0	
3+	1161,94	1380,0	846,09	1477,79	3,47	0,80	15,05	19	37	51,4	
IHQ <i>OCT-1</i>											
Negativo	1802,00	1950,0	1402,16	2201,84	1,00			2	9	22,2	0,078
Positivo	1184,69	1380,0	904,64	1464,75	3,43	0,80	14,67	24	48	50,0	

Legenda: NA= não atingida

Figura 63 – Curva de SLP em relação à expressão do gene *BCL2*.

Figura 64 – Curva de SLP em relação à expressão do gene *MDR1*.

Figura 65 – Curva de SLP em relação à expressão do gene *OCT1*.

Em relação à expressão proteica, nenhuma das proteínas estudadas apresentou diferença estatisticamente significativa em relação à SLP (tabela 23 e figuras 66 a 68).

Figura 66 – Curva de SLP em relação à expressão proteica de BCL-2.

Figura 67 – Curva de SLP em relação à expressão proteica de Pg-p.

Figura 68 – Curva de SLP em relação à expressão proteica de OCT-1.

A análise multivariada para SLP (Tabela 24) evidenciou que idade ≥ 60 anos associou-se a risco de progressão 2,13 vezes maior em relação à idade <60 anos ($p=0,040$). Pacientes com estágio III ou IV apresentaram risco de progressão 4,47 vezes maior que com estágios I ou II ($p=0,001$). O mesmo ocorreu para a expressão do gene *OCT1* igual ou superior a mediana, que apresentou risco 2,22 vezes maior de progressão quando comparada com expressão de *OCT1* abaixo da mediana ($p=0,035$).

Tabela 24 – Resultado do modelo de regressão múltipla de Cox para Sobrevida Livre de Progressão.

Variável	HR	IC (95%)		p valor
		Inferior	Superior	
Idade (≥ 60)	2,13	1,04	4,38	0,040
Estádio(III ou IV)	4,47	1,82	10,96	0,001
Expressão <i>OCT1</i> ($\geq$ à mediana)	2,22	1,06	4,67	0,035

5.5.4- Análises de sobrevida dos subgrupos

Após análise de sobrevida para os fatores clínicos, laboratoriais e de expressão gênica e proteica de forma individual, a amostra foi estratificada em três subgrupos por estágio, IPI e idade. Foram realizadas análises de SG e SLP dos três subgrupos em relação à expressão gênica e proteica.

As tabelas 25 e 26 mostram que, quando os pacientes foram estratificados de acordo com o estadiamento, as expressões gênicas e proteicas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para SG e SLP.

Tabela 25 – Sobrevida Global para as categorias de expressão gênica e proteica estratificadas pelo estadiamento.

Variável	Estádio I ou II					Estádio III ou IV				
	HR (IC 95%)	Óbito	n total	%	p valor	HR (IC 95%)	Óbito	n total	%	p valor
Expressão BCL2					0,481					0,422
Negativo	1,00	0	5	0,0		1,00	3	6	50,0	
Positivo	26,95	7	27	25,9		1,64	22	36	61,1	
Expressão BCL2					0,537					0,235
< mediana	1,00	4	19	21,1		1,00	8	17	47,1	
≥ mediana	1,66	3	13	23,1		1,68	17	25	68,0	
Expressão MDR1					0,192					0,705
Negativo	1,00	2	17	11,8		1,00	14	24	58,3	
Positivo	2,98	5	15	33,3		1,17	11	18	61,1	
Expressão OCT1					0,531					0,364
Negativo	1,00	0	4	0,0		1,00	1	3	33,3	
Positivo	25,26	7	28	25,0		2,53	24	39	61,5	
Expressão OCT1					0,086					0,054
< mediana	1,00	2	17	11,8		1,00	9	20	45,0	
≥ mediana	6,57	5	15	33,3		2,24	16	22	72,7	
IHQ BCL-2					0,450					0,207
Negativo	1,00	1	8	12,5		1,00	3	9	33,3	
Positivo	42,52	3	14	21,4		2,22	16	25	64,0	
IHQ Pg-p					0,516					0,705
Negativo	1,00	0	2	0,0		1,00	2	4	50,0	
Positivo	42,45	4	20	20,0		1,33	17	29	58,6	
IHQ OCT-1					0,937					0,078
Negativo	1,00	1	3	33,3		1,00	1	6	16,7	
Positivo	0,91	3	19	15,8		6,15	18	27	66,7	

Tabela 26 – Sobrevida Livre de Progressão para as categorias de expressão gênica e proteica estratificadas pelo estadiamento.

Variável	Estádio I ou II					Estádio III ou IV				
	HR (IC 95%)	Progressão	n total	%	p valor	HR (IC 95%)	Progressão	n total	%	p valor
Expressão BCL2					0,481					0,411
Negativo	1,00	0	5	0,0		1,00	3	6	50,0	
Positivo	26,95	7	27	25,9		1,66	23	36	63,9	
Expressão BCL2					0,537					0,221
< mediana	1,00	4	19	21,1		1,00	8	17	47,1	
≥ mediana	1,66	3	13	23,1		1,70	18	25	72,0	
Expressão MDR1					0,183					0,981
Negativo	1,00	2	17	11,8		1,00	15	24	62,5	
Positivo	3,06	5	15	33,3		1,01	11	18	61,1	
Expressão OCT1					0,531					0,893
Negativo	1,00	0	4	0,0		1,00	2	3	66,7	
Positivo	25,26	7	28	25,0		1,10	24	39	61,5	
Expressão OCT1					0,081					0,084
< mediana	1,00	2	17	11,8		1,00	10	20	50,0	
≥ mediana	6,76	5	15	33,3		2,02	16	22	72,7	
IHQ BCL-2					0,450					0,384
Negativo	1,00	1	8	12,5		1,00	4	9	44,4	
Positivo	42,52	3	14	21,4		1,63	16	25	64,0	
IHQ Pg-p					0,516					0,913
Negativo	1,00	0	2	0,0		1,00	3	4	75,0	
Positivo	42,45	4	20	20,0		0,93	17	29	58,6	
IHQ OCT-1					0,937					0,059
Negativo	1,00	1	3	33,3		1,00	1	6	16,7	
Positivo	0,91	3	19	15,8		6,97	19	27	70,4	

As figuras 69 a 80 representam os gráficos de SG e SLP para os pacientes estratificados pelo estadiamento.

Figura 69 – Curvas de SG em relação à expressão do gene *BCL2* para os subgrupos de estágio.

Figura 70 – Curvas de SG em relação à expressão do gene *MDR1* para os subgrupos de estágio.

Figura 71 – Curvas de SG em relação à expressão do gene *OCT1* para os subgrupos de estágio.

Figura 72 – Curvas de SG em relação à expressão da proteína BCL-2 para os subgrupos de estágio.

Figura 73 – Curvas de SG em relação à expressão da proteína Pg-p para os subgrupos de estágio.

Figura 74 – Curvas de SG em relação à expressão da proteína OCT-1 para os subgrupos de estágio.

Figura 75 – Curvas de SLP em relação à expressão do gene *BCL2* para os subgrupos de estágio.

Figura 76 – Curvas de SLP em relação à expressão do gene *MDR1* para os subgrupos de estágio.

Figura 77 – Curvas de SLP em relação à expressão do gene *OCT1* para os subgrupos de estágio.

Figura 78 – Curvas de SLP em relação à expressão da proteína BCL-2 para os subgrupos de estágio.

Figura 79 – Curvas de SLP em relação à expressão da proteína Pg-p para os subgrupos de estágio.

Figura 80 – Curvas de SLP em relação à expressão da proteína OCT-1 para os subgrupos de estágio.

As tabelas 27 e 28 mostram que na estratificação pelo IPI, apenas a expressão do gene *OCT1* $\geq$ à mediana apresentou diferença estatisticamente significativa para SG em pacientes com IPI IA e AR ($p=0,048$). As expressões

dos demais genes e proteínas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em nenhum subgrupo para SG e SLP.

Tabela 27 – Sobrevida Global para as categorias de expressão gênica e proteica estratificadas pelo IPI

Variável	IPI baixo ou intermediário-baixo					IPI intermediário-alto ou alto				
	HR	Óbito	n total	%	p valor	HR	Óbito	n total	%	p valor
	IC (95%)					IC (95%)				
Expressão BCL2					0,472					0,274
Negativo	1,00	0	5	0,0		1,00	3	6	50,0	
Positivo	26,08	8	31	25,8		1,97	21	32	65,6	
Expressão BCL2					0,232					0,093
< mediana	1,00	3	18	16,7		1,00	9	18	50,0	
≥ mediana	2,72	5	18	27,8		2,06	15	20	75,0	
Expressão MDR1					0,125					0,616
Negativo	1,00	2	18	11,1		1,00	14	23	60,9	
Positivo	3,51	6	18	33,3		1,23	10	15	66,7	
Expressão OCT1					0,582					0,148
Negativo	1,00	0	3	0,0		1,00	1	4	25,0	
Positivo	23,33	8	33	24,2		4,42	23	34	67,6	
Expressão OCT1					0,062					0,048
< mediana	1,00	2	19	10,5		1,00	9	18	50,0	
≥ mediana	7,53	6	17	35,3		2,32	15	20	75,0	
IHQ BCL-2					0,311					0,314
Negativo	1,00	1	9	11,1		1,00	3	8	37,5	
Positivo	38,82	6	19	31,6		1,91	13	20	65,0	
IHQ Pg-p					0,471					0,583
Negativo	1,00	0	2	0,0		1,00	2	4	50,0	
Positivo	37,04	7	26	26,9		1,52	14	23	60,9	
IHQ OCT-1					0,649					0,114
Negativo	1,00	1	4	25,0		1,00	1	5	20,0	
Positivo	1,67	6	24	25,0		5,15	15	22	68,2	

Tabela 28 – Sobrevida Livre de Progressão para as categorias de expressão gênica e proteica estratificadas pelo IPI.

Variável	IPI baixo ou intermediário-baixo					IPI intermediário-alto ou alto				
	HR	Progressão	n total	%	p valor	HR	Progressão	n total	%	p valor
	IC (95%)					IC (95%)				
Expressão BCL2					0,473					0,265
Negativo	1,00	0	5	0,0		1,00	3	6	50,0	
Positivo	26,04	8	31	25,8		1,99	22	32	68,8	
Expressão BCL2					0,228					0,089
< mediana	1,00	3	18	16,7		1,00	9	18	50,0	
≥ mediana	2,74	5	18	27,8		2,06	16	20	80,0	
Expressão MDR1					0,133					0,759
Negativo	1,00	2	18	11,1		1,00	15	23	65,2	
Positivo	3,42	6	18	33,3		1,13	10	15	66,7	
Expressão OCT1					0,583					0,317
Negativo	1,00	0	3	0,0		1,00	2	4	50,0	
Positivo	23,31	8	33	24,2		2,10	23	34	67,6	
Expressão OCT1					0,058					0,102
< mediana	1,00	2	19	10,5		1,00	10	18	55,6	
≥ mediana	7,74	6	17	35,3		1,96	15	20	75,0	
IHQ BCL-2					0,308					0,646
Negativo	1,00	1	9	11,1		1,00	4	8	50,0	
Positivo	39,24	6	19	31,6		1,31	13	20	65,0	
IHQ Pg-p					0,472					0,912
Negativo	1,00	0	2	0,0		1,00	3	4	75,0	
Positivo	37,08	7	26	26,9		1,07	14	23	60,9	
IHQ OCT-1					0,653					0,083
Negativo	1,00	1	4	25,0		1,00	1	5	20,0	
Positivo	1,66	6	24	25,0		6,02	16	22	72,7	

As figuras 81 a 92 representam os gráficos de SG e SLP para os pacientes estratificados pelo IPI.

Figura 81 – Curvas de SG em relação à expressão do gene *BCL2* para os subgrupos de IPI.

Figura 82 – Curvas de SG em relação à expressão do gene *MDR1* para os subgrupos de IPI.

Figura 83 – Curvas de SG em relação à expressão do gene *OCT1* para os subgrupos de IPI.

Figura 84 – Curvas de SG em relação à expressão da proteína BCL-2 para os subgrupos de IPI.

Figura 85 – Curvas de SG em relação à expressão da proteína Pg-p para os subgrupos de IPI.

Figura 86 – Curvas de SG em relação à expressão da proteína OCT-1 para os subgrupos de IPI.

Figura 87 – Curvas de SLP em relação à expressão do gene *BCL2* para os subgrupos de IPI.

Figura 88 – Curvas de SLP em relação à expressão do gene *MDR1* para os subgrupos de IPI.

Figura 89 – Curvas de SLP em relação à expressão do gene *OCT1* para os subgrupos de IPI.

Figura 90 – Curvas de SLP em relação à expressão da proteína BCL-2 para os subgrupos de IPI.

Figura 91 – Curvas de SLP em relação à expressão da proteína Pg-p para os subgrupos de IPI.

Figura 92 – Curvas de SLP em relação à expressão da proteína OCT-1 para os subgrupos de IPI.

As tabelas 29 e 30 mostram que, para pacientes com idade ≥ 60 anos, a expressão do gene *OCT-1* igual ou maior que a mediana, aumentou de forma estatisticamente significativa o risco de óbito e de progressão de doença

($p=0,025$ e $p=0,025$, respectivamente). As expressões dos demais genes e proteínas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em nenhum subgrupo para SG e SLP.

Tabela 29 – Sobrevida Global para as categorias de expressão gênica e proteica estratificadas pela idade

Variável	Idade < 60 anos					Idade ≥ 60 anos				
	HR IC (95%)	Óbito	n total	%	p valor	HR IC (95%)	Óbito	n total	%	p valor
Expressão BCL2					0,344					0,663
Negativo	1,00	2	9	22,2		1,00	1	2	50,0	
Positivo	2,05	14	37	37,8		1,57	18	29	62,1	
Expressão BCL2					0,481					0,142
< mediana	1,00	8	26	30,8		1,00	6	12	50,0	
≥ mediana	1,42	8	20	40,0		2,17	13	19	68,4	
Expressão MDR1					0,616					0,794
Negativo	1,00	11	29	37,9		1,00	8	15	53,3	
Positivo	0,76	5	17	29,4		1,13	11	16	68,8	
Expressão OCT1					0,301					0,696
Negativo	1,00	0	5	0,0		1,00	1	2	50,0	
Positivo	25,90	16	41	39,0		1,50	18	29	62,1	
Expressão OCT1					0,599					0,025
< mediana	1,00	9	28	32,1		1,00	4	11	36,4	
≥ mediana	1,31	7	18	38,9		4,15	15	20	75,0	
IHQ BCL-2					0,617					0,113
Negativo	1,00	3	12	25,0		1,00	2	6	33,3	
Positivo	1,40	8	23	34,8		5,21	12	17	70,6	
IHQ Pg-p					0,981					0,103
Negativo	1,00	2	6	33,3		1,00	1	1	100,0	
Positivo	0,98	9	29	31,0		0,15	13	21	61,9	
IHQ OCT-1					0,331					0,371
Negativo	1,00	1	7	14,3		1,00	1	2	50,0	
Positivo	2,78	10	28	35,7		25,27	13	20	65,0	

Tabela 30 – Sobrevida Livre de Progressão para as categorias de expressão gênica e proteica estratificadas pela idade

Variável	Idade < 60 anos					Idade ≥ 60 anos				
	HR IC (95%)	Progressão	n total	%	p valor	HR IC (95%)	Progressão	n total	%	p valor
Expressão BCL2					0,312					0,641
Negativo	1,00	2	9	22,2		1,00	1	2	50,0	
Positivo	2,14	15	37	40,5		1,62	18	29	62,1	
Expressão BCL2					0,390					0,123
< mediana	1,00	8	26	30,8		1,00	6	12	50,0	
≥ mediana	1,52	9	20	45,0		2,26	13	19	68,4	
Expressão MDR1					0,469					0,851
Negativo	1,00	12	29	41,4		1,00	8	15	53,3	
Positivo	0,68	5	17	29,4		1,09	11	16	68,8	
Expressão OCT1					0,348					0,735
Negativo	1,00	1	5	20,0		1,00	1	2	50,0	
Positivo	2,64	16	41	39,0		1,42	18	29	62,1	
Expressão OCT1					0,813					0,025
< mediana	1,00	10	28	35,7		1,00	4	11	36,4	
≥ mediana	1,12	7	18	38,9		4,17	15	20	75,0	
IHQ BCL-2					0,959					0,099
Negativo	1,00	4	12	33,3		1,00	2	6	33,3	
Positivo	1,03	8	23	34,8		5,57	12	17	70,6	
IHQ Pg-p					0,572					0,103
Negativo	1,00	3	6	50,0		1,00	1	1	100,0	
Positivo	0,68	9	29	31,0		0,15	13	21	61,9	
IHQ OCT-1					0,252					0,360
Negativo	1,00	1	7	14,3		1,00	1	2	50,0	
Positivo	3,31	11	28	39,3		25,68	13	20	65,0	

As figuras 93 a 104 representam os gráficos de SG e SLP para os pacientes estratificados pela idade.

Figura 93 – Curvas de SG em relação à expressão do gene *BCL2* para os subgrupos de idade.

Figura 94 – Curvas de SG em relação à expressão do gene *MDR1* para os subgrupos de idade.

Figura 95 – Curvas de SG em relação à expressão do gene *OCT1* para os subgrupos de idade.

Figura 96 – Curvas de SG em relação à expressão da proteína BCL-2 para os subgrupos de idade.

Figura 97 – Curvas de SG em relação à expressão da proteína Pg-p para os subgrupos de idade.

Figura 98 – Curvas de SG em relação à expressão da proteína OCT-1 para os subgrupos de idade.

Figura 99 – Curvas de SLP em relação à expressão do gene *BCL2* para os subgrupos de idade.

Figura 100 – Curvas de SLP em relação à expressão do gene *MDR1* para os subgrupos de idade.

Figura 101 – Curvas de SLP em relação à expressão do gene *OCT1* para os subgrupos de idade.

Figura102 – Curvas de SLP em relação à expressão da proteína BCL-2 para os subgrupos de idade.

Figura 103 – Curvas de SLP em relação à expressão da proteína Pg-p para os subgrupos de idade.

Figura 104 – Curvas de SLP em relação à expressão da proteína OCT-1 para os subgrupos de idade.

5.6- Avaliação da t(14;18)

Dos 77 blocos de parafina selecionados para o estudo, foi possível realizar a extração de DNA de apenas 67 blocos. Os demais (n=10) não apresentaram material suficiente para realização dos cortes para extração de DNA.

Das 67 amostras de DNA extraídas, apenas 8,95% (n=6/67) foram positivas para a translocação t(14;18) (figura 105).

Figura 105 – Resultado da reação de Nested-PCR para t(14;18).

Legenda: 1) marcador de 100pb, 2 a 7) amostras negativas, 8) amostra positiva, 9) controle negativo.

DISCUSSÃO

6 – Discussão

6.1- Revisão dos prontuários

A partir de 2002, vários estudos descreveram melhora significativa na sobrevida de pacientes com LDGCB após adição de rituximabe aos regimes de quimioterapia (Shen et al., 2005; Feugier et al., 2005; Habermann et al., 2006; Pfreundschuch et al., 2006; Colleoni e Inaoka, 2007; Fu et al., 2008, Illidge e Tolan, 2008; Coiffier et al., 2010; Horvat et al., 2010). Estes resultados levaram à introdução deste fármaco como tratamento padrão de primeira linha para pacientes com LDGCB em associação com poliquimioterapia à base de antraciclina (Gregoric et al., 2012).

Entretanto, apesar do incremento substancial obtido na sobrevida, muitos pacientes permanecem incuráveis, o que demonstra a relevância e a necessidade de mais estudos para avaliação de fatores de prognósticos. Um sistema de prognóstico bem validado e preciso permite ao clínico estratificar de forma rápida e segura, pacientes com prognósticos distintos, contribuindo de forma concreta para a individualização terapêutica (Huang et al., 2002).

Apesar da incidência e importância do LDGCB, que em nossa instituição corresponde a 49,5% de todos os LNH (Gouveia et al., 2011a), há poucas publicações com dados epidemiológicos para a população brasileira (Hallack Neto et al., 2006; Mota, 2006; Hallack Neto, 2007; Marcelino, 2009; Xavier, 2013).

Nossos dados evidenciaram que o IPI intermediário-alto e/ou alto risco, bem como as variáveis que o compõem (idade, número de sítios extralinfonodais, estágio clínico e níveis de DHL), foram associados à pior SG e SLP em pacientes com LDGCB tratados com R-CHOP. Porém, em relação à SLD, apenas pacientes com acometimento de SNC apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao prognóstico.

Embora a literatura internacional (Shahi e Manga, 2006; WHO, 2008; Hunt e Reicherdt, 2008) descreva que a idade mediana dos pacientes com LDGCB seja de 70 anos, com leve predomínio no sexo masculino (55%), em nossa população, a idade mediana dos pacientes foi de 54,5 anos, com igual incidência em indivíduos do sexo masculino e feminino (50%). Medianas de idade semelhantes foram descritas por outros estudos brasileiros: 54,5 anos no estudo de Mota, 2006 e 59,4 anos no estudo de Xavier, 2013. Isso reforça a importância de estudos nacionais para a correta caracterização populacional desta doença.

De acordo com a Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica (2016), a incidência elevada em pacientes em idade produtiva como adultos jovens tem causado transtorno sócioeconômico, resultando em diminuição da produtividade neste grupo.

O acometimento da medula óssea ocorreu em 13,3% da nossa casuística, o que corrobora os dados da literatura, onde a porcentagem de envolvimento da medula óssea varia de 11% a 27% (Mota, 2006; Hallack Neto, 2007; WHO, 2008; Hunt e Reicherdt, 2008). O mesmo foi observado em relação ao acometimento de SNC. Nós encontramos prevalência de 2%, enquanto Mota, 2006, observou taxa de 4,4%.

A presença de *bulky* em nossa população (48,9%) foi superior à descrita em outros estudos brasileiros (Marcelino, 2009: 32,2% e Xavier, 2013: 28,6%). O estudo que mais se aproxima dos nossos resultados é o de Hallack Neto et al., 2006, que observaram *bulky* em 55% dos casos avaliados. O mesmo foi encontrado para os sintomas B. Enquanto em nossa população sua presença observada em 71,7% dos casos, na maioria dos estudos, esta taxa variou de 33,3% a 56,7%. Hallack Neto et al., 2006 sugeriram que esta maior incidência de *bulky* e sintomas B pode estar associada à dificuldade de acesso de nossa população aos serviços públicos de saúde. Porém, de acordo com Cheson et al. (2014), a presença de sintomas B não deve ser mais considerada clinicamente relevante para pacientes com LDGCB.

Em relação ao estágio clínico, 43,5% dos pacientes apresentaram estágio clínico I/II e 56,5% estágio III/IV. Estes valores aproximam-se dos resultados escritos por Armitage e Weisenburger, 1998; El-Hamed, 2005 e WHO, 2008.

Conforme descrito na literatura, níveis de DHL acima dos valores de referência são observados em mais de 50% dos LDGCB e está associado à pior prognóstico.

Em nossa casuística, assim como descrito na literatura (Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde, 2009), os principais fatores de risco associados à mortalidade em pacientes com LDGCB tratados com R-CHOP incluíram idade superior a 60 anos, estágio clínico avançado (III/IV), acometimento de pelo menos dois sítios extralinfonodais, *performance status* superior a dois e nível de DHL superior aos valores de referência. A ausência de informações nos prontuários clínicos avaliados, frequentemente observado

em estudos retrospectivos, ocorreu em 16,3% (n=16/98) dos casos em nosso estudo. Porém, para evitar viés de seleção, estes pacientes foram excluídos da análise das variáveis faltantes, mas foram incluídos nas análises de sobrevida. Da mesma forma, para garantir a qualidade dos nossos resultados, todos os pacientes foram homogeneamente tratados com R-CHOP, o diagnóstico foi revisado por um hematopatologista e a compilação dos dados dos prontuários foi realizada com a colaboração de dois médicos hematologistas da equipe.

Nossos resultados indicam que o IPI é aplicável à nossa população com LDGCB. Além disso, a idade se mostrou como variável independente do IPI para SG na análise multivariada. Da mesma forma, estágio clínico e idade foram variáveis independentes para SLP na análise multivariada.

De acordo com Fu et al. (2008) e Martelli et al. (2013), embora muitos parâmetros biológicos definidos por IHQ possam estar relacionados com prognóstico, sua implementação na prática clínica permanece em investigação. Como exemplo, o algoritmo de Hans baseado em IHQ para subclassificar o LDGCB, apresenta taxa de concordância com modelos moleculares de apenas 81,3%.

Desta forma, nossos resultados corroboram a importância da avaliação dos fatores de prognóstico clínico, que de forma rápida e simples podem nortear o tratamento dos pacientes com LDGCB.

6.2- Análises de expressão gênica e proteica

Embora fatores clínicos descritos anteriormente como o IPI, sejam capazes de prever o prognóstico em LDGCB, alguns estudos evidenciaram que pacientes com o mesmo escore pelo IPI apresentam sobrevida distinta,

sugerindo que outras variáveis a exemplo de marcadores moleculares, possam também ter influência no prognóstico (Lossos e Morgensztern, 2006).

Assim, estudos de perfil de expressão gênica têm sido estratégias importantes para identificar genes e vias de sinalização celular que possam apresentar papel na patogênese dos LDGCB e na proposição de novos sistemas de classificação. Além disso, a compreensão destes achados moleculares é essencial para desenvolver estratégias terapêuticas que possam vencer a resistência ao tratamento e favorecer o desenvolvimento de terapias individualizadas.

Neste estudo utilizamos a técnica de análise de expressão gênica por PCR em tempo real por ser uma técnica altamente sensível e que permite a quantificação de transcritos raros e pequenas alterações na expressão dos genes. Além disso, apresenta vantagens como menor custo, maior rapidez na obtenção dos resultados, menor complexidade técnica e permite, ainda, o uso de amostras FFEP (Pfaffl, 2001). Estas vantagens possibilita o uso de dados obtidos por esta técnica na prática clínica, superando as dificuldades dos estudos de microarray, que além de ter alta complexidade técnica e alto custo, necessitam de amostras frescas ou congeladas.

A padronização da PCR em tempo real foi realizada de forma rigorosa, obedecendo às condições ideais preconizadas pela literatura, que incluem padronização da quantidade inicial de RNA para todas as amostras e uso de mais de um gene de referência como controle interno para normalizar os resultados. Além disso, utilizou-se uma amostra comum como controle ou calibradora em todas as reações (Vandesompele et al., 2002; Bustin et al., 2009). Para a escolha e padronização dos genes de referência ideais, nos

baseamos em estudo anterior que testou diversos genes endógenos em diferentes tecidos em LDGCB (Lossos et al., 2003), pois sabe-se que a expressão gênica pode variar de acordo com o tecido. Todos os *primers* utilizados foram conferidos quanto à sua autenticidade utilizando-se o algoritmo de comparações de sequências biológicas primárias *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Além disso, foram desenhados em regiões de éxons, evitando-se assim, contaminação com DNA genômico.

A maior dificuldade encontrada durante a padronização da metodologia concentrou-se na etapa de extração de RNA das amostras FFEP. Ainda não há consenso quanto ao melhor protocolo para a extração de RNA de amostras parafinadas. Os autores, usualmente, não descrevem em detalhe as metodologias que foram empregadas em seus estudos. Desta forma, não conseguimos reproduzir todas as técnicas em nosso laboratório. Assim, demoramos cerca de oito meses na etapa de padronização da extração de RNA. Porém, mesmo após comparar várias opções metodológicas viáveis (Gouveia et al., 2011b), não obtivemos sucesso de amplificação gênica nas reações de PCR em todas as amostras nas quais foi possível obter RNA adequado.

Como nenhum dos estudos disponíveis na literatura foram esclarecedores em relação aos possíveis fatores que poderiam influenciar o sucesso da amplificação, resolvemos testar possíveis interferentes nas nossas amostras. Avaliamos o tamanho do fragmento do tecido, tempo de armazenamento dos blocos, tipo de fixador utilizado, diferentes iniciadores para síntese de cDNA e diferentes sequências de primers, entre outros. Além disso, a inclusão de uma etapa adicional de lavagem com solução de PBS no

processo de preparo das amostras para retirar possíveis resíduos do fixador que poderiam estar atuando como inibidores de PCR produziu melhora significativa tanto na quantidade e qualidade do RNA obtido quanto no sucesso de amplificação das amostras por PCR convencional e PCR em tempo real. Assim, as modificações no protocolo desenvolvidas por nossa equipe mostraram-se eficazes para obtenção de amostras de RNA para estudos de expressão gênica (Gouveia et al., 2014).

Uma limitação do nosso estudo quanto à análise da expressão gênica e proteica decorreu do fato de que nem todos os blocos de parafina utilizados apresentavam tecido suficiente. O estudo foi possível para análise de expressão gênica em 77/98 amostras e proteica em 58/98 amostras. Nestes casos, priorizou-se a análise de expressão gênica por ser o objetivo principal deste trabalho.

6.2.1- *BCL2*

Na era pré-rituximabe, os estudos que avaliaram a expressão do gene *BCL2* ou sua respectiva proteína como indicadores de prognóstico em LDGCB foram contraditórios. Porém, na maioria das vezes, a hiperexpressão foi associada à pior prognóstico (Kramer et al., 1996; El-Hameed, 2005; Iqbal et al., 2006; Wu e Keating, 2006). Na era pós-rituximabe, vários estudos demonstraram ausência de significado prognóstico da expressão de *BCL2* na SG em LDGCB. Porém, outros autores demonstraram que, após a adição deste anticorpo monoclonal à quimioterapia, a expressão de *BCL2* apresentava significado prognóstico variável nos subgrupos moleculares de LDGCB de células B do centro germinativo ou de células B ativadas.

Neste estudo, não encontramos diferença significativa entre expressão do gene *BCL2* em relação à RC, SG e SLD. Entretanto, verificamos que pacientes com expressão de *BCL2* igual ou acima da mediana apresentaram pior SLP em comparação aos pacientes com expressão inferior à mediana.

Nossos dados corroboram parcialmente os resultados de Malumbres et al. (2008), que encontraram associação entre expressão de *BCL2* e pior SG e SLP.

Quando analisamos a expressão de *BCL2* em relação aos subgrupos de IPI, estágio clínico e idade, não observamos diferenças estatisticamente significativas em relação à SG e SLP. Porém, observamos tendência de maior expressão de *BCL2* com o aumento da idade. Estes dados corroboram as observações de Thunberg et al. (2009), que descreveram que o número de células positivas para *BCL2* aumenta com a idade e que o impacto prognóstico poderia ser dependente da combinação da expressão com a idade.

A perda de significado prognóstico da expressão do gene *BCL2* em pacientes com LDGCB tratados com rituximabe também foi observada por outros autores (Mounier et al., 2006; Shivakumar e Armitage, 2006; Fu et al., 2008; Wilson et al., 2008, Amoroso et al., 2011).

Citocinas como TNF α e IL-10 produzidas pelas células tumorais podem atuar como protetores para a neoplasia e consequentemente, colaborar com a resistência à ação citotóxica dos agentes quimioterápicos (Bonavida, 2006).

O rituximabe atua na via de sinalização intracelular P38/MAPK, potencializando sua fosforilação. Ao ser ativada, a MAPK bloqueia a via de sinalização de SP1 e, consequentemente, a síntese e secreção de IL-10 e a sub-regulação da via STAT3. A via STAT3 é importante reguladora do

crescimento e invasão do tumor, da proliferação celular, angiogênese e da resposta imune. A sub-regulação desta via inibe a transcrição e expressão do gene *BCL2*, induzindo a apoptose. Por outro lado, o rituximabe também reduz a secreção de IL-10 por meio da inibição direta da via NF- κ B (Fu et al., 2008 e Amoroso et al., 2011, OK et al., 2014).

Ao atuar na inibição de todas estas vias de sinalização e, consequentemente sensibilizar o tumor à quimioterapia, o rituximabe contribuiu para significativo aumento da SG no LDGCB (Fu et al., 2008). Entretanto, a SG em 5 anos dos portadores de LDGCB ainda varia de 30% a 50% (Cultrera e Dalia, 2012).

Os mecanismos de resistência ao rituximabe não estão claros, porém, podem estar relacionados à regulação negativa do antígeno CD20 ou à perda de sua expressão (Bonavida, 2006).

Alguns mecanismos epigenéticos estão envolvidos na modulação da expressão do antígeno CD20. O inibidor da histona desacetilase denominado suberoilânida do ácido hidroxânico modula a expressão de genes relacionados à apoptose (Zhao et al., 2007). Outra histona, a Tricostatina Desacetilase A (TSA) também foi capaz de aumentar a expressão de RNA mensageiro e da proteína CD20 em linhagem celular CD20 negativa, sensibilizando-a ao rituximabe (Tomita et al., 2007).

Mutações genéticas na sequência de codificação de CD20 também foram descritas e parecem estar relacionadas à resistência ou recaída após terapia com rituximabe (Binder et al., 2006).

Estes dados demonstram a importância de mais estudos que explorem os mecanismos moleculares de resistência ao rituximabe com o objetivo de

produzir novas estratégias que possam ajudar a vencer a resistência à quimioterapia.

Em relação à expressão da proteína BCL-2, 69% dos pacientes de nossa casuística apresentaram 50% ou mais células positivas. Estes dados corroboram o descrito por Shivakumar e Armitage (2006), que utilizando o mesmo nível de corte, encontraram 66% de pacientes positivos.

Ao contrário de El-Hamed (2005), que descreveu pior RC e SLD para pacientes com expressão da proteína BCL-2, não encontramos diferenças significativas entre a expressão da proteína e obtenção de RC, SG, SLD e SLP. Estes dados estão de acordo com o descrito por Kramer et al. (2006) e Iqbal et al. (2006), que também não observaram diferenças significativas entre expressão de BCL-2 em pacientes com LDGCB, sem levar em conta seus subtipos moleculares.

De acordo com Malumbres et al. (2008), os resultados conflitantes da literatura em relação à expressão da proteína BCL-2 por IHQ podem estar associados às diferenças metodológicas dos estudos. Isto inclui a padronização realizada em diferentes tecidos e no processo de recuperação antigênica. Por outro lado, ainda não há consenso nos valores de corte de positividade utilizados.

6.2.2- *MDR1*

Os resultados de análise de expressão do gene *MDR1* e da proteína P-gp no LDGCB permanecem controversos. Alguns estudos descrevem baixa expressão destas proteínas antes do tratamento, seguida do aumento de células positivas, que podem ser selecionadas pela quimioterapia (Rezende et

al., 2005). Porém, outros estudos demonstraram que os valores de expressão permanecem constantes ao longo da terapia (Rodriguez et al., 1993; Liu et al., 2001; Gündüz et al., 2012).

A expressão de *MDR1* em nossa casuística foi observada em 41,5% dos casos (n=32/77), o que corrobora o descrito por Liu et al. (2001), que encontraram taxa de positividade em pacientes com linfoma variando entre 20% e 50%.

A falta de impacto prognóstico em nossa população permaneceu mesmo após estratificação por estágio clínico, IPI e idade.

Em relação ao papel prognóstico de *MDR1* e Pg-p na sobrevida dos pacientes, os dados da literatura também são contraditórios. Enquanto alguns estudos descreveram que a expressão de *MDR1* foi associada à menor sobrevida (Liu et al., 2001, Zenkov et al., 2004; Pagnano, 2004; Andreadis et al., 2007), outros, assim como o presente estudo, não encontraram impacto prognóstico (Niehans et al., 1992; Rodriguez et al., 1993; Gündüz et al., 2012).

Estes resultados conflitantes podem estar relacionados às diferenças no desenho dos estudos, incluindo diferentes tipos de linfoma, diferentes esquemas de tratamento e metodologias para estudos de expressão gênica e proteica, bem como diferentes pontos de corte para positividade. Além disso, na maioria dos estudos, foram avaliadas coortes de pacientes bastante restritas, usualmente cerca de 40 amostras. Esta foi uma vantagem do nosso estudo, pois avaliamos maior número de pacientes (n=77) que a média de estudos anteriores para expressão de *MDR1* em pacientes com linfoma.

Niehans et al. (1992) sugerem que possivelmente existam diferenças biológicas entre os pacientes com ou sem expressão de *MDR1* e Pg-p. Por

outro lado, a expressão destes genes pode estar associada a outras características favoráveis que compensam o impacto negativo da resistência à múltiplas drogas.

Em tumores sólidos, a proliferação celular descontrolada e a incapacidade de formar vasos sanguíneos normais dificultam o fornecimento de sangue e oxigênio. Em condições normais, a hipóxia produz microambiente estressante para as células, podendo promover a morte celular por apoptose ou necrose. Porém, células cancerígenas são capazes de sobreviver em ambientes inóspitos e hipóxicos pela ativação de respostas celulares adaptativas, as quais também contribuem para a sobrevivência e progressão do tumor, assim como à resistência a diferentes terapias (Karakashev e Reginato, 2015).

Estudos recentes têm demonstrado que o fator hipóxia induzível 1 (*HIF-1*) é um fator de transcrição importante nas respostas celulares em baixas concentrações de oxigênio. Quando há hipóxia, o *HIF-1* é estabilizado e ativa a expressão de mais de 200 genes-alvo promotores de resistência à terapia anti-câncer, incluindo o gene *MDR1* (Evens et al., 2010; Ding et al., 2010; Karakashev e Reginato, 2015).

Comerford et al. (2002) demonstraram que a diminuição de HIF-1 α levou à redução dos níveis de RNA mensageiro do gene *MDR1* em células não-hipóxicas. Isto sugere que o *HIF1* pode interferir na expressão basal de *MDR1*. A partir destes resultados, os autores sugeriram que o desenvolvimento de terapias destinadas à modulação da expressão de *HIF1* em conjunto com a quimioterapia padrão poderia ser uma estratégia para superar a resistência tumoral.

Resultados semelhantes foram observados por Chen et al. (2014), que descreveram que o silenciamento de HIF-1 α , além de reduzir a expressão de *MDR1* e P-gp, induziu aumento significativo do nível de apoptose na presença de diferentes fármacos utilizados no tratamento do câncer de cólon.

Embora não existam muitos dados sobre o papel de *HIF-1* em linfoma, Evens et al. (2010) demonstraram que a expressão HIF-1 α foi um fator favorável, independente e importante para o prognóstico e sobrevida de pacientes com LBGCB tratados com R-CHOP. Porém, resultados favoráveis não foram observados em pacientes tratados apenas com CHOP. Algumas explicações possíveis para este fato incluem o fato de que *ROS* é comumente observado em células tumorais e está relacionado com a regulação do crescimento de células neoplásicas (Ding et al., 2010). Como a expressão de HIF-1 α é regulada por *ROS*, e este aumenta a expressão de CD20 em linhagens celulares de linfoma, acredita-se que pacientes tratados com rituximabe tenham maior probabilidade de responder à quimioterapia (Gupta et al., 2012). Além disso, dados preliminares de Dribitz et al., 2014 mostraram que o rituximabe induz senescência celular mediada por *ROS* em linfoma. Por outro lado, é possível que ocorram interações entre o rituximabe e alvos a jusante de HIF-1 α . Assim, o rituximabe pode interagir com outras vias oncogênicas e regular diversos genes envolvidos no metabolismo celular, no recrutamento de células inflamatórias, regulação do pH tecidual e da função da matriz extracelular. Desta forma, análise aprofundada de HIF-1 α em conjunto com biomarcadores envolvidos nestas vias em linfoma é bem justificada (Evens et al., 2010). Esses dados corroboram a falta de impacto prognóstico da

expressão de *MDR1* na sobrevida de pacientes com LDGCB tratados com R-CHOP observados em nosso estudo.

Nossos dados são discordantes com o descrito pela literatura em relação à expressão da proteína Pg-p. A taxa de positividade encontrada em nosso estudo é superior à descrita em estudos anteriores. Enquanto encontramos 87,7% dos pacientes com expressão de Pg-p, Liu et al. (2001) e Pagnano (2004) encontraram positividade de 41,7% e 37%, respectivamente. Além disso, diferente do observado em nosso estudo, estes autores encontraram associação entre expressão desta proteína e pior RC e sobrevida.

Diversos outros estudos também não encontraram concordância entre a expressão dos genes estudados com a expressão de suas respectivas proteínas (Schindler et al., 1990; Trembley et al., 1996; Chen et al., 2002; Gu et al., 2006; Morgan et al., 2006; Chile, 2009).

Um dos fatores que pode colaborar para esta inconsistência de resultados, como citado anteriormente, é a falta de padronização internacional para as análises de IHQ, incluindo os valores de corte de positividade. Porém, Greenbaum et al. (2003) afirmam que existem várias outras possíveis explicações para justificar estas divergências, incluindo a presença de mecanismos pós-transcricionais envolvidos na transformação do RNA mensageiro em proteína e o fato de que a meia vida das proteínas podem diferir consideravelmente *in vivo*.

Assim, nossos resultados demonstram que estudos futuros devem investigar vias alternativas de resistência à drogas a fim de procurar compreender a possível causa de falha no tratamento ou recidiva no LDGCB.

6.2.3- OCT1

A literatura demonstra relação entre a expressão do gene *OCT1* e a transformação oncogênica *in vitro* e tumorigenicidade *in vivo* em diversos tipos de câncer (Maddox et al., 2012), como de estômago (Almeida et al., 2005), próstata (Obinata et al., 2012) e colo de útero (Xiao et al., 2014). Porém, poucos estudos avaliaram a expressão do gene *OCT1* ou de sua respectiva proteína em linfoma.

Nossos dados evidenciaram diferenças significativas nas taxas de SG e SLP em pacientes com expressão de *OCT1* $\geq$ à mediana quando comparados aos pacientes com expressão inferior à mediana. Nossos resultados sugerem que a expressão de *OCT1* apresenta significado prognóstico em LDGCB, especialmente em pacientes com idade $\geq$ 60 anos e IPI intermediário-alto e alto-risco.

Não está claro se o gene *OCT1* está diretamente envolvido na ontogenia do câncer ou se sua expressão ocorre em consequência da ação de fatores genotóxicos. Porém, há evidências de que exista associação entre a expressão de *OCT1* e a progressão e resistência tumoral à quimioterapia ou radioterapia (Tantin et al., 2005).

OCT1 foi descrito recentemente como importante fator na resposta celular após ação de agentes que lesionam o genoma, como radicais livres e peróxidos de hidrogênio gerados durante os processos inflamatórios e exposição a agentes químicos e físicos, incluindo radiação ultravioleta e drogas antineoplásicas (Zhao et al., 2000; Tantin et al., 2005; Schild-Poulter et al., 2007).

Zhao e colaboradores (2000) investigaram a resposta celular genotóxica em linhagens celulares humanas de diferentes tipos de carcinoma e demonstraram que a expressão da proteína OCT-1 foi significativamente mais elevada em células expostas a estes agentes em relação às células não expostas. Experimentos adicionais demonstraram que os níveis de RNA mensageiro não foram elevados após danos do DNA, indicando que a indução da proteína pode ter origem de mecanismo pós-transcricional. Além disso, os autores sugeriram que a proteína OCT-1 seria capaz de se ligar aos promotores de outros genes responsivos aos danos do DNA, como histona *H2B*, *TIF2*, *GnRH* e de imunoglobulina de células B, exercendo função reguladora.

Uma das modificações pós-transcricionais descritas é a fosforilação pela proteína quinase ativada em resposta a quebras de DNA, o que pode resultar na modulação da atividade de regulação da transcrição de Oct-1 (Tantin et al., 2005). Kang et al. (2009) encontraram resultados semelhantes para expressão de OCT-1 em culturas de células expostas ao estresse genotóxico e oxidativo e sugeriram que após estes eventos, ocorre a fosforilação *in vivo* da proteína.

O fator de transcrição *STAT3* regula a expressão de genes em resposta à interleucinas e citocinas bem como a uma ampla variedade de outros sinais extracelulares (Hardee et al., 2013). É frequentemente ativado em muitas neoplasias, provavelmente devido à atividade aberrante das vias de sinalização de EGFR, HER2, Src e JAK2. Além disso, tem sido relacionado a comportamentos malignos, incluindo regulação do crescimento do tumor, transição epitélio-mesenquimal, migração, invasão, proliferação celular,

angiogênese, resposta imune, metástase, sobrevivência do tumor e resistência terapêutica (Ok et al., 2014; Carpenter e Lo, 2014).

A expressão de *STAT3* é ativada por fosforilação da tirosina por JAK quinases. Isto leva à dimerização da *STAT3* e translocação para o núcleo, onde regula a transcrição (Wang et al., 2013). Dados da literatura sugerem que *STAT3* fosforilada (p*STAT3*), ou seja, ativada, é encontrada em pacientes com LDGCB (especialmente no subtipo ABC), que apresentam pior sobrevida global e sobrevida livre de progressão quando comparados com pacientes com *STAT3* inativo. A hiperexpressão de p*STAT3* em LDGCB está associada com estágio clínico avançado, envolvimento de vários sítios extralinfonodais, expressão concomitante de *MYC* e *BCL2* (*double hit*) (Ok et al., 2014). Gupta et al. (2012) verificaram que o RNAm de *OCT1* está mais elevado nas linhagens celulares de linfoma em comparação a linfócitos de doadores saudáveis.

STAT3 também atua na proliferação celular através da regulação dos genes *OCT1* e *p53*. *STAT3* age diretamente no promotor do gene *OCT1* aumentando sua expressão e diminuindo a expressão de *p53*, o que resulta na proliferação descontrolada das células cancerosas (Carpenter e Lo, 2014).

Wang et al. (2013) demonstraram correlação positiva entre a fosforilação de *STAT3* e a expressão de *OCT1* em câncer de esôfago. Como consequência, observou-se menor tempo de sobrevida dos pacientes. Análises complementares demonstraram que o silenciamento de *STAT3* e *OCT1* reduziu a expressão dos genes anti-apoptóticos *BCL2* e *BCL-XL* e, em contraposição, promoveu aumento da expressão de genes pro-apoptóticos *BAX*, *BAD*, Caspase 3 e Caspase 9. Estes dados indicam que o *OCT1* funciona como um

alvo molecular crítico de *STAT3* e que ambos estão diretamente relacionados à expressão de *BCL2*. Resultados semelhantes foram observados por Qian et al. (2015) em pacientes com câncer gástrico.

Os dados de Wang et al. (2013), OK et al. (2014) e Qian et al. (2015) estão em concordância com os resultados de Heckman et al. (2006). Estes autores demonstraram, em estudo com RNA de interferência em células de linfoma com t(14;18), que a redução de *OCT1* e *OCT2* está associada com diminuição da expressão de *BCL2* e consequentemente, com indução da apoptose. Além disso, estes dados podem justificar o pior prognóstico associado à expressão do gene *OCT1* observado em nossa casuística.

Embora existam evidências de que a expressão do gene *OCT1* esteja associada com transformação oncogênica em diversos tipos de câncer, nosso estudo foi o primeiro a correlacionar sua hiperexpressão com aspectos clínicos (como idade e IPI) e prognóstico em LDGCB.

Como a expressão gênica de *OCT1* mostrou-se fator de prognóstico independente, podemos sugerir que a avaliação deste gene possa ser útil na prática clínica dos pacientes com LDGCB. No entanto, futuros estudos de avaliação da expressão do gene *OCT1* e suas respectivas vias de sinalização podem também estabelecê-lo como possível alvo terapêutico para LDGCB.

Encontramos apenas dois trabalhos correlacionando a expressão da proteína OCT-1 com linfoma (Sáez et al., 2002 e McCune et al., 2006). De forma distinta dos nossos resultados, estes estudos descrevem fraca expressão da proteína OCT-1 em linfoma. Nossos resultados demonstraram expressão da proteína OCT-1 em 84,2% dos casos. Outros estudos demonstraram fraca expressão de OCT-1 (+1/+3) em 12,5%, expressão

moderada em 10,4% (+2/+3) e de forte intensidade em (+3/+3) 77,1% dos pacientes. Porém, assim como para as demais proteínas estudadas, não foi observada associação entre RC, SG, SLD e SLP com a expressão proteica de OCT-1.

Uma limitação do nosso estudo foi que nem todos os blocos de parafina utilizados para a análise molecular apresentaram material suficiente para as reações de imunohistoquímica. Porém, mesmo assim encontramos níveis de expressão de OCT-1 mais elevados que os descritos em estudos anteriores. Além disso, o valor de p encontrado para a expressão da proteína OCT-1 foi próximo ao valor significativo ($p=0,072$), o que corrobora as diferenças significativas observadas para expressão gênica. Talvez, se o número de casos avaliáveis para proteína não fosse inferior ao número de casos avaliáveis para expressão gênica, teríamos obtido resultados significantes também para a proteína. Assim, novo estudo com maior número de casos poderia confirmar estes resultados e validar o impacto prognóstico da expressão desta proteína na SG e SLP em pacientes com LDGCB.

6.4- Avaliação da t(14;18)

Como a translocação t(14;18) está relacionada à mecanismos de controle da expressão de um dos genes estudados (*BCL2*), realizamos a extração de DNA das amostras para pesquisa desta alteração. Porém, devido à escassez de amostra, obtivemos DNA de apenas 67 dos 98 pacientes incluídos na casuística. Destes, em apenas seis amostras, identificamos a presença de

bandas no gel de agarose após reação de Nested-PCR para identificação da t(14;18).

Acreditamos que mesmo que a banda observada seja referente à presença da t(14;18), a baixa frequência em nossa amostra possa ser resultado não apenas de ausência desta alteração, mas também de problemas técnicos, uma vez que outros autores ao comparar PCR e FISH para detecção da t(14;18) observaram baixa eficiência de ambas em amostras frescas. Em amostras FFEP, a técnica de FISH foi superior à PCR. Barrans et al. (2003) compararam amostras congeladas e FFEP e demonstraram concordância de 88% e 45%, respectivamente. Além disso, 40% das amostras de tecidos parafinados apresentaram resultados falso-negativos. Os resultados observados por Einerson et al. (2005) corroboram estes achados, ao evidenciar taxa de falha da técnica de PCR superior a 50%.

Estas evidências confirmam a necessidade de se utilizar outra técnica para identificar a t(14;18) em nossas amostras. Porém, mais uma vez, por escassez de material, não foi possível realizar o FISH para confirmar os resultados de PCR.

Optamos por purificar o produto de PCR para confirmar se a banda visualizada no gel correspondia à t(14;18). Porém, não conseguimos sequenciamento satisfatório, muito provavelmente pela escassez de amostra, pois a intensidade das bandas visualizadas no gel era bastante fraca. Em virtude destes problemas técnicos, não foi possível correlacionar a presença da t(14;18) com a expressão do gene *BCL2* ou com sobrevida. Novos estudos com maior número de amostras e utilizando a técnica de FISH poderiam

confirmar estes resultados e verificar a correlação entre t(14;18), expressão do gene *BCL2* e sobrevida em LDGCB.

CONCLUSÃO

7 – Conclusão

Não observamos impacto prognóstico da expressão do gene *BCL2* nos desfechos de RC, SG e SLD em pacientes com LDGCB tratados com R-CHOP. Porém, a hiperexpressão de *BCL2* acima da mediana associou-se a menor SLP.

Não encontramos impacto prognóstico da expressão do gene *MDR1* em relação aos desfechos de RC, SG, SLD e SLP em pacientes com LDGCB tratados com R-CHOP.

A hiperexpressão do gene *OCT1* igual ou superior à mediana foi associado a pior prognóstico para SG e SLP em pacientes com LDGCB tratados com R-CHOP. Porém, não observamos impacto prognóstico da expressão de *OCT1* para RC e SLD.

Não encontramos correlação de prognóstico e expressão das proteínas BCL-2, Pg-p e OCT-1 em relação à RC, SG, SLD e SLP em pacientes com LDGCB tratados com R-CHOP.

Em nossa casuística observamos correlação entre idade, número de sítios extralinfonodais, estágio clínico, IPI e níveis de DHL com o prognóstico quando avaliamos os desfechos de SG e SLP em pacientes com LDGCB

tratados com R-CHOP. Para SLD apenas o acometimento de SNC apresentou impacto prognóstico.

Quando os pacientes foram estratificados pelo estadiamento, não foi encontrada diferença de expressão dos genes e proteínas estudadas para SG ou SLP.

Quando os pacientes foram estratificados pelo IPI, apenas os grupos com expressão de *OCT1* igual ou superior à mediana e de IPI IA ou AR apresentaram pior SG. Porém, não foi observado impacto prognóstico para SLP.

Quando os pacientes foram estratificados pela idade, apenas o grupo com idade igual ou maior a 60 anos e expressão de *OCT1* igual ou maior à mediana apresentou pior prognóstico tanto para a SG quanto para a SLP.

Não foi possível correlacionar o impacto prognóstico da presença de t(14;18) com a RC, SG, SLD e SLP ou com a expressão do gene *BCL2* nos pacientes com LDGCB tratados com R-CHOP.

ANEXOS

8 – ANEXOS

Anexo A – Aprovação do estudo pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HC-FMUSP

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 16/07/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0236/08**, intitulado: "**DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA MÚLTIPLA À DROGA, OCT-1 E MDR-1 E DO GÊNE BCL-2 EM LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B.**" apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dra. Juliana Pereira**

Pesquisador (a) Executante: **Gisele Rodrigues Gouveia**

CAPPesq, 18 de Julho de 2008

PROF. DR. CLAUDIO LEONE
Vice - Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

**Anexo B – Aprovação do adendo do estudo pela Comissão de Ética para
Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HC-FMUSP**

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 12/05/2010, **APROVOU o(s) documento(s)** abaixo mencionado(s) no Protocolo de Pesquisa nº **0236/08**, intitulado: "**DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA MÚLTIPLA À DROGA, OCT-1 E MDR-1 E DO GENE BCL-2 EM LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B.**" apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**, bem como tomou CIÊNCIA da Carta de anuência do Serviço de Hematologia, e da Divisão de Patologia, Adendo com as reformulações sugeridas.

• **Adendo ao Projeto de Pesquisa**

Comentários do Relator: Os pesquisadores enviam cartas de anuência e informam que o atraso se deveu à problemas metodológicos. Adicionalmente enviam um segundo adendo que o projeto passa a ser retrospectivo e estudará os blocos de biópsia disponíveis na patologia.

Pesquisador (a) Responsável: **Dra. Juliana Pereira**

CAPPesq, 12 de Maio de 2010

**Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão
de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa**

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua
Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011
3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Rita

Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO: M (☐) F (☐)
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO:..... CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M (☐) F (☐)
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO:..... CIDADE:
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Detecção da expressão dos genes associados à resistência múltipla à droga, Oct-1 e MDR-1 e do gene bcl-2 em Linfoma Difuso de Grandes Células B.

1. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Juliana Pereira

2. CARGO/FUNÇÃO: Médica. INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL de MEDICINA Nº 73746. UNIDADE DO HC-FMUSP: Serviço de hematologia do Instituto Central.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO (☒) RISCO MÍNIMO (☐) RISCO MÉDIO (☐) RISCO BAIXO (☐)
RISCO MAIOR (☐)

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Justificativa e Objetivos da Pesquisa: O Linfoma Difuso de Grandes Células B é o subtipo de Linfoma mais comum no Ocidente. No Brasil, representa a quinta forma mais comum de câncer, com mais de 55 mil casos e 26 mil mortes por ano. Porém, apenas 40% a 50% dos pacientes adultos são curados com quimioterapia. Assim, os estudos sobre fatores de prognóstico, incluindo expressão do gene bcl-2, do fator Oct-1 e mecanismos de MDR são importantes para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas de prevenção ou superação da resistência ao tratamento. A presente pesquisa tem como objetivos avaliar o impacto prognóstico das proteínas associadas à

resistência múltipla a droga, Oct-1 e MDR-1, e apoptose bcl-2 em portadores de Linfoma Difuso de Grande Célula B *de novo* ao diagnóstico.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: Ao aceitar tomar parte deste estudo, será autorizada a utilização de material de biópsia colhido anteriormente por um médico hematologista do Grupo de Linfoma Não-Hodgkin do Serviço de Hematologia do HC-FMUSP, e que encontra-se armazenado nos Laboratórios do HC-FMUSP. Para cada amostra serão realizados os seguintes procedimentos: análise morfológica das células, Microdissecação a Laser, Detecção da expressão dos genes associados à resistência múltipla à droga, Oct-1 e MDR-1 e do gene bcl-2 em Linfoma Difuso de Grandes Células B *de novo* ao diagnóstico.

3. Desconfortos e riscos esperados: As complicações deste procedimento são extremamente raras.

4. Benefícios que poderão ser obtidos: Este estudo permitirá que novos fatores de risco para linfoma sejam delimitados, permitindo maior adequação à terapêutica para casos futuros que tenham a mesma doença.

5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo: Não existe procedimento alternativo.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas. Em caso de dúvidas ou informações sobre a pesquisa, resultados de exames, basta entrar em contato pelo telefone 3061-5544, Ramal: 399;

2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência. Caso não queira mais que a amostra do material colhido seja utilizada para a realização dos testes, terá total liberdade de deixar de participar do estudo;

3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade. Os resultados dos exames serão guardados de forma sigilosa não tendo risco de exposição a situações constrangedoras;

4. Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

5. Disponibilidade de assistência no HC-FMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa. Caso ocorra algum problema no local da punção ou dor desconfortável, favor entrar em contato conosco no telefone 0800-550300 ou procurar o Hospital Dia da Hematologia do HC-FMUSP, no mesmo local onde foi realizada a coleta para ser atendido pelo médico de plantão;

6. Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

7. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa. Eventuais danos à saúde poderão ocorrer, porém, não haverá risco adicional visto que o material destinado a esta pesquisa será proveniente de biópsia, que é rotineiramente coletado e de acordo com os protocolos médicos. Neste caso o paciente que apresente eventual dano pela coleta de amostra deverá procurar o Hospital Dia da Hematologia do HC-FMUSP, no mesmo local onde foi realizada a coleta para ser atendido pelo médico de plantão.

8. Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Caso você tenha alguma dúvida ou questionamento a respeito deste estudo, por favor, entre em contato com a Pesquisadora Responsável Dra. Juliana Pereira ou Pesquisadora Executante Gisele Rodrigues Gouveia pelo telefone (011)3061-5544, Ramal: 339.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Todas as informações obtidas neste estudo são consideradas confidenciais e utilizadas apenas com propósito de pesquisa. Todos os dados são confidenciais e protegidos por lei.

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Detecção da expressão dos genes associados à resistência múltipla à droga, Oct-1 e MDR-1 e do gene bcl-2 em Linfoma Difuso de Grandes Células B”. Eu discuti com o Pesquisador Responsável Dra. Juliana Pereira ou com a Pesquisadora Executante Gisele Rodrigues Gouveia sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

Anexo D – Ficha de coleta de dados nos prontuários

Nº DO PACIENTE: _____ - DATA DE REVISÃO DO PRONTUÁRIO: ____/____/____

NOME COMPLETO: _____

RGHC: _____ - Nº REGISTRO DAP: _____

SEXO: () M () F IDADE AO DIAGNÓSTICO: _____ anos

PRONTUÁRIO ATIVO: () SIM

() NÃO – MOTIVO: _____

ESTÁDIO CLÍNICO: _____

LOCAL DE COMPROMETIMENTO: _____

TAMANHO DA MASSA: _____

SINTOMAS B: () PRESENTES () AUSENTES

PRESENÇA DE *BULKY*: () NÃO () SIM – LOCAL: _____

IPI: _____ RIPI: _____ ECOG: _____

Nº DE SÍTIOS EXTRALINFONODAIS: _____ DHL AO DIAGNÓSTICO: _____

COMPROMETIMENTO DA MEDULA ÓSSEA: () SIM () NÃO

COMPROMETIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: () SIM () NÃO

TRATAMENTO: _____

DATA DE DIAGNÓSTICO: ____/____/____

REMISSÃO: _____ - DATA: ____/____/____

AUSÊNCIA DE RESPOSTA: _____ - DATA: ____/____/____

RECIDIVA: _____ - DATA: ____/____/____

ÓBITO: ____/____/____ CAUSA MORTIS: _____

ÚLTIMA AVALIAÇÃO: ____/____/____ LOCAL: () HC () ICESP () CNF

() Contato telefônico

IHQ: _____

OBS: _____

Anexo E – Lista de publicações realizadas durante o desenvolvimento da pesquisa

1. Gouveia GR, Siqueira SAC, Chamone DAF, Pereira J. Prevalence of non-Hodgkin lymphomas in São Paulo, Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2011; 33: 317.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3415763/>

2. Gouveia GR, Ferreira SC, Sabino EC, Siqueira SAC, Pereira J. Comparação de três protocolos distintos para extração de RNA de amostras fixadas em formalina e emblocadas em parafina. *J Bras Patol Med Lab.* 2011; 47: 649-54.

Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442011000600012

3. Gouveia GR, Siqueira SAC, Pereira J. Pathophysiology and molecular aspects of diffuse large B-cell lymphoma. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2012; 34: 447-51.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3545433/>

4. Gouveia GR, Ferreira SC, Ferreira JE, Siqueira SAC, Pereira J. Comparison of Two Methods of RNA Extraction from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Specimens. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 1-5.

Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/151724/>

5. Gouveia GR, Ferreira SC, Siqueira SAC, Pereira J. OCT1 gene expression. Is na independent prognostic fator in Diffuse Large B cell lymphoma. *Blood*. 2014; 124(21): 5158.

Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/124/21/5185?sso-checked=true>

6. Gouveia GR, Ferreira SC, Siqueira SAC, Pereira J. Nucleic Acids Extraction from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues. In: *Nucleic Acids - From Basic Aspects to Laboratory Tools*. InTech Open Science, 2016.

Disponível em: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/49457.pdf>

REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akagi T, Kondo E, Yoshino T. Expression of Bcl-2 protein and Bcl-2 mRNA in normal and neoplastic lymphoid tissues. *Leuk Lymphoma*. 1994; 13: 81-87.

Almeida R, Almeida J, Shoshkes M, Mendes N, Mesquita P, Siva E, Seuningem IV, Reis CA, Santos-Silva R, David L. OCT-1 is over-expressed in intestinal metaplasia and intestinal gastric carcinomas and binds to, but does not transactivate, CDX2 in gastric cells. *J Pathol*. 2005; 207: 396–401.

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000; 403(6769): 503-11.

Amen F, Horncastle D, Elderfield K, Banham AH, Bower M, Macdonald D, Kanfer E, Naresh KN. Absence of cyclin-D2 and Bcl-2 expression within the germinal centre type of diffuse large B-cell lymphoma identifies a very good prognostic subgroup of patients. *Histopathology*. 2007;51(1):70-9.

Amoroso A, Hafsi S, Militello L, Russo AE, Soua Z, Mazzarino MC, Stivala F, Libra M. Understanding Rituximab function and resistance: implications for tailored therapy. *Front Biosci.* 2011; 16: 770-782.

Andreadis C, Gimotty PA, Wahl P, Hammond R, Houldsworth J, Schuster SJ, Rebbeck TR. Members of the glutathione and ABC-transporter families are associated with clinical outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2007; 109(8): 3409-3416.

Ansell SM, Armitage J. Non-Hodgkin Lymphoma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2005; 80(8):1087-1097.

Araújo LHL, Victoriano APOS, Melo AC, Assad DX, Lima DS, Alencar DR, Moreira MML, Metzger Filho O, Coelho RFS, Asmar SB, Pereira BSV, Scheliga A. Linfoma Não-Hodgkin de Alto Grau – Revisão de Literatura. *Rev Bras Cancerol.* 2008; 54(2): 175-183.

Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol.* 1998; 16(8): 2780-95.

Azambuja E. Marcadores prognósticos e preditivos e sua importância na individualização do tratamento de pacientes com câncer de mama. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul, 2007.

Barrans SL, Evans PA, O'Connor SJ, Owen RG, Morgan GJ, Jack AS. The detection of t(14;18) in archival lymph nodes: development of a fluorescence in situ hybridization (FISH)-based method and evaluation by comparison with polymerase chain reaction. *J Mol Diag.* 2003; 5(3):168-75.

Barrington SF, Mikhaeel NG, Kostakoglu L, Meignan M, Hutchings M, Mueller SP, Schwartz LH, Zucca E, Fisher RI, Trotman J, Hoekstra OS, Hicks RJ, O'Doherty MJ, Hustinx R, Biggi A, Cheson BD. Role of Imaging in the Staging and Response Assessment of Lymphoma: Consensus of the International Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group. *J Clin Oncol.* 2014; 32: 3048-3058.

Bellas C, Garcia D, Vicente Y, Kilany L, Abaira V, Navarro B, Provencio M, Martin P. Immunohistochemical and Molecular Characteristics with Prognostic Significance in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *PLOS ONE.* 2014; 9(6): 1-9.

Binder M, Otto F, Mertelsmann R, Veelken H, Trepel M. The epitope recognized by rituximab. *Blood.* 2006; 15: 1975-8.

Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde. Rituximabe no tratamento do linfoma não Hodgkin Difuso de Grandes Células B. 2009; 10: 1-18.

Bonavida B. What signals are generated by anti-CD20 antibody therapy? *Curr Hematol Malig Rep.* 2006;1(4):205-13.

Botelho F, Silva C, Cruz F. Epidemiologia explicada – Análise de sobrevivência. *Acta Urológica*. 2009; 26(4): 33-38.

Brasil. Cadastro Nacional de Falecidos (CNF). Disponível em <https://www.falecidosnobrasil.org.br/>. Acesso em 25 de maio de 2014.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009; 55(4): 611-22.

Carpenter RL, Lo HW. STAT3 Target Genes Relevant to Human Cancers. *Cancers*. 2014; 6: 897-925.

Carvalho MP. Expressão Imunoistoquímica de marcadores moleculares no linfoma difuso de grandes células B. Doutorado em Medicina. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa. São Paulo, 2007.

Carvalho VC, Ricci G, Affonso R. *Guia de Práticas em Biologia Molecular*. São Paulo: Yendis, 2010.

Chen G, Gharib TG, Huangg CC, Taylor JM, Misek DE, Kardia SL, Giordano TJ, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash SM, Beer D. Discordant protein and

mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics*. 2002; 1(4): 304-13.

Chen J, Ding Z, Peng Y, Pan F, Li J, Zou L, Zhang Y, Liang H. HIF-1a Inhibition Reverses Multidrug Resistance in Colon Cancer Cells via Downregulation of MDR1/P-glycoprotein. *PLOS ONE*. 2014; 9(6): e98882.

Cheson BD. The International Harmonization Project for response criteria in lymphoma clinical trials. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2007; 21(5): 841-54.

Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, Lister TA. Recommendations for initial evaluation, staging and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin Lymphoma: The Lugano classification. *J Clin Oncol*. 2014; 21(5): 841-54.

Chiattoni CS. Linfomas não-Hodgkin – Introdução. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2002; 22(2): 192-193.

Chile T. Análise da expressão dos genes *CRABP1*, *CRABP2*, *GRP* e *RERG* em adenocarcinomas hipofisários funcionantes e clinicamente não funcionantes. Mestrado em Ciências Médicas. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, Lepeu G, Plantier I, Castaigne S, Lefort S, Marit G, Macro M, Sebban C, Belhadj K, Bordessoule D, Fermé C, Tilly H. Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first

randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood*. 2010; 116: 2040-5.

Colleoni GWB, Inaoka RJ. Linfomas não-Hodgkin: aspectos clínicos, prognósticos e terapêuticos na era do rituximabe. *Diálogo Científico*. 2007; 19-22.

Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, Louis NA, Montalto MC, Colgan SP. Hypoxia-inducible Factor-1-dependent Regulation of the Multidrug Resistance (*MDR1*) Gene. *Cancer Res*. 2002; 66(12): 3387-3394.

Costa FPS, Pereira FG, Vassalo J, Freitas LLL, Lorand-Metze I. A utilidade da citologia por punção com agulha fina aliada à imunofenotipagem no diagnóstico dos Linfomas Não-Hodgkin. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2005; 27(1): 16-20.

Cox DR. Regression models and life-tables. *Journal of the Royal Statistical Society*. 1972; 34(2): 187-220.

Cultrera JL, Dalia SM. Diffuse large B-cell lymphoma: current strategies and future directions. *Cancer Control*. 2012; 19:204–13.

Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med*. 2001;194(12):1861-74.

Ding Z, Yang L, Xie X, Xie F, Pan F, Li J, He J, Liang H. Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha and MDR1/P-glycoprotein in human colon carcinoma tissue and cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010; 136: 1697–1707.

Dbritz JHM, Yu Y, Milanovic M, Drr JR, Kaufmann AM, Rosenfeldt MT, Drken B, Schmitt CA. Elevated ROS Levels in Response to CD20-Targeting Enhance Senescence Entry After Immunochemotherapy in Human B-Cell Lymphoma. *Blood*. 2014; 124(21): 3p.

Einerson RR, Kurtin PJ, Dayharsh GA, Kimlinger TK, Remstein ED. FISH is superior to PCR in detecting t(14;18)(q32;q21)–IgH/bcl-2 in follicular lymphoma using paraffin-embedded tissue samples. *Am J Clin Pathol*. 2005;124: 421-429.

El-Hameed AA. De Novo Nodal Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Identification of Biologic Prognostic Factors. *J Egypt Nat Canc Inst*. 2005; 17(1): 20-28.

Evens AM, Sehn LA, Farinha P, Nelson BP, Raji A, Lu Y, Brakman A, Parimi V, Winter JN, Schumacker PT, Gascoyne RD, Gordon LI. Hypoxia-Inducible Factor-1 Expression Predicts Superior Survival in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With R-CHOP. *J Clin Oncol*. 2010; 28(6): 1017-1024.

Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, Solal-Celigny P, Bouabdallah R, Fermé C, Christian B, Lepage E, Tilly H, Morschhauser F, Gaulard P, Salles G, Bosly A, Gisselbrecht C, Reyes F, Coiffier B. Long-term results of the R-CHOP study

in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 4117-26.

Fisher RI, Gaynor ER, Dahlborg S, Oken MM, Grogan TM, Mize EM, Glick JH, Coltman CA Jr, Miller TP. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 1993; 328(14):1002-6.

Friedberg JW. Rituximab for early-stage diffuse large B-cell lymphoma. *Lancet Oncology*. 2006; 7(5):357-9.

Friedberg JW. Double hit diffuse large B-cell lymphomas: diagnostic and therapeutic challenges. *Chin Clin Oncol*. 2015; 4(11): 9.

Fu K, Weisenburger DD, Choi WW, Perry KD, Smith LM, Shi X, Hans CP, Greiner TC, Bierman PJ, Bociek RG, Armitage JO, Chan WC, Vose JM. 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.

Fujimaki S, Funato T, Harigae H, Fujiwara J, Kameoka J, Meguro K, Kaku M, Sasaki T. Quantitative analysis of a MRD1 transcript for prediction of drug resistance in acute leukemia. *Clin Chem*. 2002; 48 (6): 811-817.

Gisselbrecht C, Glass B, Mounier N, Gill D, Linch D, Trneny M, Bosly A, Shpilberg O, Ketterer N, Moskowitz C, Scmitz N. Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol*. 2010; 28(27): 4184-4190.

Gonçalves EMF. *Linfomas Difusos de Grandes Células B – Factores de Prognóstico Clínicos*. Mestrado em Oncologia. Universidade do Porto. Porto, 1999.

Gouveia GR, Siqueira SAC, Chamone DAF, Pereira J. Prevalence of non-Hodgkin lymphomas in São Paulo, Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2011a; 33(4):315-22.

Gouveia GR, Ferreira SC, Sabino EC, Siqueira SAC, Pereira J. Comparação de três protocolos distintos para extração de RNA de amostras fixadas em formalina e emblocadas em parafina. *J Bras Patol Med Lab*. 2011b; 47(6): 649-654.

Gouveia GR, Siqueira SAC, Pereira J. Pathophysiology and molecular aspects of diffuse large B cell lymphoma. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012; 34(6): 447-51.

Gouveia GR, Ferreira SC, Ferreira JE, Siqueira SAC, Pereira J. Comparison of Two Methods of RNA Extraction from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Specimens. *BioMed Research International*. 2014; 2014: 1-5.

Gouveia GR, Ferreira SC, Siqueira SAC, Pereira J. Nucleic Acids Extraction from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues. In: *Nucleic Acids - From Basic Aspects to Laboratory Tools*. InTech Open Science, 2016. Disponível em: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/49457.pdf>

Grady C. Ethical Principles in Clinical Research. Chapter 2 in Gallin J (ed). *Principles and Practice of Clinical Research*. New York: Academic Press; 2002: 15-26.

Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol*. 2003; 4(9): 117.

Gregoric B, Zadnik V, Novakovic BJ. The diffuse large B-cell lymphoma – where do we stand now in everyday clinical practice. *Radiol Oncol*. 2012; 46(2): 153–159.

Gu X, Lundqvist EM, Coates PJ, Thurfjell N, Wettersand E, Nylander K. Dysregulation of Tap63 mRNA and protein levels in psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2006; 126(1): 137-41.

Guilherme RS, Caputto LZ, Fonseca ALA, Pereira J, Fonseca FLA. Exames laboratoriais complementares indicados no apoio ao diagnóstico do linfoma difuso de grandes células B (LDGCB). *Arq Bras Ciênc Saúde*. 2008; 33(3): 185-194.

Gündüz E, Dinçer M, Yıldız G, Bal C, Gülbas Z. The Frequency and Clinical Relevance of Multidrug Resistance Protein Expression in Patients with Lymphoma. *Turk J Hematol*. 2012; 29: 120-125

Gupta D, Crosby ME, Almasan A, Maeklis RM. Regulation of CD20 expression by radiation-induced changes in intracellular redox status. *Free Radic Biol Med*. 2008; 44:614-623.

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; 341:16–23.

Habermann TM, Weller EA, Morrison VA, Gascoyne RD, Cassileth PA, Cohn JB, Dakhil SR, Woda B, Fisher RI, Peterson BA, Horning SJ. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006; 24: 3121-7.

Hallack Neto AE, Pereira J, Saboya R, Beitler B, Pracchia LF, Dulley FL, Chamone DAF. Estratificação de risco em linfoma difuso de grandes células B. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2006; 28(4): 296-300.

Hallack Neto AE. Estudo observacional do prognóstico e terapêutica dos portadores de linfoma difuso de grandes células B de IPIa de risco

intermediário alto e alto. Doutorado em Ciências Médicas. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.

Hardee J, Ouyang Z, Zhang Y, Kundaje A, Lacroute P, Snyder M. STAT3 targets suggest mechanisms of aggressive tumorigenesis in diffuse large B-cell lymphoma. *G3 (Bethesda)*. 2013; 9;3(12): 2173-85.

Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Claery ML, Delson G, Dewolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC, Grogan TM, Isaacson PG, Knowles DM, Mason DY, Muller-Hermelink HK, Pileri SA, Pires MG, Ralfikiser E, Warnks RG. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994; 84: 1361-1362.

Heckman CA, Duan H, Garcia PB, Boxer LM. Oct transcription factors mediate t(14;18) lymphoma cells survival by directly regulating bcl-2 expression. *Oncogene*. 2006; 25: 888-898.

Hofferond AV, Moss PHA. *Fundamentos em Hematologia*. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

Horvat M, Jezeršek Novaković B. Effect of response quality and line of treatment with rituximab on overall and disease-free survival of patients with B-cell lymphoma. *Radiol Oncol*. 2010, 44: 232-8.

Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Green T, Wu L, Balasubramanyam A, Liu W, Visco C, Li Y, Miranda RN, Montes-Moreno S, Dybkaer K, Chiu A, Orazi A, Zu Y, Bhagat G, Richards KL, Hsi ED, Choi WWL, Zhao X, Krieken JH, Huang Q, Huh J, Ai W, Ponzoni M, Ferreri AJM, Zhou F, Slack GW, Gascoyne RD, Tu M, Variakojis D, Chen W, Go RS, Piris MA, Møller MB, Medeiros LJ, Young KH. 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): 4021-4031.

Huang H, Xiao F, Chen FY, Wang T, Li JM, Wang JM, Cao JN, Wang C, Zou SH. Reassessment of the prognostic value of the International Prognostic Index and the revised International Prognostic Index in patients with diffuse large B-cell lymphoma: A multicentre study. *Exp Ther Med*. 2012; 4(3): 475–480.

Hunt KE, Reichard KK. Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2008; 132: 118-124.

Illidge T, Tolan S. Current treatment approaches for diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2008; 49(4): 663-676.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>>. Acesso em 21 de abril de 2014.

Iqbal J, Neppalli VT, Wright G, Dave BJ, Horsman DE, Rosenwald A, Lynch J, Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Campo E, Ott G, Muller-Hermelink K, Delabie J, Jaffe ES, Grogan TM, Connors JM, Vose JM, Armitage JO, Staudt LM, Chan WC. BCL2 Expression Is a Prognostic Marker for the Activated B-Cell–Like Type of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006; 24(6): 961-968.

Iqbal J, Meyer PN, Smith LM, Johnson NA, Vose JM, Greiner TC, Connors JM, Staudt LM, Rimsza L, Jaffe E, Rosenwald A, Ott G, Delabie J, Campo E, Braziel RM, Cook JR, Tubbs RR, Gascoyne RD, Armitage JO, Weisenburger DD, Chan WC. BCL2 Predicts Survival in Germinal Center B-cell–like Diffuse Large B-cell Lymphoma Treated with CHOP-like Therapy and Rituximab. *Clin Cancer Res*. 2011; 24(17): 7785-7795.

Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, Scott DW, Tan KL, Steidl C, Sehn LH, Chan WC, Iqbal J, Meyer PN, Lenz G, Wright G, Rimsza LM, Valentino C, Brunhoeber P, Grogan TM, Braziel RM, Cook JR, Tubbs RR, Weisenburger DD, Campo E, Rosenwald A, Ott G, Delabie J, Holcroft C, Jaffe ES, Staudt LM, Gascoyne RD. 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): 3452-3459.

Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia Celular e Molecular*. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

Kang J, Gemberling M, Nakamura M, Whitby FG, Handa H, Fairbrother WG, Tantin D. A general mechanism for transcription regulation by Oct1 and Oct4 in response to genotoxic and oxidative stress. *Genes Dev.* 2009; 23: 208-222.

Kaplan E, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *American Statistical Association Journal.* 1958; 53: 457-481.

Karakashev SV, Reginato MJ. Progress toward overcoming hypoxia-induced resistance to solid tumor therapy. *Cancer Manag Res.* 2015; 7: 253–264.

Kaspers GJL, Pieters R, Veerman AJP, editores. Drug resistance in leukemia and lymphoma III. *Advances in experimental medicine and biology.* New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999. v.457.

Kirkwood BR, Sterne JAC. *Essential medical statistics.* 2.ed. Massachusetts: Blackwell Science, 2006.

Kleinbaum DG. *Survival analysis: a self-learning text.* New York: Springer, 1996.

Klumb CE. Biologia e Patogênese dos Linfomas Não Hodgkin de origem B na infância: uma revisão. *Rev Bras Cancerol.* 2001; 43(3): 291-01.

Kossakowska AE, Urbanski SJ. Differentiation of human B-cell malignant lymphomas is independent of the octamer lymphoid specific binding factor (Oct-2). *Immunology*. 1991; 74: 37-43.

Kotliar N, Koziner B. Aplicaciones de la reaccion em cadena de la polimerasia (PCR) em oncohematologia. *Medicina*. 1995; 55:159-166.

Kramer MHH, Hermans J, Parker J, Krol ADG, Kluin-Nelemans JC, Haak HL, van Groningen K, van Krieken JHJM, Jong D, Kluin PM. Clinical significance of bcl2 e p53 protein expression in Diffuse Large B-Cell Lymphoma: a population-based study. *J Clin Oncol*. 1996; 14(7): 2131-2138.

Lenz G, Staudt LM. Aggressive lymphomas. *N Engl J Med*. 2010; 362(15):1417-29.

Li S, Lin P, Favad LE, Lennon PA, Miranda RN, Yin CC, Lin E, Medeiros JL. Doublehit BCL2/MYC translocations in a consecutive cohort of patients with large B-cell lymphoma - a single centre's experience. *Eur J Haematol*. 2012; 89: 63-71.

Liu Q, Ohshima K, Kikuchi M. High expression of MDR-1 gene and P-glycoprotein in initial and re-biopsy specimens of relapsed B-cell lymphoma. *Histopathology*. 2001; 38: 209-216.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25(4): 402-408.

Lossos IS, Czerwinski DK, Wechser MA, Levy R. Optimization of quantitative real-time RT-PCR parameters for the study of lymphoid malignancies. *Leukemia*. 2003;17(4):789-95.

Lossos IS, Czerwinski DK, Alizadeh AA, Wechser MA, Tibshirani R, Botstein D, Levy R. Prediction of Survival in Diffuse Large-B-Cell Lymphoma Based on the Expression of Six Genes. *N Engl J Med*. 2004; 350: 1828-37.

Lossos IS. Molecular Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2005; 23(26): 6351-6357.

Lossos IS, Morgensztern D. Prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006; 24: 995-1007.

Maddox J, Shakya A, South S, Shelton D, Andersen JN, Chidester S, Kang J, Gligorich KM, Jones DA, Spangrude GJ, Welm BE, Tantin D. Transcription factor Oct1 is a somatic and cancer stem cell determinant. *PLOS Genet*. 2012; 8(11): 1-14.

Malumbres R, Chen J, Tibshirani R, Johnson NA, Sehn LH, Natkunam Y, Briones J, Advani R, Connors JM, Byrne GE, Levy R, Gascoyne RD, Lossos IS. Paraffin-based 6-gene model predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. *Blood*. 2008; 111(12): 5509–5514.

Marcelino CRB. Verificação de sobrevida em pacientes com Linfoma Não-Hodgkin atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina. Trabalho de Conclusão de Curso. Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2009.

Martelli M, Ferrerib AJM, Agostinell C, Roccoa AD, Pfreundschuhd M, Pileri SA. Diffuse large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013; 87: 146–171.

Matolcsy A, Chadburn A, Knowles DM. De novo CD5-positive and Bicheter's syndrome-associated diffuse large B cell lymphomas are genotypically distinct. *Am J Pathol*. 1995; 147: 207-216.

McCluggage WG, Kennedy K, Busam KJ. An immunohistochemical study of cervical neuroendocrine carcinomas: neoplasms that are commonly TTF1 positive and which may express CK20 and P63. *Am J Surg Pathol*. 2010; 34(4): 525-532.

McCune RC, Syrbu SI, Vasef MA. Expression profiling of transcription factors Pax-5, Oct-1, Oct-2, BOB.1 and PU.1 in Hodgkin's and non-Hodgkin's

lymphomas: a comparative study using high throughput tissue microarrays. *Mod Pathol.* 2006; 19: 1010-1018.

Meier VS, Ruffe A, Gudat F. Simultaneous evaluation of T- and B-cell clonality, t(11;14) and t(14;18), in a single reaction by a four-color multiplex polymerase chain reaction assay and automated high-resolution fragment analysis. *Am J Pathol.* 2001; 159(6): 2031-2043.

Miller DR. A tribute to Sidney Farber – the father of modern chemotherapy. *Br J Haematol.* 2006; 134: 20-26.

Morgan EE, Chandler MP, Young ME, McElfresh TA, Kung TA, Rennison JH, Tserng KY, Hoit BD, Stanley WC. Dissociation between gene and protein expression of metabolic enzymes in a rodent model of heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2006; 8(7): 687-93.

Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, Reyes F, Gaulard P, Coiffier B. 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): 715-716.

Mota SMB. Linfoma Não-Hodgkin Difuso de Grandes Células B: características clínicas, tratamento e prognóstico com os esquemas quimioterápicos CHOP e CHOP-BLEO. Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2006.

Nambiar M, Choudhary B, Rao CR, Raghavan SC. Amplification of chromosomal translocation junctions from paraffin-embedded tissues of follicular lymphoma patients. *Biomed Mater*. 2008; 3: 1-7.

National Cancer Institute. Disponível em <http://seer.cancer.gov/data/>. Acesso em 24 de julho de 2012.

Niehans GA, Jaszc W, Brunetto V, Perri RT, Gajl-Peczalska K, Wick MR, Tsuruo T, Bloomfield CD. Immunohistochemical identification of P-glycoprotein in previously untreated diffuse large cell and immunoblastic lymphomas. *Cancer Res*. 1992; 52: 3768-3775.

Niitsu N, Okamoto M, Miura I, Hirano M. Clinical features and prognosis of de novo diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-MYC translocations. *Leukemia*. 2009; 23: 777-83.

Novak U, Pasqualucci L, Dalla-Favera R. Lymphomas. In: DeVita Jr VT, Lawrence TS, Rosenberg AS. *Primer of the Molecular Biology of Cancer. Cancer: Principles e Practice of Oncology*. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2011.

Obinata D, Takayama K, Urano T, Murata T, Kumagai J, Fujimura T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Homma Y, Ouchi Y, Takahashi S, Inoue S. Oct1 regulates cell growth of LNCaP cells and is a prognostic factor for prostate cancer. *Int J Cancer*. 2012; 130: 1021-28.

Ok CY, Chen J, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Manyam GC, Li L, Visco C, Montes-Moreno S, Dybkær K, Chiu A, Orazi A, Zu Y, Bhagat G, Richards KL, Hsi ED, Choi WW, Van Krieken JH, Huh J, Zhao X, Ponzoni M, Ferreri AJ, Bertoni F, Farnen JP, Muller MB, Piris MA, Winter JN, Medeiros LJ, Young KH. Clinical implications of phosphorylated STAT3 expression in De Novo diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2014; 20(19):5113-23.

Pagnano KBB. Avaliação das proteínas reguladoras do ciclo celular e apoptose nos linfomas não-Hodgkin agressivos e influência na resposta ao tratamento. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2004; 26(2): 149-150.

Pedersen MO, Gang AO, Poulsen TS, Knudsen H, Lauritzen AF, Nielsen SL, Gang UO, Norgaard P. Doublehit BCL2/MYC translocations in a consecutive cohort of patients with large B-cell lymphoma - a single centre's experience. *Eur J Haematol.* 2012; 89: 63-71.

Pettit CK, Zukerberg LR, Gray MH, Ferry JA, Rosenberg AE, Harmon DC, Harris NL. Primary lymphoma of bone. A B-cell neoplasm with a high frequency of multilobated cells. *Am J Surg Pathol.* 1990; 14: 329-334.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29(9): e45.

Pfreundschuh M, Trümper L, Osterborg A, Pettengell R, Trneny M, Imrie K, Ma D, Gill D, Walewski J, Zinzani PL, Stahel R, Kvaloy S, Shpilberg O, Jaeger U, Hansen M, Lehtinen T, López-Guillermo A, Corrado C, Scheliga A, Milpied N, Mendila M, Rashford M, Kuhnt E, Loeffler M. MabThera International Trial Group. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol.* 2006; 7: 379-91.

Piris M, Brown DC, Gatter KC, Mason DY. CD30 expression in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology.* 1990; 17: 211-218.

Project TIN-HSLPF. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's Lymphoma. The International non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med* . 1993; 399(14): 987-994.

Qian J, Kong X, Deng N, Tan P, Chen H, Wang J, Li Z, Hu Y, Zow W, XuJ, Fang JY. OCT1 is a determinant of synbindin-related ERK signalling with independent prognostic significance in gastric cancer. *Gut.* 2015;64(1):37-48.

Rezende BCG, Levy D, Lucas SRR, Bydlowski SP. Mecanismos de resistência a múltiplas drogas. *Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia.* 2005; 30: 113-119.

Robins DB, Katz RL, Suan F, Ordonez Jr NG, Huh YO. Immunotyping of Lymphoma by fine-needle aspiration – A comparative study of cytopsin preparation and flow citometry. *Am J Clin Pathol.* 1994; 101: 569-576.

Rodriguez C, Commes T, Robert J, Rossi JF. Expression of P-glycoprotein and anionic glutathione S-transferase genes in non Hodgkin's lymphomas. *Leuk Res.* 1993; 17: 149-156.

Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, Gascoyne RD, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Giltane JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Yang L, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Powell J, Duffey PL, Longo DL, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Montserrat E, López-Guillermo A, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Delabie J, Holte H, Krajci P, Stokke T, Staudt LM. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for Diffuse Large-B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2002; 346(25):1937-1947.

Sáez AI, Artiga MJ, Sánchez-Beato M, Sánchez-Verde L, García JF, Camacho FI, Franco R, Piris MA. Analysis of Octamer-Binding Transcription Factors Oct2 and Oct1 and their coactivator BOB.1/OBF.1 in Lymphomas. *Mod Pathol.* 2002; 15(3): 211-220.

Sapienza MT, Marone MMS, Chiattoni CS. Contribuição da medicina nuclear para avaliação dos linfomas. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2001; 23(2): 79-92.

Schild-Poulter C, Shih A, Tantin D, Yarymowich NC, Soubeyrand S, Sharp PA, Hache RJG. DNA-PK phosphorylation sites on Oct-1 promote cell survival following DNA damage. *Oncogene*. 2007; 26: 3980–3988.

Schindler R, Clark BD, Dinarello CA. Dissociation between interleukin-1 beta mRNA and protein synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem*. 1990; 265(18): 10232-10237.

Shahi PK, Manga GP. Linfoma B difuso de células grandes. *Medicina Clinica (Barcelona)*. 2006; 127(1): 17-21.

Shen Y, Iqbal J, Huang JZ, Zhou G, Chan WC. BCL2 protein expression parallels its mRNA level in normal and malignant B cells. *Blood*. 2004; 104(9): 1-5.

Sehn LH, Donaldson J, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Klasa R, McPherson N, O'Reilly S, Spinelli JJ, Sutherland J, Wilson KS, Gascoyne RD, Connors JM. Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 5027-33.

Shih LY, Liang DC. Non-Hodgkin's lymphomas in Asia. *Hematol Oncol Clin N America*. 1991; 5: 983-1001.

Shivakumar L, Armitage JO. Bcl-2 gene expression as a predictor of outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Lymphoma e Myeloma*. 2006; 6(6): 455-457.

Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica. Linfomas não-Hodgkin. Disponível em: <http://www.sbcancer.org.br/home2/site/index.php?option=com_contentview=articleid=120:linfomasecatid=29&Itemid=123>. Acesso em 06 de julho de 2016.

Stetler-Stevenson M, Braylan RC. Flow cytometric analysis of lymphomas and lymphoproliferative disorders. *Semin Hematol*. 2001; 32(2): 111-123.

Stone MJ. Thomas Hodgkin: medical immortal and uncompromising idealista. *BUMC Proceedings*. 2005; 18:368–375 2005

Swerts K, Moerloose BD, Dhooge C, Laureys G, Benoit Y, Philippé J. Significance of multidrug resistance-related proteins in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer*. 2006; 42: 295-309.

Tantin D, Schild-Poulter C, Wang V, Haché RJ, Sharp PA. The octamer binding transcription factor Oct-1 is a stress sensor. *Cancer Res*. 2005; 65(23):10750-8.

Thunberg U, Amini RM, Linderöth J, Roos G, Enblad G, Berglund M. Bcl-2 expression in *de novo* Diffuse Large B-Cell Lymphoma partly reflects normal differences in age distribution. *British Journal of Haematology*. 2009; 1-2.

Tilly H, Dreyling M. Diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2010; 21(5): 172-174.

Tomita A, Hiraga J, Kiyoi H, Ninomiya M, Sugimoto T, Ito M, Kinoshita T, Naoe T. Epigenetic regulation of CD20 protein expression in a novel B-cell lymphoma cell line, RRBL1, established from a patient treated repeatedly with rituximab-containing chemotherapy. *Int J Hematol.* 2007; 49-57.

Trembley JH, Ebbert JO, Kren BT, Steer CJ. Differential regulation of cyclin B1 RNA and protein expression during hepatocyte growth in vivo. *Cell Growth Diff.* 1996; 7(7): 903-916.

Van Baarlen J, Schuurman HJ, Van Unnik JA. Multilobated non-Hodgkin's Lymphoma. A clinicopathologic entity. *Cancer.* 1998; 61: 1371-1376.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe B, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genoma Biol.* 2002; 7:1-12.

Veloso GDC, Clementino NCD. Linfoma Não-Hodgkin: revisão morfológica, clínica, tratamento e evolução. Experiência UFNG no período de 2000 a 2005. Dissertação de mestrado. UFMG, 2007.

Visco C, Tzankov A, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Tai YC, Li Y, Liu W, D'Amore ESG, Li Y, Montes-Moreno S, Dybkær K, Chiu A, Orazi A, Zu Y, Bhagat G, Wang HY, Dunphy CH, O'Neill S, Hsi ED, Zhao FX, Choi WWL, Zhao X, Krieken JH, Weiyun AH, Ponzoni MA, Ferreri AJM, Kahl BS, Winter JN, Go RS, Dirnhofer S, Piris MA, Møller MB, Wu L, Medeiros LJ, Young KH. Patients with diffuse large B cell lymphoma of germinal center origin with BCL2 translocations have poor outcome, irrespective of MYC status: a report from an International DLBCL rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Haematologica*. 2013; 98(2):255-63.

Wagner-Souza K, Meletti-de-Oliveira MC, Maia RC, Rumjanek VM. Ciclosporina A e seus análogos como reversores da resistência a múltiplas drogas em células tumorais. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2003; 49(2): 103-112.

Wang Z, Zhu S, Shen M, Liu J, Wang M, Li C, Wang Y, Deng A, Mei Q. STAT3 is involved in esophageal carcinogenesis through regulation of Oct-1. *Carcinogenesis*. 2013; 34(3): 678–688.

Wilson WH, Dunleavy K, Pittaluga S, Hedge U, Grant N, Steinberg SM, Raffeld M, Gutierrez M, Chabner BA, Staudt L, Jaffe ES, Janik JE. 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): 2717-2724.

World Health Organization (WHO). *Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008.

Wu G, Keating A. Biomarkers of potential prognostic significance in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Cancer*. 2006; 106(2): 247-257.

Xavier FD. Padrão de expressão e significado prognóstico dos genes BCL2, BCL6, CCND2, FN1, LMO2 e SCYA3 pela técnica de PCR em tempo real em linfoma difuso de grandes células B tratado com rituximabe. Doutorado em Ciências Médicas. Universidade de São Paulo, 2013.

Xiao S, Liao S, Zhou Y, Jiang B, Li Y, Xue M. High expression. High expression of octamer transcription factor 1 in cervical cancer. *Oncol lett*. 2014; 7: 1889-94.

Yuen AR, Branimir IS. Multidrug Resistance in Lymphomas. *J Clin Oncol*. 1994; 12(11): 2453-2459.

Zenkov AN, Scvortsova NV, Chernolovskaya EL, Pospelova TI, Vlassov VV. Expression of the MDR1 and MRP genes in patients with lymphoma with primary bone marrow involvement. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2004; 23(6-7): 843-7.

Zhao H, Jin S, Fan F, Fan W, Tong T, Zhan Q. Activation of the Transcription Factor Oct-1 in Response to DNA Damage. *Cancer Res*. 2000; 60: 6276–6280.

Zhao WL, Wang L, Liu YH, Yan JS, Leboeuf C, Liu YY, Wu WL, Janin A, Chen Z, Chen SJ. Combined effects of histone deacetylase inhibitor and rituximab on non-Hodgkin's B-lymphoma cells apoptosis. *Exp Hematol*. 2007; 35:1801–1811.

Zhenilo S, Deyev I, Serov S, Polanovsky O. Regulation of oct-1 gene transcription is diferente in lymphoid and non-lymphoid cells. *Biochimie*. 2003; 85: 715-718.