FLÁVIA DIAS XAVIER

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

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 Hemostasia

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

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Xavier, Flávia Dias

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 / Flávia Dias Xavier. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientadora: Juliana Pereira.

Descritores: 1.Linfoma difuso de grandes células B 2.Linfoma difuso de grandes células B/efeitos de drogas 3.Expressão gênica 4.Reação em cadeia da polimerase em tempo real 5.Quimioterapia 6.Prognóstico 7.Análise de sobrevida 8.Resultado de tratamento 9.Genes bcl-2/efeitos de drogas

USP/FM/DBD-115/13

Nome: Xavier, Flávia Dias

Título: 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

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
Hemostasia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Eduardo e Tânia, exemplos de força, sabedoria, dedicação e caráter, pela educação, incentivo, carinho, amor e apoio incondicional ao longo da minha vida.

A meu marido Fernando, com amor e admiração, por sempre acreditar em mim e me apoiar, pelas renúncias que precisou fazer para tornar meus sonhos possíveis, por compreender meus momentos de ausência, pelo seu amor, companheirismo e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Juliana Pereira, pelo apoio, atenção, ensinamentos e orientações ao longo da minha carreira na Hematologia e na realização dessa tese.

À Débora Levy e demais colegas do laboratório, pela amizade, apoio e colaboração nos exames de biologia molecular essenciais para a realização dessa tese.

Ao Professor Dalton de Alencar Fischer Chamone pelo apoio e incentivo ao longo da minha carreira na Hematologia.

À Dra. Sheila Aparecida Coelho Siqueira e ao Dr. Henrique Moura de Paula, pela contribuição com a revisão do diagnóstico anatomopatológico das biópsias.

Ao Dr. Sergio Paulo Bydlowski, por colocar à disposição a área do Laboratório de Genética e Hematologia Molecular – LIM31 do HC-FMUSP.

Ao Dr. José Cláudio Meneghetti e sua equipe da Medicina Nuclear, pela contribuição com a análise dos exames de PET *scan* e PET/TC.

À Dra. Rose-Ann Padua do Institut Universitaire d'Hématologie do Hôpital Saint-Louis pela preparação dos plasmídeos e à Dra. Diana Paez da Agência Internacional de Energia Atômica pelo fornecimento dos plasmídeos.

Aos meus colegas da Hematologia e ao corpo de enfermagem que de alguma forma contribuíram com esse projeto.

Ao meu cunhado Alessandro, pela revisão final dos textos em inglês.

Aos pacientes e seus familiares, sem os quais essa pesquisa não seria possível.

“Alguns homens vêm as coisas como são, e dizem 'Por quê?' Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo 'Por que não?'”

George Bernard Shaw

RESUMO

XAVIER, F.D. **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.** São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Introdução: O linfoma difuso de grandes células B é o mais freqüente grupo de linfoma não-Hodgkin, perfazendo quase 50% dos casos no serviço de hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Instituto do Câncer do Estado de São Paulo. Possui heterogeneidade clínica e biológica traduzida em mais de vinte subtipos na Organização Mundial da Saúde. Sua terapêutica se baseia na associação do anticorpo monoclonal anti-CD20 e quimioterapia com antracíclico, esquema que resulta em 43,5% de sobrevida global em 10 anos. Determinantes de prognóstico clínico como o Índice Internacional de Prognóstico e o Índice Internacional de Prognóstico Revisado carecem de acurácia, pois até 20% dos pacientes de baixo risco falecerão da doença e 60% dos pacientes de alto risco estarão vivos em quatro anos. Essas discrepâncias podem, em parte, ser atribuídas a fatores genéticos. A assinatura gênica do linfoma difuso de grandes células B tipo centro germinativo apresenta sobrevida global superior ao tipo células B ativadas (76% *versus* 16%, $p=0,01$), contudo o perfil de expressão gênica por *microarray* ainda não está disponível na prática clínica. Entretanto, o escore preditivo de mortalidade para linfoma difuso de grandes células B baseado no valor prognóstico da expressão dos genes BCL2, BCL6, CCND2, FN1, LMO2 e SCYA3 por PCR em tempo real quantitativa mostrou-se independente do Índice Internacional de Prognóstico na era pré-rituximabe. Mas não foi significativa em pacientes de alto risco clínico tratados com R-CHOP. Os genes BCL2, CCND2 e SCYA3 integram a assinatura de células B ativadas, BCL6 e LMO2 a do centro germinativo e FN1 a linfonodal. **Objetivo:** Avaliar o impacto da expressão absoluta dos genes BCL2, BCL6, CCND2, FN1, LMO2 e SCYA3 em população brasileira com linfoma difuso de grandes células B tratada com R-CHOP em relação à resposta global, sobrevida livre de doença, sobrevida livre de progressão e sobrevida global. **Métodos:** A expressão gênica foi analisada por PCR em tempo real quantitativa de RNA extraído de amostras parafinadas de 63 pacientes, porém foi avaliável em 42. Seus valores foram normatizados pelo gene endógeno ABL e transformados em escala logarítmica na base 2 para posterior correlação com variáveis

clínicas e de desfecho. **Resultados:** Com mediana de seguimento de 29 meses, as sobrevidas global, livre de doença e livre de progressão foram, respectivamente, 82,8%, 97,14% e 87,53%, enquanto a resposta completa foi 82,5%. A expressão de LMO2 >3 logs e BCL6 $>3,5$ logs definiu um grupo de maior sobrevida global (91% *versus* 64,3%, $p=0,040$) e sobrevida livre de doença (95,5% *versus* 70,7%, $p=0,03$), independentemente do Índice Internacional de Prognóstico ($p=0,010$ e $p=0,042$) e com significativa hiperexpressão do SCYA3 ($p=0,046$). Não se observou associação entre escore preditivo de mortalidade baseado nos seis genes e prognóstico. Assim, foi criado novo escore genético prognóstico baseado no poder da expressão concomitante de LMO2 e CCND2, definindo-se grupos de baixo risco ($<2,5$) e alto risco ($\geq 2,5$) com distintas sobrevidas global (92,4% *versus* 57,1%, $p=0,011$) e livre de progressão (96,2% *versus* 66,7%, $p=0,013$), independentes do IPI. **Conclusão:** Em pacientes com linfoma difuso de grandes células B tratados com R-CHOP, a hiperexpressão de BCL6, LMO2 e SCYA3 correlacionou-se com melhor prognóstico. O novo escore genético prognóstico definido por LMO2 e CCND2 estratificou grupos de risco de prognósticos distintos independentes do Índice Internacional de Prognóstico.

Palavras-chave: 1.Linfoma difuso de grandes células B 2.Linfoma difuso de grandes células B/efeitos de drogas 3.Expressão gênica 4.Reação em cadeia da polimerase em tempo real 5.Quimioterapia 6.Prognóstico 7.Análise de sobrevida 8.Resultado de tratamento 9.Genes bcl-2/efeitos de drogas

ABSTRACT

XAVIER, F.D. **Gene expression profile and prognostic significance of the genes BCL2, BCL6, CCND2, FN1, LMO2 and SCYA3 by means of real-time PCR technique in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab.** São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2013.

Introduction: Diffuse large B-cell lymphoma is the most common type of non-Hodgkin lymphoma; which accounts for almost 50% of the cases at the Hematology Department of Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo and Instituto do Câncer do Estado de São Paulo. Its clinical and biological heterogeneity results in more than twenty subtypes according to the World Health Organization classification. Its treatment is based on a combination of anti-CD20 monoclonal antibody and anthracycline-based chemotherapy, with a 10-year overall survival of 43.5%. Clinical prognostic determinants such as the International Prognostic Index and the Revised International Prognostic Index lack accuracy, since up to 20% of low-risk patients will die from the disease and up to 60% of high-risk patients will be alive within four years. Such discrepancies can partially be attributed to genetic factors. Diffuse large B-cell lymphoma germinal center gene signature shows superior overall survival compared to activated B-cell signature (76% versus 16%, $p=0.01$), however microarray gene expression profile is not yet available in clinical practice. Nonetheless, the Mortality Predictor Score for diffuse large B-cell lymphoma based on the prognostic value of BCL2, BCL6, CCND2, FN1, LMO2 and SCYA3 gene expression by quantitative real-time PCR has proved to be independent from the International Prognostic Index in the pre-rituximab era. But it was not significant in high clinical risk patients treated with R-CHOP. The genes BCL2, CCND2 and SCYA3 compose activated B-cell signature, whereas BCL6 and LMO2 compose the germinal center signature and FN1 the lymph-node signature. **Objective:** Evaluate the impact of BCL2, BCL6, CCND2, FN1, LMO2 and SCYA3 absolute gene expression in Brazilian population diagnosed with diffuse large B-cell lymphoma and treated with R-CHOP, with respect to overall response, disease free survival, progression free survival and overall survival. **Methods:** Gene expression was analyzed by quantitative real-time PCR of RNA extracted from paraffin-embedded samples of 63 patients, although evaluable in 42. Their values were normalized by endogenous gene ABL and log-

transformed on a base 2 scale for subsequent correlation with clinical and outcome variables.

Results: With a median follow-up of 29 months, overall survival, disease free survival and progression free survival accounted for 82.8%, 97.14% and 87.53% respectively, while complete response was 82.5%. The expression of LMO2>3logs and BCL6>3.5logs defined a group with higher overall survival (91% versus 64.3%, $p=0.040$) and progression free survival (95.5% versus 70.7%, $p=0.03$), independent of International Prognostic Index ($p=0.010$ and $p=0.042$) and with significant overexpression of SCYA3 ($p=0.046$). It was not identified any association between six gene Mortality Predictor Score and prognosis. As a result, we developed the New Genetic Prognostic Score based on the power of concomitant expression of LMO2 and CCND2, defining low-risk (<2.5) and high-risk (≥ 2.5) groups with distinct overall survival (92.4% versus 57.1%, $p=0.011$) and progression free survival (96.2% versus 66.7%, $p=0.013$), independent of International Prognostic Index. **Conclusion:** In patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP, hyperexpression of BCL6, LMO2 and SCYA3 was correlated with a better prognosis. The New Genetic Prognostic Score, defined by LMO2 and CCND2, stratified risk groups with different prognosis, independent of International Prognostic Index.

Key words: 1.Diffuse large B-cell lymphoma. 2. Diffuse large B-cell lymphoma/drug effect 3.Gene expression. 4.Real-time polymerase chain reaction 5.Chemotherapy. 6.Prognosis 7.Survival analysis 8.Treatment result 9.Bcl-2 Genes /drug effect

LISTA DE SIGLAS

ACVBP	Adriamicina, ciclofosfamida, vindesina, bleomicina e prednisona
AKT	Proteína quinase B
ALK	<i>Anaplastic lymphoma kinase</i>
AP-1	Proteína ativadora-1
APC	Células apresentadoras de antígenos
ATMO	Transplante Autólogo de Medula Óssea
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia and Rad3 related</i>
<i>BCL2</i>	<i>B-cell lymphoma 2</i>
<i>BCL6</i>	<i>B-cell lymphoma 6</i>
BCL-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BCR	Receptor de células B
BEAM	BCNU (carmustina), etoposide, citarabina e melfalan
BLIMP1	O mesmo que PRDM1
BMP6	Proteína Morfogenética Óssea 6
CBA	Células B Ativadas
CCL3	<i>Chemokine (C-C motif) Ligand 3</i>
CCND2	Ciclina D2
CD10	Cluster de diferenciação 10
CDK	Quinase dependente de ciclina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CG	Centro Germinativo
CHOEP	Ciclofosfamida, hidroxidaunorrubicina, vincristina, etoposide e prednisona
CHOP	Ciclofosfamida, hidroxidaunorrubicina, vincristina e prednisona
CMH	Complexo Maior de Histocompatibilidade
Ct	<i>Cycle Threshold</i> ou ciclo limiar
DHL	Desidrogenase láctica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBV	Vírus Epstein-Barr
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group (status performance)</i>

EPM	Escore Preditivo de Mortalidade
ERK 1/2	Quinase reguladora do sinal extracelular ½
EV	Via endovenosa
FDG	2-F18-fluoro-2-deoxi-glicose
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FN1	Fibronectina 1
FOXP1	<i>Forkhead box P1</i>
GCET1	<i>Germinal Center B Cell-expressed transcript-1</i>
GELA	<i>Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte</i>
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HHV8	Herpesvírus Humano 8
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HR	<i>Hazard ratio</i> ou razão de risco
HTLV I/II	Vírus T-Linfotrópico Humano I e II
IC	Intervalo de confiança
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
Ig	Imunoglobulina
IHQ	Imuno-histoquímica
IKB	Inibidor do fator nuclear kapa B
IKK	Inibidor da quinase do fator nuclear kapa B
IL-10	Interleucina 10
IL-10R	Receptor de interleucina-10
IPI	Índice Internacional de Prognóstico
IPIai	Índice Internacional de Prognóstico Ajustado para Idade
IRF4	Fator regulatório de interferon 4
LDGCB	Linfoma Difuso de Grandes Células B
LDGCB-CBA	Linfoma Difuso de Grandes Células B tipo Células B Ativadas
LDGCB-CG	Linfoma Difuso de Grandes Células B tipo Centro Germinativo
LDGCB-NCG	Linfoma Difuso de Grandes Células B Não-Centro Germinativo
LMO2	<i>LIM domain only 2</i>
LNH	Linfoma Não-Hodgkin
MACOP-B	Metotrexate, adriamicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona,

	bleomicina
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
m-BACOD	Bleomicina, adriamicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona
MEK1/2	Proteína quinase ativada por mitógeno/Quinase reguladora do sinal extracelular ½
MInT	<i>Mabthera International Trial</i>
MIP-1-alfa	Proteína inflamatória de macrófago-1-alfa
MUM1	Oncogene Mieloma Múltiplo 1
NA	Não Avaliável
NCG	Não-Centro Germinativo
NEGP	Novo Escore Genético de Prognóstico
NF _κ B	Fator Nuclear Kapa B
NIK	<i>NFκB inducing kinase</i>
NR	Não Reportado
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAX-5	<i>Paired box protein</i>
PDK-1	Proteína quinase 1 dependente do fosfoinosítídeo
PET	Tomografia por Emissão de Pósitrons
PET2/3/4	PET após 2 ciclos /após 3 ciclos/ após 4 ciclos de quimioterapia
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PMitCEBO	Mitoxantrona, ciclofosfamida, etoposide, vincristina, bleomicina e prednisona
pRb	Produto do gene do Retinoblastoma
PRDM1	<i>PR domain zinc finger protein 1</i>
ProMACE-CytaBOM	Prednisona, doxorrubicina, ciclofosfamida, etoposide, citarabina, bleomicina, vincristina, metotrexate
qRT-PCR	Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa em tempo real
R-ACVBP	Rituximabe, doxorrubicina, ciclofosfamida, vindesina, bleomicina e prednisona
RC	Resposta Completa ou Remissão Completa
R-CHOP	Rituximabe, ciclofosfamida, hidroxidaunorrubicina, vincristina e prednisona

R-DHAP	Rituximabe, dexametasona, citarabina em altas doses e cisplatina
RG	Resposta Global
R-ICE	Rituximabe, ifosfamida, etoposide e carboplatina
RIPI	Índice Internacional de Prognóstico Revisado
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
RP	Resposta Parcial
SCYA3	<i>Small Inducible Cytokine A3</i>
SG	Sobrevida Global
SLD	Sobrevida Livre de Doença
SLE	Sobrevida Livre de Eventos
SLP	Sobrevida Livre de Progressão
SLR	Sobrevida Livre de Recaída
SP1	Proteína da especificidade 1
SPD	Soma do produto dos diâmetros dos seis maiores linfonodos/massas linfonodais
STAT1/3/5	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1/3/5
SUS	Sistema Único de Saúde
TA	Temperatura Ambiente
TC	Tomografia Computadorizada
TST	Tempo entre início dos sintomas e início do tratamento
VO	Via oral
XBP1	<i>X-box binding protein 1</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Regiões linfonodais.....	30
Figura 2 –	Estadiamento de Ann Arbor.....	31
Figura 3 –	Papel do gene BCL6 no desenvolvimento dos linfócitos B.....	47
Figura 4 –	Inibição das vias de apoptose do BCL2 e do BCLxL pelo rituximabe.....	51
Figura 5 –	Participação da CCND2 no ciclo celular.....	52
Figura 6 –	Etapas do processo de extração do RNA a partir de amostras fixadas em formol e incluídas em parafina.....	69
Figura 7 –	Etapas da síntese de cDNA e do qRT-PCR.....	72
Figura 8 –	Curva padrão dos genes ABL, BCL2, BCL6, CCND2, FN1, LMO2 e SCYA3.....	73
Figura 9 –	Matriz de combinação da expressão absoluta (em log na base 2) dos genes LMO2, BCL6, FN1, CCND2, BCL2 e SCYA3.....	75
Figura 10 –	Curva normal de distribuição com a representação do escore z.....	80
Figura 11 –	Casuística.....	81
Figura 12 –	Expressão absoluta e curvas normais dos genes da assinatura CG (BCL6 e LMO2), CBA (CCND2, SCYA3, BCL2) e Linfonodal (FN1).....	90
Figura 13 –	Expressão dos genes BCL2, CCND2, FN1 e SCYA3 nos pacientes do cluster-CG em relação aos demais pacientes.....	93
Figura 14 –	Sobrevida global e sobrevida livre de progressão entre os pacientes do cluster-CG e cluster-NCG.....	96
Figura 15 –	Sobrevida global conforme expressão do FN1.....	97
Figura 16 –	Expressão dos genes BCL2, BCL6, CCND2, FN1, LMO2 e SCYA3 nos grupos que apresentaram falha de tratamento em relação aos demais pacientes.....	97
Figura 17 –	Sobrevida global no nosso serviço na era pré-rituximabe (HC-FMUSP) e na era pós-rituximabe (HC/ICESP-FMUSP).....	128

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Valores obtidos para o novo escore genético de prognóstico.....	78
Gráfico 2 –	Prevalência de sítios primários.....	85
Gráfico 3 –	Duração das etapas desde o início dos sintomas até o início do tratamento dos pacientes com LDGCB.....	85
Gráfico 4 –	Resposta baseada nos critérios de Cheson.....	86
Gráfico 5 –	Número de ciclos de quimioterapia por paciente com LDGCB.....	87
Gráfico 6 –	Sobrevida global nos paciente com LDGCB.....	88
Gráfico 7 –	Sobrevida livre de doença nos pacientes com LDGCB.....	88
Gráfico 8 –	Sobrevida livre de progressão nos pacientes com LDGCB.....	89
Gráfico 9 –	Correlação entre a expressão dos genes LMO2 e BCL6.....	92
Gráfico 10 –	Sobrevida global e sobrevida livre de progressão em 3 anos dos pacientes com LDGCB conforme o EPM.....	100
Gráfico 11 –	Sobrevida global e sobrevida livre de progressão em 3 anos dos pacientes com LDGCB com IPI intermediário alto conforme o EPM.....	101
Gráfico 12 –	Sobrevida global e sobrevida livre de progressão em 3 anos dos pacientes com LDGCB com IPI de alto risco conforme o EPM.....	102
Gráfico 13 –	Sobrevida global e sobrevida livre de progressão em 3 anos dos pacientes com LDGCB com RIPI ruim conforme o EPM.....	103
Gráfico 14 –	Sobrevida global segundo novo escore genético de prognóstico nos pacientes com LDGCB.....	106
Gráfico 15 –	Sobrevida livre de progressão segundo novo escore genético de prognóstico nos pacientes com LDGCB.....	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Variantes, subgrupos e subtipos de linfoma difuso de grandes células B.....	29
Tabela 2 –	Estadiamento do linfoma não-Hodgkin.....	32
Tabela 3 –	Estadiamento de Lugano em comparação ao estadiamento de Ann Arbor.....	33
Tabela 4 –	Estado funcional pelo ECOG.....	34
Tabela 5 –	Prognóstico em linfoma difuso de grandes células B de acordo com o IPI na era pré-rituximabe.....	35
Tabela 6 –	Prognóstico em linfoma difuso de grandes células B em relação ao IPI na era pré-rituximabe.....	35
Tabela 7 –	Prognóstico em linfoma difuso de grandes células B em relação ao RIPI.....	36
Tabela 8 –	Definições de resposta ao tratamento.....	67
Tabela 9 –	Protocolo R-CHOP.....	68
Tabela 10 –	Volume dos reativos de acordo com a quantidade de RNA da amostra.....	71
Tabela 11 –	Mistura de DNase.....	71
Tabela 12 –	Análise univariada por regressão de Cox entre a expressão de cada gene em log na base 2 e a sobrevida global em LDGCB.....	76
Tabela 13 –	Análise multivariada por regressão de Cox entre as expressões dos genes LMO2 e CCND2 em log na base 2 e a sobrevida global em LDGCB.....	77
Tabela 14 –	Características dos pacientes com LDGCB tratados com R-CHOP excluídos por falha no RNA.....	82
Tabela 15 –	Características ao diagnóstico dos 42 pacientes com LDGCB incluídos.....	84
Tabela 16 –	Características dos pacientes do cluster-CG e do cluster-NCG.....	94
Tabela 17 –	Cálculo do EPM e estratificação de risco.....	99
Tabela 18 –	Características dos pacientes conforme novo escore genético de prognóstico.....	105

Tabela 19 –	Análise univariada dos fatores clínicos e laboratoriais para resposta completa e resposta global.....	109
Tabela 20 –	Análise univariada dos fatores genéticos para resposta completa e resposta global.....	110
Tabela 21 –	Análise univariada dos fatores clínicos e laboratoriais em relação à sobrevida global e sobrevida livre de progressão.....	113
Tabela 22 –	Análise univariada dos fatores genéticos em relação à sobrevida global e sobrevida livre de progressão.....	115
Tabela 23 –	Análise univariada da expressão gênica individual como variável contínua em relação à sobrevida global e sobrevida livre de progressão comparativamente aos resultados de Malumbres.....	116
Tabela 24 –	Análise multivariada de Cox do modelo de seis genes em relação à sobrevida global.....	117
Tabela 25 –	Análise multivariada de Cox em relação à sobrevida global.....	118
Tabela 26 –	Análise multivariada de Cox entre NEGP e IPI ou IPI adaptado para sobrevida global e sobrevida livre de progressão para LDGCB tratados com R-CHOP.....	118
Tabela 27 –	Análise multivariada de Cox do modelo dos seis genes estudados para sobrevida livre de progressão como variável dependente em LDGCB tratado com R-CHOP.....	120

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta
cm	Centímetro
dL	Decilitro
G	Grama
°C	Graus Celsius
x g	Gravidade
Gy	Gray
K	Kapa
L	Litro
$\geq$	Maior ou igual a
$>$	Maior que
$\pm$	Mais ou menos
$+$	Mais ou positivo
$\leq$	Menor ou igual a
$<$	Menor que
-	Menos ou hífen
m ²	Metro quadrado
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
μ m	Micrômetro
mg	Miligrama
mm ³	Milímetros cúbicos
mM	Milimol
'	Minutos
ng	Nanograma
nM	Nanômetro
n	Número absoluto
pmol	Picomol
%	Porcentagem
''	Segundos
TM	<i>Trademark</i> ou marca registrada
log	Unidade na escala logarítmica
U	Unidades
x	Vezez

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	26
2. 1 CLASSIFICAÇÃO DOS LINFOMAS NÃO-HODGKIN.....	26
2. 2 ESTADIAMENTO.....	30
2.3 ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO.....	34
2. 3. 1 Estratificação de risco clínica.....	34
2. 3. 1. 1 Índice Internacional de Prognóstico.....	34
2. 3. 1. 2 Índice Internacional de Prognóstico Ajustado para Idade.....	35
2. 3. 1. 3 Índice Internacional de Prognóstico Revisado.....	36
2. 3. 1. 4 Doença <i>Bulky</i>	36
2. 3. 2 Valor prognóstico da tomografia por emissão de pósitrons.....	37
2. 3. 3 Estratificação de Risco Biológica.....	39
2. 3. 3. 1 Algoritmos preditivos de prognóstico com base na expressão gênica.....	39
2. 3. 3. 2 Gene LMO2.....	44
2. 3. 3. 3 Gene BCL6.....	45
2. 3. 3. 4 Gene FN1.....	48
2. 3. 3. 5 Gene BCL2.....	49
2. 3. 3. 6 Gene CCND2.....	52
2. 3. 3. 7 Gene SCYA3.....	54
2. 4. TRATAMENTO.....	55
2. 4. 1 Quimioterapia.....	55
2. 4. 2 Radioterapia.....	57
2. 4. 3 Imunoterapia.....	58
2. 4. 4. Transplante de Medula Óssea.....	60
3 OBJETIVOS.....	63
3. 1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	63
3. 2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	63
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	64
4. 1 PACIENTES.....	64
4. 2 DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO.....	64

4. 3 ESTADIAMENTO.....	65
4.4 TRATAMENTO.....	68
4.5 MÉTODO MOLECULAR.....	69
4. 5. 1 Extração de RNA de amostras fixadas em formol e incluídas em parafina.....	69
4. 5. 2 Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa em tempo real.....	71
4. 6 CONSTRUÇÃO DA MATRIZ GÊNICA EM BUSCA DA ORIGEM CELULAR.....	74
4. 7 REPRODUÇÃO DO ESCORE PREDITIVO DE MORTALIDADE.....	75
4. 8 CONSTRUÇÃO DO NOVO ESCORE GENÉTICO DE PROGNÓSTICO.....	76
4. 9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	78
5 RESULTADOS.....	81
5.1 CASUÍSTICA.....	81
5. 2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-LABORATORIAIS.....	83
5. 3 TAXAS DE RESPOSTA.....	86
5. 4 CURVAS DE SOBREVIDA.....	88
5. 4. 1 Sobrevida Global.....	88
5. 4. 2 Sobrevida Livre de Doença.....	88
5. 4. 3 Sobrevida Livre de Progressão.....	89
5. 5. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES.....	89
5. 5. 1 Expressão absoluta dos genes.....	89
5. 5. 2 Expressão Gênica e Origem Celular em LDGCB.....	91
5. 5. 3 Escore preditivo de mortalidade e correlação com sobrevida global e sobrevida livre de progressão.....	98
5. 5. 4 Novo Escore Genético de Prognóstico e correlação com sobrevida global e sobrevida livre de progressão.....	103
5.6 FATORES DE PROGNÓSTICO DE RESPOSTA GLOBAL.....	108
5. 6. 1 Análise Univariada.....	108
5. 6. 2 Análise Multivariada.....	111
5.7 FATORES DE PROGNÓSTICO PARA SOBREVIDA GLOBAL.....	112
5. 7. 1 Análise univariada.....	112
5. 7. 2 Análise Multivariada.....	116
5. 8. FATORES DE PROGNÓSTICO PARA SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA.....	119

5. 9 FATORES DE PROGNÓSTICO PARA SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE PROGRESSÃO.....	119
5. 9. 1 Análise univariada.....	119
5. 9. 2 Análise multivariada.....	120
6 DISCUSSÃO.....	121
7 CONCLUSÃO.....	136
REFERÊNCIAS.....	137
ANEXO A – VALORES ABSOLUTOS, MÉDIA E MEDIANA DA EXPRESSÃO NORMATIZADA DOS GENES BCL6, LMO2, CCND2, BCL2, SCYA3 E FN1.....	158
ANEXO B – VALORES ABSOLUTOS, MÉDIA E MEDIANA DA EXPRESSÃO NORMATIZADA DOS GENES BCL6, LMO2, CCND2, BCL2, SCYA3, FN1 NA ESCALA LOGARÍTMICA NA BASE 2.....	159
ANEXO C – NOVO ESCORE GENÉTICO DE PROGNÓSTICO.....	160
ANEXO D – CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES DA CASUÍSTICA COM LDGCB POR SUBGRUPOS CONFORME A IDADE E COMPARAÇÃO COM OS ESTUDOS MINT, LNH-98.5 E RICOVER-60.....	161
ANEXO E – CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES COM LDGCB TRATADOS COM R-CHOP POR IDADE.....	162

1 INTRODUÇÃO

O Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB) exhibe marcante heterogeneidade clínica, genética e molecular. Diferentes taxas de resposta ao tratamento com regimes à base de antracíclico corroboram este conceito. A tentativa de incluir maior número de fármacos quimioterápicos, de elevar a intensidade de dose destes fármacos ou de diminuir o intervalo de suas aplicações para aumentar a densidade de suas doses não melhorou consideravelmente os resultados obtidos com o esquema de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona (CHOP) (PFREUNDSCHUH et al., 2004a; PFREUNDSCHUH et al., 2004b). Somente a incorporação do anticorpo monoclonal anti-CD20 (rituximabe) elevou substancialmente a sobrevida dos portadores de LDGCB (COIFFIER et al., 2002; SEHN et al. 2005). Assim, a compreensão dos mecanismos genéticos e moleculares envolvidos na patogênese e potencialmente impactantes na sobrevida dos pacientes com LDGCB se mantém premente. Este campo tem evoluído bastante, contribuindo assim para o contínuo desenvolvimento das terapias alvo.

O LDGCB é o subtipo de linfoma não-Hodgkin (LNH) mais comum no ocidente representando 35% dos casos (ANDERSON; ARMITAGE; WEISENBURGER, 1998; INTERNATIONAL LYMPHOMA STUDY GROUP, 1997). No Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) e no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), o LDGCB representa quase metade dos LNH (49,45%) (GOUVEIA et al., 2011a). No Brasil, o LNH é a nona (2,7%) e décima (2,4%) neoplasia maligna mais comum em homens e mulheres. Além disso, a mortalidade por linfoma em geral corresponde à décima terceira e décima segunda causa de morte por câncer em homens e mulheres, respectivamente (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2012). Nos Estados Unidos da América representa a sexta neoplasia maligna mais prevalente e a sétima causa de

morte por câncer, com 70.130 casos novos estimados para 2012 (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2012).

O LDGCB origina-se em sítios linfonodais em 60% dos casos (THE INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2008). Metade dos pacientes apresenta doença avançada ao diagnóstico, com predomínio no sexo masculino em 55% dos casos e mediana de idade de 64 anos (ARMITAGE; WEISENBURGER, 1998). Anormalidades genéticas comumente observadas e que contribuem em sua patogênese incluem translocações envolvendo os genes *B-cell lymphoma 6* (BCL6), *B-cell lymphoma 2* (BCL2) e cMYC, mutações de FAS (CD95) e hipermutações somáticas aberrantes das cadeias pesadas de imunoglobulina (ABRAMSON; SHIP, 2005).

Modelos de prognóstico clínico, a exemplo do índice internacional de prognóstico (IPI) (PROJECT TIN-HSLPF, 1993), podem estratificar populações com distintas probabilidades de falha ao tratamento e de óbito. Entretanto não consideram variáveis biológicas tumorais e por vezes não conseguem distinguir subgrupos de risco. A Tomografia por Emissão de Pósitrons com fluorodeoxiglicose/ Tomografia Computadorizada (PET/TC) revelou-se ferramenta de imagem funcional de importante impacto no estadiamento e definição de resposta em pacientes com LDGCB (CHESON et al., 2007). Este exame apresenta valor preditivo negativo de 85% e valor preditivo positivo de 85% para sobrevida global (SG). Entretanto em 15% dos casos é incapaz de detectar doença residual microscópica responsável por futuras recaídas (SEAM; JUWEID; CHESON, 2007).

Os estudos de expressão gênica por técnica de *microarray* foram capazes de evidenciar a heterogeneidade dos LDGCB ao individualizarem subgrupos de LDGCB com assinatura gênica semelhante às células B do centro germinativo (LDGCB-CG), às células B ativadas (LDGCB-CBA) e o tipo 3, de diferentes prognósticos (ALIZADEH et al., 2000; ROSENWALD et al., 2002). A SG em cinco anos foi de 60% no subtipo LDGCB-CG e de

35% no subtipo LDGCB-CBA (ROSENWALD et al., 2002).

Modelos de imuno-histoquímica (IHQ) derivados do modelo inicial de expressão gênica de Rosenwald et al. (2002) permitiram prever sobrevida nos subgrupos CG e CBA de forma similar à técnica de DNA complementar (cDNA) *microarray*. Foram criados os algoritmos de Hans (Cluster de diferenciação 10 [CD10], BCL6 e Oncogene Mieloma Múltiplo 1/ Fator regulatório de interferon 4 [MUM1/IRF4]) (HANS et al., 2004); Muris (CD10, MUM1/IRF4, BCL2) (MURIS et al., 2006); Choi (*Germinal Center B cell-expressed transcript-1* [GCET1], MUM1/IRF4, CD10, *Forkhead box P1* [FOXP1] e BCL6) (CHOI et al., 2009); e Tally (CD10, GCET1, MUM1/IRF4, FOXP1 e *LIM domain only 2* [LMO2]) (MEYER et al., 2011). Entretanto a ausência de padronização técnica e as variações inter-observadores e intra-observadores nos diferentes estudos comprometem suas respectivas reprodutibilidade e comparabilidade.

O uso da técnica de reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) e a análise da expressão de menor número de genes podem viabilizar a aplicação destes marcadores na prática clínica. Desta forma, Lossos et al. (2004) elaboraram modelo matemático baseado na expressão de seis genes (LMO2, BCL6, Fibronectina 1 [FN1], ciclina D2 [CCND2], *Small Inducible Cytokine A3* [SCYA3] e BCL2) como preditivo de prognóstico independentemente do IPI em LDGCB tratados com CHOP-símile. Este modelo consolida o conceito de interdependência entre estes genes; e foi validado posteriormente em LDGCB tratados com associação de rituximabe ao CHOP (R-CHOP) (MALUMBRES et al., 2008).

Entretanto todos estes estudos foram conduzidos com populações caucasianas de portadores de LDGCB e em países desenvolvidos. De tal sorte que os modelos de estratificação de risco molecular ainda não foram testados em populações contendo diferentes etnias, em países em desenvolvimento ou emergentes, onde as condições de diagnóstico e de tratamento nem sempre refletem aquelas encontradas em países desenvolvidos. Desta forma

entendemos que muito ainda resta por ser feito e validado em nossa população de brasileiros. A realização deste trabalho contribuirá para elevar o nível de evidência para aplicação destes marcadores em nossa população de portadores de LDGCB.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CLASSIFICAÇÃO DOS LINFOMA NÃO-HODGKIN

A evolução da classificação do linfoma nas últimas quatro décadas é em grande parte de interesse histórico, embora seja necessária para a compreensão da evolução do tratamento do LDGCB.

A classificação de Rappaport (RAPPAPORT, 1966) baseava-se exclusivamente na arquitetura (padrão nodular *versus* difuso) e morfologia. Nesta classificação, o LDGCB era denominado linfoma histiocítico difuso e foi estabelecido o conceito no qual os linfomas com padrão de crescimento nodular apresentavam comportamento mais indolente em contraposição àqueles com padrão de crescimento difuso, de comportamento mais agressivo.

Na década de 70, com os avanços no conhecimento do sistema imune, surgiram duas classificações baseadas em morfologia e no conceito emergente da fisiologia imunológica, que permitiu correlacionar as células linfomatosas com seus respectivos correspondentes normais. Desta forma, Lukes e Collins (1974) classificaram o LNH conforme a morfologia do núcleo celular e imunofenótipo T ou B. O LDGCB correspondia às categorias de linfoma de grandes células centro-foliculares clivadas, linfoma de grandes células centro-foliculares não clivadas e linfoma B imunoblástico. A classificação de Kiel criada em 1975 era baseada na diferenciação linfocitária e consagrou os termos centrocítico e centroblástico; e posteriormente dividiu os LNH em baixo e alto grau de malignidade. O LDGCB correspondia às categorias de linfoma centroblástico, linfoma B imunoblástico e linfoma de grandes células B anaplásicas (LENNERT; STEIN; KAISERLING, 1975; e revisada em 1988 [STANSFELD et al., 1988]).

A formulação de trabalho ou *Working Formulation* (ROBB-SMITH, 1982) foi uma

tentativa de unificar a linguagem usada para classificar os LNH. Baseou-se no tamanho da célula, no padrão de infiltração linfonodal e na morfologia, além disso, atribuiu graus ao linfoma conforme a história natural da doença. Assim os graus baixo, intermediário e alto apresentavam sobrevida em anos, meses e semanas, respectivamente. Levou ao conceito de que o linfoma de baixo grau seria incurável e o tratamento, quando necessário, seria paliativo. Por outro lado, os linfomas de graus intermediário e alto deveriam ser tratados com poliquimioterapia objetivando a cura. Apesar de útil quanto ao prognóstico, não envolvia aspectos biológicos como nas classificações de Kiel e Lukes-Collins. O LDGCB correspondia aos grupos F (linfoma difuso misto de células pequenas e grandes), G (linfoma difuso de grandes células) e H (linfoma imunoblástico de grandes células).

A Classificação Revisada Européia-Americana das neoplasias linfóides (HARRIS, et al., 1994) incorporou conceitos clínicos, genéticos e de imunofenotipagem. Nessa classificação, algumas entidades foram reconhecidas a exemplo do linfoma de células do manto e o linfoma de zona marginal. Foi criado o termo LDGCB, distinguindo-o claramente de outros linfomas agressivos como o de células T periféricas, de células do manto variante blastóide, de células T anaplásicas e o linfoma de Burkitt.

A Classificação Revisada Européia-Americana das neoplasias linfóides foi atualizada posteriormente pela classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2001 e 2008 (THE INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2001, 2008). Esse projeto foi iniciado em 1995 e envolveu as Sociedades Européia e Americana de Hematopatologia, com a participação de hematologistas e oncologistas de todo o mundo. A classificação da OMS estratifica as neoplasias hematológicas inicialmente pela linhagem mielóide, linfóide, histiocítica/dendrítica ou mastocitária. Em cada categoria, distintas doenças são classificadas combinando morfologia, genética, imunofenótipo e aspectos clínicos. Os linfomas foram então reunidos em três grandes grupos: neoplasias B maduras,

neoplasias de células T e *natural killer* e linfoma de Hodgkin.

Na classificação da OMS de 2008, o linfoma linfoblástico por ter a mesma célula progenitora do ponto de vista biológico da leucemia linfoblástica aguda, foi classificado no grupo das neoplasias de células linfóides precursoras. Por outro lado, a antiga leucemia linfoblástica L3 foi reclassificada como variante leucêmica do linfoma de Burkitt. A diferenciação entre os graus 1 e 2 do linfoma folicular perdeu importância prática e a tricoleucemia variante deixou de ser biologicamente relacionada à tricoleucemia clássica. As variantes e os diferentes subgrupos de LDGCB estão listados na Tabela 1.

O diagnóstico de LDGCB caracteriza-se por células linfóides grandes com tamanho nuclear maior ou igual ao núcleo do macrófago ou duas vezes o tamanho dos linfócitos normais, que infiltram difusamente linfonodos ou sítios extralinfonodais levando a rápido crescimento local (THE INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2008). Casos com predomínio de células de médio tamanho devem ser diferenciados de leucemia, linfoma de células do manto variante blastóide e linfoma de Burkitt. O LDGCB pode ser dividido quanto ao sítio primário (mediastinal, intravascular, tipo “da perna”, efusão) e suas principais variantes morfológicas (Tabela 1).

As células malignas do LDGCB expressam marcadores pan-B CD19, CD20, CD22, CD79a, e comumente imunoglobulina de superfície e/ou citoplasmática (50-75% dos casos). O antígeno CD30 pode ocorrer na variante anaplásica e o CD5 pode ocorrer em 10% dos casos, os quais são negativos para ciclina D1. Pode haver expressão de CD10 (30-60%), BCL6 (60-90%), MUM1/IRF4 (35-65%) e co-expressão de BCL6 e MUM1 (até 50%). O Ki-67 geralmente é superior a 40%, podendo estar acima de 90%; e a expressão de p53 ocorre em 20-60% dos casos. De acordo com o padrão de assinatura gênica são subdivididos em LDGCB-CG, LDGCB não-centro germinativo (LDGCB-NCG) ou CBA.

Tabela 1 – Variantes, subgrupos e subtipos de linfoma difuso de grandes células B

Linfomas difusos de grandes células B, não especificado
Variantes morfológicas comuns: <ul style="list-style-type: none"> Centroblástico: mais comum, médio a grande tamanho, 2 a 4 nucléolos periféricos Imunoblástico: nucléolo central único, citoplasma basofílico, diferenciação plasmocitóide Anaplásico: muito grande, núcleo pleomórfico, Reed-Sternberg-símile, carcinoma-símile
Variantes morfológicas raras
Subgrupos moleculares: <ul style="list-style-type: none"> Células B centro-germinativo-símile Células B ativadas-símile
Subgrupos imuno-histoquímicos: <ul style="list-style-type: none"> Linfoma difuso de grandes células B CD5-positivo Células B centro germinativo-símile Células B não-centro germinativo-símile
Subtipos de linfoma difuso de grandes células B
Linfoma de grandes células B rico em células T e histiócitos: < 10% de células B neoplásicas, células T policlonais
Linfoma difuso de grandes células B do sistema nervoso central
Linfoma difuso de grandes células B da pele, tipo “da perna”
Linfoma difuso de grandes células B EBV-positivo do idoso
Outros tipos de linfomas de grandes células B
Linfoma de grandes células B do mediastino (tímico): localizado, esclerótico, predomínio em jovens, CD30-positivo fraco
Linfoma de grandes células B intravascular
Linfoma difuso de grandes células B associado à inflamação crônica
Granulomatose linfomatóide
Linfoma difuso de grandes células B ALK-positivo
Linfoma plasmablastico
Linfoma de grandes células B com origem em Doença de Castleman multicêntrica associada ao HHV-8
Linfoma primário de efusões
Casos Limítrofes
Linfoma de células B inclassificável com características intermediárias entre o linfoma difuso de grandes células B e o linfoma de Burkitt
Linfoma de células B inclassificável com características intermediárias entre o linfoma difuso de grandes células B e o linfoma de Hodgkin

Fontes: The International Agency for Research on Cancer (2008) e Zerbini et al. (2011). EBV: Vírus Epstein-Barr. HHV8: Herpesvírus Humano 8. ALK: *Anaplastic lymphoma kinase*.

2. 2 ESTADIAMENTO

O estadiamento clínico dos LDGCB é baseado no estadiamento de Ann Arbor (CARBONE et al., 1971), inicialmente elaborado para o linfoma de Hodgkin. Entretanto apresenta menor acurácia para LNH, no qual há maior frequência de apresentação extralinfonodal.

As regiões linfonodais foram determinadas com base nas definições do simpósio de Rye de 1965 e estão demonstradas na Figura 1. As regiões epitroclear, poplítea, submentoniana e mamária interna (drena a parede torácica e o diafragma juntamente com os linfonodos paravertebrais) também foram consideradas regiões distintas. Além dos linfonodos, foram classificados ainda como estruturas linfáticas, o baço, o timo, o anel de Waldeyer, o apêndice e as placas de Peyer (CARBONE et al., 1971).

Figura 1 – Regiões linfonodais: cervical direita (incluindo linfonodos cervicais, supraclaviculares, occipitais e pré-auriculares), cervical esquerda, axilar direita, axilar esquerda, infra-clavicular direita, infra-clavicular esquerda, mediastinal (linfonodos pré-vasculares, aorto-pulmonares, paratraqueais, pré-traqueais, subcarinais e mediastinais posteriores), hilar (não são incluídos na região mediastinal), para-aórtica, mesentérica, pélvica (ou ilíaca) direita, pélvica (ou ilíaca) esquerda, inguino-femoral direita e inguino-femoral esquerda (CARBONE et al., 1971; LISTER et al., 1989; ARMITAGE et al., 2005)

Considera-se clinicamente alterado linfonodo maior que 1,5cm em seu maior diâmetro (ARMITAGE, 2005). O fígado é considerado envolvido quando há múltiplas lesões focais no exame de imagem ou se biópsia hepática demonstra infiltração por linfoma (ARMITAGE, 2005). O envolvimento hepático caracteriza estadio clínico IV. O baço é considerado envolvido se houver esplenomegalia inequívoca palpável ao exame físico, ou palpável equívoca com confirmação radiológica de aumento de tamanho; ou presença de múltiplas lesões focais ao exame de imagem e que não sejam sugestivas de cistos ou alterações vasculares (CARBONE et al., 1971; LISTER et al., 1989; ARMITAGE et al., 2005). O acometimento esplênico é diferenciado pela letra “S”.

Doença *bulky* é caracterizada pela letra “X” e definida na classificação clássica de Ann Arbor por lesões de tamanho superior a 10cm (WILDER et al., 2001; PFREUNDSCHUH et al., 2008b).

Doença extralinfonodal proximal ou contígua é caracterizada pela letra “E” e definida como extensão direta de sítio nodal adjacente (LISTER et al., 1989; CARBONE et al., 1971, ARMITAGE, 2005). O estadiamento de Ann Arbor detalhado encontra-se na Figura 2 e Tabela 2.

Figura 2 – Estadiamento de Ann Arbor

Tabela 2 – Estadiamento do linfoma não-Hodgkin

Estadio	Definições
I	Envolvimento de uma única região linfonodal (ex.: cervical, axilar, inguinal, mediastinal) ou estrutura linfóide (ex.: baço, timo ou anel de Waldeyer) (I) ou envolvimento localizado de um único órgão ou sítio extralinfático na ausência de qualquer envolvimento nodal (I _E)
II	Envolvimento de duas ou mais regiões linfonodais ou estruturas linfóides no mesmo lado do diafragma (II) ou envolvimento localizado de um único órgão ou sítio extralinfático em associação com envolvimento de linfonodo regional com ou sem envolvimento de outras regiões linfonodais no mesmo lado do diafragma (II _E)
III	Envolvimento de regiões linfonodais ou estruturas linfóides em ambos os lados do diafragma (III), que também pode ser acompanhado por extensão extralinfática em associação a envolvimento linfonodal adjacente (III _E) ou baço (III _S), ou ambos (III _{SE})
IV	Envolvimento difuso ou disseminado (multifocal) de um ou mais órgãos extralinfáticos, com ou sem linfonodos associados; ou envolvimento isolado de órgão extralinfático na ausência de linfonodo regional, mas em conjunto com doença em sítios distantes (não regional)
E	Envolvimento de um único sítio extranodal contíguo ou proximal a um sítio nodal conhecido

Fontes: Carbone et al. (1971), Lister et al. (1989) e Armitage et al. (2005)

O sistema de Ann Arbor é considerado inadequado para linfoma do trato gastrointestinal, pois não traz informação sobre a profundidade da invasão tumoral, o que sabidamente afeta o prognóstico. Assim, os pacientes com LDGCB de trato gastrointestinal são classificados pelos critérios de Lugano (Tabela 3) (ROHATINER et al., 1994).

Tabela 3 – Estadiamento de Lugano em comparação ao estadiamento de Ann Arbor

Ann Arbor (1971)	Lugano (1994)	Extensão do linfoma
I_E	I = Confinado ao trato gastrointestinal (lesão única primária ou múltiplas não contíguas): I ₁ = mucosa, submucosa I ₂ = muscular própria, serosa	Mucosa, submucosa Muscular própria, serosa
II_E	II= Extensão para o abdômen: II ₁ = envolvimento nodal local II ₂ = envolvimento nodal distante	Linfonodos paragástricos (linfoma gástrico); paraintestinais (linfoma intestinal) Linfonodos mais distantes (para- aórtico, paracaval, pélvico, inguinal, na maioria dos tumores; mesentéricos, no caso do intestinal)
II_E	II _E = Penetra serosa para envolver os órgãos ou tecidos adjacentes	Invasão de estruturas adjacentes
IV	IV= Envolvimento extralinfonodal disseminado ou concomitante envolvimento nodal supradiafragmático	Linfonodos em ambos os lados do diafragma e/ou envolvimento não contíguo de diferentes sítios do trato gastrointestinal e/ou envolvimento de sítios extralinfonodais fora do trato gastrointestinal

Nota: Não existe estadio III no sistema de Lugano. Fonte: Rohatiner et al. (1994)

Sintomas B são definidos como perda inexplicada de mais de 10% do peso corporal nos seis meses que antecedem o estadiamento, febre inexplicada, persistente ou recorrente, acima de 38°C e/ou sudorese noturna recorrente (LISTER et al., 1989). A presença de sintomas B foi definida pela letra “B” e sua ausência pela letra “A”.

2.3 ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO

2.3.1 Estratificação de risco clínica

2.3.1.1 Índice Internacional de Prognóstico

Em 1993, estudo multicêntrico avaliou vários fatores de prognóstico em 2031 pacientes com LNH tratados com quimioterapia à base de antracíclico. Idade acima de 60 anos, estadio clínico III/IV, estado funcional (*Eastern Cooperative Oncology Group performance status* [ECOG]) (Tabela 4) maior ou igual a dois, desidrogenase láctica sérica (DHL) acima do valor de referência e mais de uma área extralinfonodal comprometida apresentaram impacto prognóstico negativo à análise multivariada. Foi criado assim o Índice Internacional de Prognóstico (IPI) onde cada um desses fatores passou a representar um ponto no escore do IPI (Tabela 5).

Segundo o IPI, os pacientes foram estratificados em grupos de baixo, intermediário baixo, intermediário alto e alto risco com diferentes taxas de resposta completa (RC), sobrevida livre de recaída (SLR) e SG (PROJECT TIN-HSLPF, 1993) (Tabela 5). O IPI também foi validado em estudo na era pós-rituximabe (ZIEPERT et al., 2010).

Tabela 4 – Estado funcional pelo ECOG

Graus	ECOG
0	Completamente ativo, com a mesma capacidade de antes, sem restrição
1	Restrito para atividades físicas extenuantes, mas ambulatorial e capaz de realizar trabalho de natureza leve, por exemplo, trabalho de casa leve, trabalho de escritório
2	Ambulatorial e capaz de todas as atividades de autocuidado, mas incapaz de realizar qualquer atividade de trabalho. De pé mais de 50% das horas de vigília
3	Capaz de apenas de autocuidado limitado, confinado à cama ou cadeira mais de 50% das horas de vigília
4	Completamente incapacitado. Não é capaz de executar qualquer autocuidado. Totalmente confinado à cama ou cadeira
5	Morte

Fonte: OKEN et al.(1982). ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group performance status*.

Tabela 5 – Prognóstico em linfoma difuso de grandes células B de acordo com o IPI na era pré-rituximabe

Grupos de risco	Pontos	RC	SLR 5 anos	SG 5 anos
Baixo risco	0-1	87%	70%	73%
Risco intermediário baixo	2	67%	50%	51%
Risco intermediário alto	3	55%	49%	43%
Alto risco	4-5	44%	40%	26%

Fonte: PROJECT TIN-HSLPF (1993). IPI: Índice internacional de prognóstico. RC: Resposta completa. SLR: Sobrevida livre de recaída. SG: Sobrevida global. Soma-se um ponto para cada um dos seguintes parâmetros: idade >60 anos, estadió clínico III/IV, performance status ≥ 2 , desidrogenase láctica sérica elevada ou >1 sítio extranodal acometido.

O agrupamento das categorias de IPI de riscos baixo e intermediário baixo resulta no IPI adaptado de baixo risco, da mesma forma a união dos grupos de IPI de riscos intermediário alto e alto caracteriza o IPI adaptado de alto risco (HALLACK NETO, 2005).

2. 3. 1. 2 Índice Internacional de Prognóstico Ajustado para Idade

Os fatores de risco do IPI foram também aplicados a pacientes com idade inferior a 60 anos (N=1274) estabelecendo-se o IPI ajustado para a idade (IPIai). Neste permaneceram como fatores desfavoráveis o ECOG maior ou igual a dois, DHL acima do normal e os estadios III/IV (Tabela 6).

Tabela 6 – Prognóstico em linfoma difuso de grandes células B em relação ao IPIai na era pré-rituximabe

Grupos de risco (≤60 anos)	Pontos	RC	SLR 5 anos	SG 5 anos
Baixo risco	0	92%	86%	83%
Risco intermediário baixo	1	78%	66%	69%
Risco intermediário alto	2	57%	53%	46%
Alto risco	3	46%	58%	32%

Fonte: PROJECT TIN-HSLPF (1993). IPIai: Índice internacional de prognóstico ajustado para idade. RC: Resposta completa. SLR: Sobrevida livre de recaída. SG: Sobrevida global. Soma-se um ponto para cada um dos seguintes parâmetros: idade >60 anos, estadió clínico III/IV, performance status ≥ 2 , desidrogenase láctica sérica elevada ou >1 sítio extranodal acometido.

2. 3. 1. 3 Índice Internacional de Prognóstico Revisado

Estudo retrospectivo realizado na *British Columbia* (SEHN et al., 2007) avaliou 365 pacientes com LDGCB tratados com R-CHOP e demonstrou que o IPI manteve valor de prognóstico. O IPI revisado (RIPI) identificou os grupos de prognóstico muito bom (zero fator de risco), bom (um ou dois fatores de risco) e ruim (três ou mais fatores de risco), com diferentes sobrevida livre de progressão (SLP) e SG (Tabela 7).

Tabela 7 – Prognóstico em linfoma difuso de grandes células B em relação ao RIPI

Grupos de risco	Pontos	SLP 4 anos	SG 4 anos
Muito bom	0	94%	94%
Bom	1-2	80%	79%
Ruim	3-5	53%	55%

Fonte: SEHN et al. (2007). RIPI: Índice internacional de prognóstico revisado. SLP: Sobrevida livre de progressão. SG: Sobrevida global. Soma-se um ponto para cada um dos seguintes parâmetros: idade >60 anos, estadio clínico III/IV, performance status ≥ 2 , desidrogenase láctica sérica elevada ou >1 sítio extranodal acometido.

2. 3. 1. 4 Doença *Bulky*

Diversos estudos encontraram a presença de doença *bulky* como fator de prognóstico desfavorável em linfoma agressivo. Entretanto a definição de *bulky* é muito variável entre os estudos e ainda se mantém controversa como fator de prognóstico (WILDER et al., 2001; GAUDIO et al. 2011; SONG et al., 2010; PFREUNDSCHUH et al., 2004b; FREUNDSCHUH et al., 2008^a, 2008b).

2. 3. 2 Valor prognóstico da tomografia por emissão de pósitrons

A PET/TC surgiu como o mais importante avanço na avaliação de pacientes com linfoma. É uma técnica de imagem metabólica (funcional), não invasiva, tridimensional baseada no uso do análogo radiolável da glicose (2-F18-fluoro-2-deoxi-glicose [FDG]) que é transportado para o interior das células de forma semelhante à glicose. Porém, não é substrato da glicose 6-fosfato-isomerase, nem é desfosforilado em tumores, ficando preso nas células tumorais onde atinge equilíbrio após 60 minutos da sua aplicação. O isótopo ^{18}F ao qual está ligado libera fótons que são detectados pelo aparelho e traduzidos em imagem.

O PET é útil em linfomas ávidos por FDG, como linfoma de Hodgkin e LDGCB, não estando indicado no seguimento de linfomas indolentes ou linfomas T (captação variável) (SPECHT, 2007).

Ao diagnóstico a especificidade do PET é semelhante à da TC (cerca de 100%), entretanto apresenta maior sensibilidade (92 a 100% *versus* 77 a 91%). O PET contribuiu para aumentar o estadio clínico dos LDGCB em 8 a 14% dos casos e raramente para reduzi-lo (CHESON, 2011). Mudanças no tratamento secundárias ao PET de estadiamento são excepcionais.

O valor do PET está bem definido para reestadiamento de pacientes com LDGCB após o tratamento, com um valor preditivo negativo variando de 88 a 100% (CHESON, 2011). Spaepen et al. (2001) demonstraram que 83,6% dos pacientes com LDGCB que tinham PET negativo, permaneceram em remissão (seguimento mediano de 1,8 anos), entretanto todos os pacientes com PET positivo ao final do tratamento recaíram com uma mediana inferior a 3 meses. O PET, entretanto, não é capaz de detectar doença residual microscópica que pode ser responsável pela recaída, por outro lado é superior à TC em distinguir tumor viável de áreas de necrose ou fibrose em massas residuais (JUWEID et al., 2007; SPECHT, 2007). Assim, foi

incorporado aos critérios de resposta revisados para linfomas (CHESON et al., 2007), eliminando a categoria resposta completa não confirmada. Para reduzir-se as taxas de resultados falso-positivos, o PET deve ser realizado 6 a 8 semanas após a quimioterapia e 8 a 12 semanas após a radioterapia (CHESON, 2011).

O valor do PET ínterim (após 1 a 4 ciclos de tratamento) ainda é questionável e somente recomendado em pesquisa. Diversos estudos em LDGCB demonstraram que um PET ínterim negativo tinha correlação com SLP/sobrevida livre de eventos (SLE) variando de 73 a 100%, por outro lado, um PET ínterim positivo resultou em SLP/SLE variando de 0 a 75% (CHESON, 2011). Haioun et al. (2005) realizaram PET após 2 ciclos (PET2) de quimioterapia CHOP-símile (41% com rituximabe) em pacientes com linfoma agressivo (94% LDGCB) e encontraram SLE (82% x 43%, $p<0,001$) e SG (90% x 61%, $p=0,006$) em 2 anos superiores para os pacientes que tinham PET2 negativo independente da adição de rituximabe ou do IPI. Um estudo retrospectivo com pacientes tratados com R-CHOP avaliou os resultados do PET2, demonstrando que pacientes com PET2 negativo tinham maior SLE em 2 anos (83% x 56%, $p<0,001$) (CASANOVAS et al., 2012). Da mesma forma, outro estudo com 99 pacientes demonstrou que o PET negativo após 4 ciclos de quimioterapia CHOP-símile (49% com rituximabe) também se correlacionou com maior SLE em 5 anos (80% x 36%, $p<0,0001$) (DUPUIS et al., 2009).

Por outro lado, Cashen et al. (2008) estudaram 50 pacientes tratados com 6 ciclos de R-CHOP que realizaram PET após 2 ou 3 ciclos, obtendo um valor preditivo negativo de 87% e um valor preditivo positivo de 27%, enquanto o PET após o sexto ciclo alcançou um valor preditivo negativo de 92% e um valor preditivo positivo de 80%, assim o PET ínterim foi um pobre preditor de evolução. Pregno et al. (2012) avaliaram 88 pacientes com LDGCB tratados com R-CHOP e encontraram importância prognóstica para o PET ínterim (após 2 a 4 ciclos) apenas na análise univariada, o que não se confirmou na análise multivariada. Além disso,

Moskowitz et al. (2010) demonstraram que apenas 23% das biópsias de pacientes com PET positivo após o quarto ciclo realmente eram linfoma. Outros estudos igualmente demonstraram um baixo valor preditivo para o PET ínterim (HAN et al., 2009; TERASAWA et al., 2009).

2. 3. 3 Estratificação de Risco Biológica

2. 3. 3. 1 Algoritmos preditivos de prognóstico com base na expressão gênica

Dentro da categoria de prognóstico favorável existem pacientes com evoluções desfavoráveis não individualizados pelo escore clínico. Nas últimas décadas pesquisadores têm se voltado à investigação de critérios de prognóstico molecular em LDGCB na tentativa de alcançar um escore prognóstico de excelência.

De forma pioneira Alizadeh et al. (2000) utilizaram a técnica de identificação de assinatura gênica celular por cDNA *microarray* e encontraram dois subgrupos moleculares de LDGCB com diferentes prognósticos e independentes do IPI. O LDGCB com células de assinatura gênica semelhante às das células B do centro germinativo (CG) ou de células B ativadas (CBA) estabeleceram, respectivamente, os LDGCB-CG e LDGCB-CBA.

Posteriormente, também empregando cDNA *microarray*, Rosenwald et al. (2002) propuseram modelo gênico prognóstico em pacientes tratados à base de antracíclico sem rituximabe que se mostrou preditivo de sobrevida e independente do IPI. Foram avaliados retrospectivamente 240 pacientes, 54% com estadios clínicos III/IV. Três subtipos com expressão gênica e prognósticos distintos foram caracterizados (CG, CBA e tipo 3) e um grupo com assinatura gênica semelhante à do Complexo Maior de Histocompatibilidade

(CMH) classe II. O gene Proteína Morfogenética Óssea 6 (BMP6) apesar de não compor nenhuma das assinaturas propostas correlacionou-se com pior prognóstico. As translocações envolvendo os genes BCL2 e a amplificação do gene c-rel foram identificadas apenas no subgrupo LDGCB-CG. Os casos de LDGCB-NCG (CBA e tipo 3) foram mais idosos e com pior ECOG. A SG em 5 anos foi significativamente diferente nos subgrupos: 60% para CG, 39% para tipo 3 e 35% para CBA ($p < 0,001$). Dentro dos subgrupos ainda havia pacientes com diferentes evoluções. Em uma segunda etapa, os genes preditivos de prognóstico foram combinados num modelo multivariado de Cox que incorporou diferenças no nível absoluto de expressão gênica, obtendo-se o escore $(0,241 \times \text{valor médio da assinatura de genes de proliferação}) + (0,310 \times \text{valor do BMP6}) - (0,290 \times \text{valor médio da assinatura gênica do CG}) - (0,311 \times \text{valor da média da assinatura gênica do CMH classe II}) - (0,240 \times \text{valor médio da assinatura gênica linfonodal})$, que variou de -1,7 a 2,4. Os pacientes com LDGCB foram estratificados pelo escore e divididos em quatro quartis correspondendo a diferentes taxas de SG em 5 anos (73% no 1º quartil, 71% no 2º quartil, 34% no 3º quartil e 15% no 4º quartil). Esse escore identificou dentro dos subgrupos moleculares e de IPI, pacientes com mínima chance de resposta ao tratamento convencional. Cinquenta e cinco por cento do grupo de IPI de risco intermediário e 28% do grupo de IPI de baixo risco evoluíram de maneira desfavorável.

Em 2004, Hans et al. adaptaram o modelo de prognóstico molecular de Rosenwald et al. (2002) em um modelo imuno-histoquímico de fácil aplicação e de menor custo. Cento e quarenta e duas amostras de pacientes com LDGCB tratados com quimioterapia à base de antracíclico (sem rituximabe) foram analisadas por cDNA *microarray* em paralelo à IHQ para os antígenos CD10, BCL6, IRF4/MUM1, FOXP1, CCND2 e BCL2. Consideraram-se positivos casos com marcação imuno-histoquímica maior ou igual a 30%. A expressão dos antígenos CD10 e BCL6 foi associada à maior SG ($p < 0,001$ e $p = 0,019$), enquanto MUM1 e

CCND2 à pior SG ($p=0,009$ e $p<0,001$). BCL6 se correlacionou com maior SLE ($p=0,013$), enquanto o MUM1 ($p=0,003$) e a CCND2 ($p<0,001$) à pior SLE. BCL2 e FOXP1 não se correlacionaram com SG ou SLE, mas foram preditivos de pior prognóstico no subtipo LDGCB-NCG. Os pacientes foram classificados apenas em LDGCB-CG e NCG, pois os subtipos NCG (CBA e tipo 3) apresentaram prognósticos semelhantes. A SG em 5 anos foi 76% para LDGCB-CG e 34% em LDGCB-NCG ($p<0,001$).

Na era pós-rituximabe o valor do algoritmo de Hans tem sido controverso. Fu et al. (2008) compararam 131 pacientes tratados com R-CHOP-símile com 112 pacientes tratados com CHOP-símile. O rituximabe melhorou significativamente a SG geral em três anos (77% *versus* 42%, $p<0,001$) e dentro dos subgrupos CG (85% *versus* 52%, $p=0,0043$) e NCG (69% *versus* 33%, $p=0,0002$). A SG no grupo que recebeu rituximabe foi maior para o subtipo CG do que para o subtipo NCG (85% *versus* 69%, $p=0,032$).

Posteriormente, Choi et al. (2009) validaram novo algoritmo imuno-histoquímico (GCET1, MUM1/IRF4, CD10, FOXP1 e BCL6) com concordância com o perfil de expressão gênica por cDNA *microarray* de 93% em pacientes tratados com CHOP-símile ($N=84$) e 88% naqueles tratados com R-CHOP ($N=67$). No grupo CHOP-símile, a SG e a SLE em 5 anos nos LDGCB-CG e LDGCB-CBA foram de 61% *versus* 41% ($p=0,12$) e 49% *versus* 46% ($p=0,65$), respectivamente. No grupo do R-CHOP, a SG e a SLE em 3 anos nos LDGCB-CG e LDGCB-CBA foram, respectivamente, 87% *versus* 44% ($p<0,001$) e 77% *versus* 34% ($p=0,012$).

Uma alternativa para avaliar a expressão gênica de forma mais prática, rápida e custo-efetiva do que o cDNA *microarray* é a técnica de qRT-PCR. Lossos et al. (2004), a partir da análise de 36 genes previamente correlacionados com prognóstico em LDGCB, por técnica de qRT-PCR, em 66 biópsias congeladas de pacientes com LDGCB, criaram e validaram um modelo matemático

baseado na expressão de seis genes (BCL2, BCL6, CCND2, LMO2, FN1 e SCYA3). Este modelo foi capaz de prever, de forma independente do IPI, o prognóstico de pacientes com LDGCB tratados com quimioterapia CHOP-símile. Em análise univariada foram selecionados os genes com maior poder preditivo baseado no escore z, ou seja, aqueles com z absoluto maior ou igual a 1,5. O valor negativo de z se correlacionou à maior SG e o valor positivo à menor SG. Foi criado então o escore preditivo de mortalidade (EPM): $(-0,0273 \times \text{LMO2}) + (-0,2103 \times \text{BCL6}) + (-0,1878 \times \text{FN1}) + (0,0346 \times \text{CCND2}) + (0,1888 \times \text{SCYA3}) + (0,5527 \times \text{BCL2})$. Assim, os genes LMO2 e BCL6 integrantes da assinatura CG e o gene FN1 associado à assinatura linfonodal correlacionaram-se com melhor prognóstico e os genes BCL2, CCND2 e SCYA3 pertencentes à assinatura gênica CBA, à pior prognóstico. Os pacientes foram estratificados conforme o EPM em baixo ($<0,063$), médio ($0,063$ a $<0,093$) ou alto ($\geq 0,093$) risco de mortalidade. As taxas de SG em 5 anos foram, respectivamente, 65% (mediana de 8,7 anos), 49% (mediana de 7,1 anos) e 15% (mediana de 3,8 anos) ($p=0,004$). O EPM foi capaz de separar, dentro das categorias de IPI, pacientes com diferentes prognósticos, identificando pacientes que não se beneficiariam de quimioterapia CHOP-símile e que poderiam ser candidatos a novas estratégias terapêuticas.

Posteriormente, Malumbres et al. (2008) validaram o EPM em pacientes com LDGCB tratados com R-CHOP. Neste estudo o EPM, o IPI e o IPI_{ai} foram fatores prognósticos independentes para SG. Porém, somente o IPI se manteve como fator independente para SLP. O estudo incluiu 132 biópsias de pacientes com LDGCB mas, distintamente de Lossos et al. (2004), extraiu ácido ribonucléico (RNA) de tecido parafinado. Os pacientes foram estratificados conforme o EPM em baixo risco (abaixo da mediana) e alto risco (acima da mediana), com taxas de SG (85% *versus* 61%, $p=0,002$) e SLP ($p=0,038$) estatisticamente diferentes. A análise univariada revelou que individualmente a expressão dos genes LMO2 e BCL6 como variáveis contínuas se correlacionou com maior SG ($p<0,001$ e $p=0,01$) e SLP

($p < 0,001$ e $p = 0,031$), enquanto a expressão dos genes BCL2 e CCND2 se associou com menor SG ($p = 0,023$ e $p = 0,032$) e no caso do BCL2, também menor SLP ($p = 0,035$). Por outro lado, o gene SCYA3 que outrora conferia mau prognóstico (LOSSOS et al., 2004) passou a ter tendência à maior SG com a adição do rituximabe ($z = -0,71$).

Na categoria de IPI 0-2, o EPM conseguiu separar dois grupos com SG significativamente distintas ($p = 0,019$), observando-se a formação de um platô na curva do grupo de baixo risco (MALUMBRES et al., 2008). Por outro lado, o mesmo não foi observado na categoria de IPI 3-5, o que foi atribuído pelo autor ao número limitado da amostra. Entretanto, em Malumbres et al. (2008) o grupo com IPI 3-5 foi maior ($N = 45$) que o descrito por Lossos et al. (2004) ($N = 14$), no qual o EPM havia sido fator prognóstico independente do IPI na era pré-rituximabe.

Além disso, o poder preditivo (escore z absoluto) dos genes FN1 e SCYA3 em pacientes tratados com R-CHOP foi inferior a 1,5 (MALUMBRES et al., 2008), ponto de corte usado para inclusão dos genes na equação do EPM construída por Lossos et al. (2004). Com base no escore z , esses genes não deveriam mais fazer parte do EPM na era pós-rituximabe, entretanto foram mantidos na equação por Malumbres et al. (2008). Alguns estudos (ver itens 2. 3. 3. 3 e 2. 3. 3. 5) demonstraram ainda perda do impacto prognóstico da expressão dos genes BCL2 e BCL6 com a adição do rituximabe à quimioterapia.

Esses dados suscitam discussão sobre a validade de se continuar atribuindo o mesmo coeficiente z da era pré-rituximabe na equação do EPM para genes que adquiriram significado prognóstico distinto após a incorporação do anticorpo anti-CD20. Por tudo isso, é questionável se a equação baseada no poder preditivo ou escore z de genes selecionados em pacientes tratados com CHOP, não deveria ter sido recalculada para um novo poder preditivo (escore z) dos genes com significância em pacientes tratados com R-CHOP.

2. 3. 3. 2 Gene LMO2 (*LIM domain only 2*)

O gene LIM domínio único 2 (LMO2) ou gene Rombotina 2 ou *Transparent Testa Glabra 2* localiza-se no cromossomo 11p13 (LMO2[...], 2012). Codifica fator de transcrição rico em cisteína contendo dois domínios LIM (LMO2[...], 2012; NATKUNAM et al., 2007) e um domínio curto amino terminal com atividade de transativação e de transcrição. Atua mediando indiretamente a expressão gênica pela interação proteína-proteína com outros fatores de transcrição, facilitando a formação de complexos ligantes de ácido desoxirribonucléico (DNA) bipartidários (CUBEDO et al., 2012).

Foi descrito com importante papel na leucemia linfoblástica T e está envolvido nas translocações t(11;14) (p13;q11), t(7;11) (q35;p13) (BOEHM et al., 1991; ROYER-POKORA; LOOS; LUDWIG, 1991). Participa também na patogênese da leucemia linfoblástica T após inserção retroviral (MCCORMACK; RABBITTS, 2004; NAM; RABBITTS, 2006).

O LMO2 participa da hematopoiese, do desenvolvimento do timo e da angiogênese (WARREN et al., 1994; YAMADA et al., 2000; NATKUNAM et al., 2007). Pode ser expresso em linfócito B do CG, mas não em linfócito T (ALIZADEH et al., 2000; LOSSOS et al., 2004; NATKUNAM et al., 2007). Pode ser encontrado em tumores derivados de células do CG como linfoma folicular, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin predominância linfocitária, linfoma de grandes células B do mediastino e outros LDGCB. Raramente é expresso no mieloma múltiplo e no linfoma de células *natural killer* (NATKUNAM et al., 2007). Pode ser útil para diferenciar o linfoma folicular de outros linfomas de células B pequenas. Em LDGCB a expressão de LMO2 é observada em associação a outros marcadores do CG a exemplo dos genes *Histidine Ammonia-Lyase*, CD10 e BCL6. Sua expressão está

associada com bom prognóstico em LDGCB tratados com antracíclico com ou sem rituximabe (LOSSOS et al., 2004; NATKUNAM et al., 2008; MALUMBRES et al. 2008).

Recentemente Cubedo et al. (2012) demonstraram possível papel do LMO2 na montagem e segregação cromossômica durante a mitose, no ciclo celular, no nucleossomo, na estrutura do cinetócoro e na indução de centrosomo supranumerário.

Alizadeh et al. (2011) construíram e validaram o anticorpo anti-LMO2 para avaliar a expressão de LMO2 por IHQ. Nesse estudo a expressão de LMO2 foi observada nos CG normais, além de outras células; e nos LDGCB se correlacionou com a expressão de marcadores do CG (*Human Germinal Center-associated Lymphoma*, BCL6 e CD10) e com a ausência da expressão de marcadores NCG (MUM1/IRF4 ou BCL2). Apresenta robusta marcação nuclear na parafina, podendo contribuir para o diagnóstico dos linfomas derivados do CG.

2. 3. 3. 3 Gene BCL6

O gene BCL6 localiza-se no cromossomo 3q27 e codifica uma proteína nuclear supressora de transcrição (CHAGANTI et al., 1998; KLEIN; DALLA-FAVRA, 2008). Está usualmente expresso em centroblastos, na maioria dos centrócitos e em células T CD4-positivas do CG. Entretanto encontra-se suprimido durante a diferenciação de centrócitos para células B de memória ou plasmócitos (CATTORETTI et al., 1995; KLEIN; DALLA-FAVRA, 2008). Atua controlando a formação e a manutenção do CG e da resposta imune dependente de linfócitos T (YE et al., 1997; KLEIN; DALLA-FAVRA, 2008).

Para manter a alta taxa de proliferação no CG, à despeito do estresse genômico ocasionado pelos fenômenos de hipermutação somática e troca de classes de imunoglobulina, o gene BCL6 inibe os genes supressores do ciclo celular (p21, inibidor da quinase dependente

de ciclina), da apoptose (supressor tumoral p53) e o sensor de dano ao DNA (ataxia teleangiectasia relacionado a *Rad3* [ATR]). Além disso, o BCL6 impede a ativação prematura de centroblastos ao inibir os genes ativadores de linfócitos B CD69, STAT1 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 1) e CD80. A proteína BCL6 bloqueia a diferenciação de centrócitos pela supressão do *PR domain zinc finger protein 1* (PRDM1) que por sua vez codifica o BLIMP1, resultando na inibição da formação de plasmócitos (PAREKH et al., 2007; KLEIN; DALLA-FAVRA, 2008) (Figura 3). Ademais, inibe a formação de células B de memória, por mecanismos genéticos ainda pouco conhecidos (KLEIN; DALLA-FAVRA, 2008). O BCL6 modula negativamente os genes CCND2 e SCYA3 (SHAFFER et al., 2000).

Está amiúde constitutivamente expresso no LDGCB como resultado de translocações (30% a 40%) ou de mutações pontuais (50% a 70%) (LOSSOS et al., 2001). A desregulação do BCL6 pode provocar o bloqueio da diferenciação de células pós-CG, determinando o acúmulo de células hipermutadas, o que no contexto de uma assinatura pró-proliferativa pode contribuir para a linfomagênese.

A hiperexpressão do gene BCL6 correlacionou-se com melhor SG em pacientes tratados com CHOP-símile (LOSSOS et al., 2001; HANS et al., 2004; BERGLUND et al., 2005; WINTER et al., 2006; NATKUNAM et al., 2008). Com a adição do rituximabe, alguns estudos demonstraram o mesmo (MALUMBRES et al., 2008; WILSON et al., 2008), enquanto outros não encontraram diferença significativa na SG (WINTER et al., 2006; DUPUIS et al., 2007; NATKUNAM et al., 2008). Winter et al. (2006) demonstraram que pacientes com LDGCB sem expressão de BCL6 por IHQ se beneficiaram mais da adição de rituximabe à quimioterapia (SG de 42% CHOP *versus* 76% R-CHOP) do que os pacientes BCL6-positivo (SG de 73% CHOP *versus* 74% R-CHOP), esse efeito provavelmente é decorrente da supressão da via Fator Nuclear Kapa B (NF κ B) pelo rituximabe, caracteristicamente ativada no LDGCB-NCG (WINTER et al., 2006).

Figura 3 – Papel do gene BCL6 no desenvolvimento dos linfócitos B. O antígeno em contato com as células dendríticas da zona T leva à produção de quimiocinas que atraem os linfócitos B *naïve* (IgM+/IgD+). As células B *naïve* se ativam em contato com os linfócitos T CD4+ (ligação CD40-CD154) e células apresentadoras de antígenos (APC). Podem então seguir dois destinos: o extrafolicular, caracterizado pela transformação em plasmócitos secretores de IgM (resposta primária) ou o intrafolicular, movendo-se para os folículos primários. No folículo primário, constituído por células B IgM+/IgD+ recirculantes e por APC, começam a proliferar (formação do CG) e deslocam as células B recirculantes para a periferia formando a zona do manto, a essa estrutura mais complexa chama-se folículo secundário. As células B ativadas por antígenos diferenciam-se em centroblastos, que sofrem expansão clonal na zona escura do CG. Os centroblastos passam pelo processo de hipermutação somática da região variável das cadeias leve e pesada das imunoglobulinas. Nos centroblastos a expressão do BCL6 assegura a proliferação, por meio da inibição de genes supressores do ciclo celular e de genes indutores da apoptose (ao mesmo tempo em que não expressa BCL2), concomitantemente reduz o sensor de detecção de dano genético permitindo que os fenômenos de hipermutação somática e posteriormente troca de classe de imunoglobulina ocorram. Os centroblastos diferenciam-se em centrócitos e movem-se para a zona clara do CG, onde a eficiência do receptor de células B (BCR) modificado em se ligar ao antígeno é testada, com a ajuda dos linfócitos T e APC. A ligação adequada o seleciona para viver (baixa expressão de BCL2), enquanto que os que falham em ligar-se sofrem apoptose. Na zona clara, um subgrupo de centrócitos sofre o fenômeno troca de classe de imunoglobulina (formação de IgG, IgE e IgA). Os centrócitos selecionados por antígenos podem desenvolver-se em células B de memória ou plasmócitos. Na zona clara a ligação com os linfócitos T ativa a via NFκB, que resulta no aumento do IRF4 e redução da expressão do BCL6, ao mesmo tempo em que a ativação do BCR também leva à degradação do BCL6 por ubiquitinação. Ocorre ainda acetilação reversível do BCL6, por sinais desconhecidos. Uma vez que o BCL6 é desligado, a célula pode então sair do CG e diferenciar-se. O desligamento do BCL6 libera a expressão do BLIMP1, responsável pela diferenciação plasmocítica. Essa via vai ser seguida por aqueles centrócitos com BCR de maior afinidade e que desligam o PAX-5. As células B de memória parecem seguir seleção estocástica. A manutenção do PAX-5, associada talvez a constata estimulação pela ligação do CD40 ou pela STAT5, determinam esse destino (modificado de KLEIN; DALLA-FAVRA, 2008). BCR: Receptor de células B. Ig: Imunoglobulina. STAT1 e 5: Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 e 5. NFκB: Fator Nuclear Kapa B. IRF4: Fator regulatório de interferon 4. XBP1: *X-box binding protein 1*. PAX-5: *Paired box protein*. BLIMP1 ou PRDM1: *PR domain zinc finger protein 1*. ATR: *Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*.

2. 3. 3. 4 Gene FN1

O gene fibronectina 1 (FN1) localiza-se no cromossomo 2q34 e codifica a glicoproteína fibronectina solúvel no plasma em forma dimérica ou restrita à superfície celular ou matriz extracelular sob a forma multimérica (FN1[...], 2012). É uma proteína ligante de receptores de adesão celular da família da integrina e reguladoras do citoesqueleto (CLARK et al., 2000). A fibronectina está envolvida no processo de adesão e migração celular (MAO; SCHWARZBAUER, 2005; TAKAHASHI et al., 2007) durante a embriogênese, na cicatrização de feridas (MIDWOOD et al., 2006), na coagulação sanguínea (CHO; MOSHER, 2006), na defesa do organismo (BROWN, 1983) e em metástases (AKIYAMA; OLDEN; YAMADA, 1995; CLARK et al., 2000). O gene FN1 foi implicado no prognóstico dos LDGCB no qual compõe o grupo de genes associados à assinatura gênica linfonodal descrita por Rosenwald et al. (2002). Os genes dessa assinatura gênica codificam componentes da matriz extracelular e foram associados a prognóstico favorável em LDGCB (ROSENWALD et al., 2002; LOSSOS et al., 2004). Podem refletir a presença de células mesenquimais no microambiente tumoral como resposta do linfonodo às células tumorais. No estudo de Malumbres et al. (2008) o gene FN1 de forma isolada não apresentou correlação prognóstica significativa para SG e SLP.

2. 3. 3. 5 Gene BCL2

O gene da leucemia linfoma 2 ou BCL2 localiza-se na região 21.3 do braço longo do cromossomo 18 (18q21.3) e codifica uma proteína que se localiza na membrana externa da mitocôndria e atua inibindo a morte celular programada ou apoptose (B-CELL, 2012). A proteína BCL-2 está ausente ou expressa em baixos níveis no CG dos folículos secundários (ALIZADEH et al., 2000; LOSSOS et al., 2004). Os centrócitos com mutações que resultem num aumento da afinidade, são resgatados da apoptose e re-expressam a proteína BCL2 (THE INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2008) (Figura 3), sequencialmente o RNA mensageiro (RNAm) do gene BCL2 é induzido mais de 30 vezes durante a ativação das células B periféricas (ALIZADEH et. al., 2000).

A BCL2 está ainda altamente expressa no linfoma folicular. A t(14;18) envolvendo o gene da cadeia pesada da imunoglobulina e o BCL2 ocorre devido a erros durante a recombinação VDJ. A translocação leva à hiperexpressão de BCL2 e à formação de clones de linfócitos de longa sobrevivência, suscetíveis a defeitos moleculares adicionais, podendo resultar em linfoma (NATKUNAM, 2007). Essa translocação é a marca do linfoma folicular, mas é observada em 10% a 40% dos LDGCB (GASCOYNE et al., 1997). Alizadeh et al. (2000) demonstraram que a maioria dos LDGCB-NCG (71%) tinham o nível de RNAm mais que quatro vezes do que o observado nas células do CG e que isso não se correlacionava com a translocação do BCL2; e uma minoria dos LDGCB-CG (29%) tinha semelhantemente elevado o RNAm do BCL2, indicando que nesse grupo o BCL2 possa ter importância em alguns casos.

Assim, a presença da t(14;18) não necessariamente resulta em hiperexpressão de BCL2 e vice-versa (GASCOYNE et al., 1997; KRAMER et al., 1996; HILL et al., 1996; DE PAEPE et al., 2005; AMARA et al., 2008).

Na era pré-rituximabe, o prognóstico da hiperexpressão do gene BCL2 era controverso. Seu valor preditivo para SG por IHQ foi associado, na maioria dos estudos, a pior prognóstico (HERMINE et al., 1996; GASCOYNE et al., 1997; COLOMO et al., 2003; BERLUND et al., 2005). Ao contrário de Alizadeh et al. (2000), Hans et al. (2004) demonstraram que a expressão do BCL2 não apresentava diferença significativa nos subgrupos de LDGCB-CG (59%) e LDGCB-NCG (43%) por IHQ, provavelmente refletindo que nem sempre o RNAm se translada em proteína. Entretanto quando expresso no subtipo NCG era associado a mau prognóstico ($p=0,019$) (HANS et al., 2004).

A maioria dos estudos posteriores demonstraram que o prognóstico negativo associado ao gene BCL2 desapareceu com adição de rituximabe à quimioterapia (MOUNIER et al., 2003; MOUNIER et al., 2006; WINTER et al., 2006; SHIVAKUMAR; ARMITAGE, 2006; SJÖ et al., 2007; FU et al., 2008; WILSON et al., 2008). O rituximabe melhorou a SLP em pacientes tanto BCL2-positivo (56% *versus* 25%, $p=0,0001$) como BCL2-negativo (59% *versus* 33%, $p=0,02$), mas especialmente nos BCL2-positivo ($p=0,03$). O impacto do rituximabe na SG dos casos BCL2-positivo (56% *versus* 42%, $p=0,01$) foi maior que no grupo BCL2-negativo (58% *versus* 52%, $p=0,6$) (MOUNIER et al., 2006). Fu et al. (2008) também demonstraram que em pacientes tratados com rituximabe a expressão de BCL2 não piorou a SG geral ($p=0,33$) e nos subtipos LDGCB-CG ($p=0,18$) e LDGCB-NCG ($p=0,66$). Entretanto, Iqbal et al. (2011) demonstraram que a expressão de BCL2 apresenta prognóstico adverso no subtipo de LDGCB-CG tratado com R-CHOP, mas não no subtipo de LCBG-NCG.

O rituximabe parece abolir o efeito adverso do BCL2, o que pode ser explicado por sua capacidade de induzir apoptose por diversas vias de sinalização intracelular que atuam inibindo ambos BCL2 e *B-cell lymphoma-extra large* (BCL-xL). O rituximabe induz regulação negativa de interleucina-10 (IL-10) e consequentemente reduz a fosforilação da via

do Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3) e assim a expressão do BCL2 (Figura 4) (FU et al., 2008; AMOROSO et al., 2011).

Além disso, reduz *in vitro* a ativação da via NF κ B por meio da indução da proteína inibidora da quinase Raf-1 e, por conseguinte, o gene BCL2 (DAVIS et al., 2001; WILSON et al., 2008; IQBAL et al., 2006; DUNLEAVY; WILSON, 2011; AMOROSO et al., 2011) (Figura 4). No LDGCB-CG outros mecanismos estão associados à hiperexpressão do BCL2 (DUNLEAVY; WILSON, 2011).

Figura 4 - Inibição das vias de apoptose do BCL2 e do BCLxL pelo rituximabe. O rituximabe inibe a P38/MAPK, levando à inibição das vias NF κ B e SP1, reduzindo a síntese de IL-10, que leva à subregulação da via da STAT3 resultando na inibição do gene anti-apoptótico BCL2, resultando em quimiossensibilização. Paralelamente, ao inibir as vias Raf-1/ERK1/2, NF κ B e AKT também inibe o gene pró-apoptótico BCLxL (modificado de Amoroso et al., 2011). MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*. NF κ B: Fator Nuclear kapa B. SP1: Proteína da especificidade 1. IL-10: Interleucina-10. IL-10R: Receptor de interleucina-10. STAT3: Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1. MEK1/2: *Mitogen-activated protein kinase 1/2*. ERK 1/2: Quinase reguladora do sinal extracelular 1/2. AP-1: Proteína ativadora-1. NIK: *NF- κ B inducing kinase*. IKK: Inibidor da quinase do fator nuclear kapa B. I κ B: Inibidor do fator nuclear kapa B. PI3K: Fosfatidilinositol-3-quinase. PDK-1: Proteína quinase 1 dependente do fosfoinosítídeo. AKT: Proteína quinase B.

2. 3. 3. 6 Gene CCND2

O gene CCND2 localiza-se na região 1.3 do braço curto do cromossomo 12p13 (CCND2[...], 2012). Codifica a proteína CCND2 que atua no ciclo celular ligando-se às proteínas quinases dependentes de ciclina (CDK) 4 e 6 (Figura 5). Este complexo inicialmente fosforila e subsequentemente inibe o produto do gene supressor tumoral retinoblastoma (pRb). Este gene atua inibindo a transcrição de genes envolvidos na passagem pelo ponto de checagem celular ou ponto de restrição da fase G1 para a fase S do ciclo celular (CHILES, 2004). A CCND2 ativa a proliferação celular exatamente no ponto desta transição. Desta forma acelera ou induz a proliferação ou entrada da célula em ciclo celular em oposição ao pRb, que atua como freio do ciclo celular.

Figura 5 – Participação da CCND2 no ciclo celular. Ao formar o complexo com cdk4/6 induz a fosforilação e consequente inibição de pRb liberando a célula para progressão no ciclo celular da fase G1 para a fase S. CDK: Quinase dependente de ciclina. pRb: produto do gene retinoblastoma.

A CCND2 é importante mediadora da progressão G1/S induzida pela ativação do BCR. A estimulação do BCR de linfócito B maduro desencadeia a entrada da célula na fase G1 do ciclo celular. Concomitantemente há elevação dos níveis de CCND2, mas não o suficiente para a passagem da célula além o ponto de restrição. Entretanto, agonistas do BCR podem induzir expressão de CCND2 em linfócito B transicional tipo 2 e sua conseqüente proliferação (CHILES, 2004).

A indução de CCND2 é necessária para a expansão clonal de linfócito B mediada pelo BCR. Sua expressão é ativada no linfócito B periférico ativado e encontra-se constitutivamente expressa em altos níveis em LDGCB. Porém não é detectada em célula B periférica virgem CD27-negativa e em célula B de memória CD27-positiva (CHILES, 2004).

Os centroblastos e centrócitos do CG, local onde há alta taxa de proliferação de linfócito B, não expressam CCND2. Esta proliferação é mantida pelo gene ciclina D3 e outros. Os linfócitos do CG parecem optar por suprimir a expressão de CCND2 para favorecer a proliferação em detrimento do crescimento celular. Os linfócitos B do CG respondem ao estímulo antigênico ativando sua diferenciação até plasmócito na bainha linfóide periarteriolar ou até células B de memória na região folicular (CHILES, 2004). O gene BCL6 é expresso no linfócito B do CG e, enquanto ativo, bloqueia sua diferenciação (KLEIN; DALLA-FAVRA, 2008). O gene BCL6 também é responsável pela supressão do gene CCND2 (SHAFFER et al., 2000). A ativação da via da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) /NF κ B, a qual se encontra constitutivamente ativa no LDGCB-NCG, é necessária para induzir a expressão de CCND2 após a ativação do BCR (CHILES, 2004).

A expressão de CCND2 ocorre em 14% a 27% dos LDGCB e está associada a pior prognóstico em estudos de IHQ (HANS et al., 2004; HANS et al., 2005) e no modelo de seis genes em pacientes tratados com e sem rituximabe (LOSSOS et al., 2004; MALUMBRES et al., 2008).

2. 3. 3. 7 Gene SCYA3

O gene SCYA3 localizado no braço longo do cromossomo 17 na região 1.2 (17q12) (CCL3 [...], 2012) é também denominado de Proteína Inflamatória de Macrófago-1-alfa (MIP-1-alfa) ou *chemokine (C-C motif) ligand 3* (CCL3). Codifica uma quimiocina C-C recrutadora de células para áreas de inflamação (PROOST; WUYTS; VAN DAMME, 1996) e possivelmente influencia o papel do microambiente na patogênese do LDGCB. A expressão de seu RNAm foi correlacionada com prognóstico favorável para SG e SLP em LDGCB tratados com R-CHOP (MALUMBRES et al., 2008). Em contraposição, em pacientes tratados com CHOP-símile sem rituximabe foi correlacionou-se com mau prognóstico. Sua expressão foi associada a assinatura gênica de LDGCB-NCG (LOSSOS et al., 2004). À exemplo do gene CCND2, a expressão do gene SCYA3 é inibida pelo gene BCL6 (SHAFFER et al., 2000).

2. 4. TRATAMENTO

Inicialmente o LDGCB foi tratado com terapia única com radioterapia, porém com resultados insatisfatórios (SPICER et al., 2004). Entretanto estudos posteriores permitiram sua evolução terapêutica com a introdução de esquemas quimioterápicos com múltiplos fármacos e à base de antracíclico. O esquema CHOP tornou-se o padrão de tratamento para LDGCB a partir da década de 70 (ELIAS; PORTLOCK; ROSENBERG, 1978; FISHER et al., 1993). Posteriormente, em 2002, ocorreu outro grande avanço com a incorporação do anticorpo monoclonal anti-CD20 (rituximabe) ao esquema CHOP, o que proporcionou ganho de SG de 20% para os portadores do LDGCB.

2. 4. 1 Quimioterapia

Com o esquema CHOP a SG dos portadores de LDGCB é de 30% em 12 anos para pacientes com doença avançada ou estadios III/IV ou II com massa tumoral superior a 10cm (*bulky*) (FISHER et al., 1993). Resultados semelhantes são observados com esquemas de terceira linha ou com maior intensidade de dose como bleomicina, hidroxi-doxorrubicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona (m-BACOD); prednisona, doxorrubicina, ciclofosfamida, etoposide, citarabina, bleomicina, vincristina, metotrexate (ProMACE-CytaBOM) ou metotrexate, hidroxi-doxorrubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona e bleomicina (MACOP-B). Porém estes esquemas se associaram a maior taxa de toxicidade em relação ao CHOP (FISHER et al., 1993). Entretanto pacientes com estadios localizados I e II sem *bulky* podem apresentar SG em 5 anos de até 90% (MILLER et al., 1998, 2001, 2004; SHENKIER et al., 2002). No serviço de Hematologia do HC-FMUSP estudo comparando

pacientes jovens tratados com ProMACE-CytaBOM (N=111) *versus* CHOP (N=77) também não evidenciou diferença significativa quanto à SG ou sobrevida livre de doença (SLD) (HALLACK NETO et al., 2006).

Em 2004, o estudo NHL-B2 (N=689) do grupo alemão demonstrou que pacientes idosos de 61 a 75 anos com LDGCB tratados com CHOP-14 apresentaram melhores taxas de RC ($p=0,001$), SLE ($p=0,003$) e a SG ($p<0,001$) em relação ao CHOP-21, com perfis semelhantes de toxicidade (PFREUNDSCHUH et al., 2004a). Entretanto pacientes tratados com CHOEP-14 (etoposide incorporado ao CHOP) e CHOEP-21, apesar de discreta melhora nas taxas de SG (49,8% e 45,8%,) em relação ao esquema CHOP-21 (40,5%) à custa de maior toxicidade, não apresentaram benefícios na SLE ($p=0,064$ e $p=0,145$) (PFREUNDSCHUH et al., 2004a).

No mesmo ano, o estudo LNH-B1 (PFREUNDSCHUH et al., 2004b) demonstrou melhores resultados no tratamento do paciente jovem com LNH agressivo (60% LDGCB) de baixo risco, com a incorporação do etoposide ao CHOP (CHOEP), o que resultou num aumento de 11,6% na SLE em 5 anos ($p=0,004$) e de 8,2% da RC ($p=0,003$). No entanto, o aumento da densidade determinou discreto aumento da SLE (aumento de 3,1%, $p=0,588$) e da SG (aumento de 5,8%, $p=0,044$) em 5 anos. Em relação ao CHOP-21, o CHOEP-14 demonstrou melhores taxas de RC (aumento de 10,3%, $p=0,007$), SLE (aumento de 14,7% $p=0,017$) e SG (aumento de 10,2%, $p=0,034$) e, apesar da maior mielotoxicidade, foi bem tolerado.

2. 4. 2 Radioterapia

Pacientes com estadió clínico I e II com doença *bulky* parecem se beneficiar da adição da radioterapia de consolidação ao R-CHOP (WIRTH, 2007; PFREUNDSCHUH et al., 2011). No LDGCB avançado a radioterapia tem sido mais controversa. Avilés et al. (2005) compararam 160 pacientes com LDGCB IPI intermediário alto ou alto, com massa residual menor que 5cm, consolidados ou não com radioterapia 30Gy; e observaram melhores taxas de SLP (86% *versus* 32%, $p < 0,001$) e SG (89% *versus* 58%, $p < 0,001$) em 10 anos para o grupo da radioterapia. A radioterapia é usada por muitos autores como estratégia de consolidação para envolvimento extralinfonodal e de regiões com maior risco de progressão ou recaída como o sistema nervoso central, massas residuais e áreas previamente acometidas por doença *bulky* (ARMITAGE, 2007; WIRTH, 2007).

No LDGCB testicular a radioterapia reduz a recaída no testículo contralateral e no sistema nervoso central melhorando a SG e a SLP (ZUCCA et al., 2003; VITOLO et al., 2006). Da mesma forma reduz recidivas nos LDGCB com acometimento de mama (RYAN et al., 2005) e talvez os de cabeça e pescoço (CORTELAZZO et al., 2007; CHRISTIE et al., 2007). Além disso, associa-se com bons resultados na consolidação do LDGCB gástrico (WIRTH, 2007). A irradiação de doença *bulky* após a quimioterapia em estadió clínico avançado é contraditória, sugere-se abordagem individualizada, considerando-se o local e os riscos do paciente (ARMITAGE, 2007; WIRTH, 2007). O advento do PET/TC na avaliação da viabilidade de massas residuais pode ajudar a otimizar a decisão terapêutica em relação à radioterapia de consolidação (JUWEID et al., 2007; SPECHT, 2007).

2. 4. 3 Imunoterapia

Em 2002 foram reportados resultados do primeiro estudo prospectivo randomizado com rituximabe – o estudo LNH-98.5. A adição de rituximabe a 8 ciclos de CHOP-21 em idosos de 60 a 80 anos com LDGCB resultou em melhores taxas de RC (76% *versus* 63%, $p=0,005$), SLE (57% *versus* 38%, $p<0,001$) e SG em dois anos (70% *versus* 57%, $p=0,007$). Concomitante houve redução das taxas de falha ao tratamento e de recaída em relação ao grupo tratado com 8 ciclos de CHOP-21 sem rituximabe, sem aumento da toxicidade (COIFFIER et al., 2002). A atualização deste estudo com seguimento de 10 anos demonstrou que a adição de rituximabe elevou em 16% a SLP e a SG em 10 anos e, chegando a 22% no subgrupo em primeira RC. O R-CHOP melhorou a SLP (36,5% *versus* 20,1%, $p<0,0001$), a SLD (64,3% *versus* 42,6%, $p<0,0001$) e a SG (43,5% *versus* 27,6%, $p<0,0001$) em 10 anos em relação ao CHOP. A taxa de progressão de doença foi de 87% nos primeiros três anos (90% CHOP *versus* 83% R-CHOP), 6% entre quatro e cinco anos (5% CHOP *versus* 8% R-CHOP) e 7% (5% CHOP *versus* 10% R-CHOP) após cinco anos. Neoplasias secundárias ocorreram igualmente nos dois braços (10,8%) (COIFFIER et al., 2010). Estes dados reforçaram que, a exemplo dos pacientes jovens, os idosos também deveriam ser tratados com intenção curativa.

No estudo RICOVER-60 (PFREUNDSCHUH et al., 2008a) foram comparados 6 e 8 ciclos de CHOP-14, com ou sem 8 doses de rituximabe, em idosos entre 61 e 80 anos, com LNH agressivo (80% LDGCB). O esquema 6 R-CHOP-14 obteve os melhores resultados. Elevou em 19,3% a SLE ($p<0,0001$), em 10,4% a SG ($p=0,0181$) e em 16,5% a SLP ($p<0,001$) em três anos. Além disso, o estudo não demonstrou vantagem de se realizar oito ciclos em relação a seis ciclos em pacientes em resposta parcial (RP) após o quarto ciclo. Portanto, seis R-CHOP-14 foi sugerido como novo tratamento padrão para idosos com

LDGCB. Em maio de 2012, o estudo LNH03-6B (DELARUE et al., 2012) comparou 8 R-CHOP-14 *versus* 8 R-CHOP-21, em idosos de 60 a 80 anos com LDGCB e IPI superior ou igual a um; e não encontrou diferença significativa em relação a RC (71% *versus* 74%, $p=0,42$), SLE (56% *versus* 60%, $p=0,79$), SLP (60% *versus* 62%; $p=0,90$), SLD (72% *versus* 67%, $p=0,80$) e SG (69% *versus* 72%, $p=0,75$). Entretanto, foram observados mais eventos adversos graves e morte por toxicidade no subgrupo tratado com R-CHOP-14.

O estudo *Mabthera Internacional Trial* (MInT) comparou 6 CHOP-símile (CHOP-21, CHOEP-21, MACOP-B ou mitoxantrona, ciclofosfamida, etoposide, vincristina, bleomicina e prednisona [PMitCEBO]) com ou sem rituximabe, em jovens de 18 a 60 anos, IPIai 0-1, estadio clínico I com *bulky*/II/III/IV com LNH agressivo (87% LDGCB). A primeira avaliação aos 34 meses demonstrou superioridade para a quimioterapia associada ao rituximabe (PFREUNDSCHUH et al., 2006). Aos 72 meses de seguimento esta superioridade se manteve para SLE (80,2% *versus* 63,9%, $p<0,0001$), SLP (74,3% *versus* 55,8%, $p<0,0001$), SLR (86,1% *versus* 80%, $p=0,046$) e SG em seis anos (90,1% *versus* 80%, $p=0,0004$). Não houve diferença na incidência de segunda neoplasia (4,4% *versus* 3,9%, $p=0,780$). Quando comparados grupos sem fatores de risco (IPIai zero e sem *bulky*) e com fatores de risco, a SLE em seis anos foi de 84,3% *versus* 71% ($p=0,005$). A SLP foi de 89,6% *versus* 77,1% ($p=0,003$) e a SG de 94,9% *versus* 88,6% ($p=0,029$), respectivamente (PFREUNDSCHUH et al., 2011). O protocolo R-PMitCEBO foi inferior aos demais em relação a SLE ($p<0,0001$). O CHOEP-21 foi melhor que o CHOP-21 para SLE (60,1% *versus* 50,4%, $p=0,037$). Porém, não houve diferença para SLE entre R-CHOEP-21 e R-CHOP-21 (75,1% *versus* 75,4%, $p=0,571$). Devido à menor toxicidade, o R-CHOP-21 é preferível nessa população.

2. 4. 4. Transplante de Medula Óssea

Desde a era pré-rituximabe o transplante de medula óssea autólogo (ATMO) é considerado padrão para consolidar pacientes com LDGCB refratários ou recidivados quimiossensíveis à terapia de resgate. No estudo PARMA (PHILIP et al., 1995), 215 pacientes com LDGCB recaídos ou refratários foram tratados com dois ciclos de quimioterapia de resgate. Os pacientes que responderam (N=109) foram distribuídos aleatoriamente para receber quatro ciclos de quimioterapia seguida de radioterapia (N=54) ou quimioterapia em altas doses seguida de ATMO (N=55). A resposta global (RG) após a quimioterapia de resgate foi 64% nos pacientes recidivados e 21% nos refratários primários. A RG foi 84% após ATMO e 44% após a quimioterapia sem ATMO. A SLE e a SG em 5 anos foram, respectivamente, 46% *versus* 12% (p=0,001) e 53% *versus* 32% (p=0,038).

Entretanto, pacientes que recaem após rituximabe apresentam resultado desfavorável com ATMO (GISSELBRECHT et al., 2010). No estudo CORAL, 396 pacientes com LDGCB CD20-positivo, 42% refratários primários ou com recidiva precoce e 58% com recidivada acima de 12 meses, foram resgatados com três ciclos de rituximabe, ifosfamida, etoposide e carboplatina (R-ICE) ou rituximabe, dexametasona, citarabina em altas doses e cisplatina (R-DHAP). Os respondedores receberam BCNU, etoposide, citarabina e melfalan (BEAM) seguido de ATMO (N=206) e foram randomizados para observação ou manutenção com rituximabe por um ano. Não houve diferença entre os esquemas R-ICE e R-DHAP em relação às taxas de mobilização, SLE em 3 anos (26% *versus* 35%, p=0,6), SG em 3 anos (47% *versus* 51%, p=0,5) e resposta (63,5% *versus* 62,8%), com 38% de RC. Fatores implicados na resposta foram doença refratária <12 meses (46% *versus* 88%), IPI da falha >1 (52% *versus* 71%) e exposição prévia ao rituximabe (51% *versus* 83%). Pior SLE se relacionou a tratamento prévio com rituximabe (21% *versus* 47%, p<0,0001), recaída inferior a 12 meses

(20% *versus* 45%, $p < 0,0001$) e IPI da falha 2-3 (18% *versus* 40%, $p = 0,0001$). Demonstrando que pacientes com falha em menos de 12 meses após o uso do rituximabe em primeira linha têm prognóstico muito reservado.

O transplante alogênico de células tronco parece ser uma abordagem promissora no LDGCB refratário à quimioterapia de resgate e ao ATMO. Um estudo retrospectivo com 101 pacientes com LDGCB com falha após ATMO submetidos a transplante de medula óssea alogênico mieloablativo (N=37) ou com condicionamento reduzido (N=64) demonstrou mortalidade não relacionada à recaída em 3 anos de 28,2% (significativamente maior para idade ≥ 45 anos [$p = 0,01$] e em recaída precoce após ATMO [$p = 0,01$]), recaída de 30,1%, SLP de 41,7% (significativamente maior naqueles que recaíram precocemente após ATMO [$p = 0,03$]) e SG de 53,8%. O condicionamento reduzido mostrou tendência à menor mortalidade não relacionada à recaída, porém com maior recaída, sem diferença para SLP ou SG. O tipo de doador (aparentado ou não) não influenciou o resultado (VAN KAMPEN et al., 2011). Um importante ponto de questionamento deste estudo foi o fato de que apenas 19% dos pacientes tinham recebido rituximabe previamente ao transplante. Desta forma selecionou-se grupo de prognóstico menos reservado dentro do grupo de refratários. A manutenção de resposta com infusão de linfócitos do doador também corrobora a existência do efeito enxerto contra linfoma e o uso do transplante alogênico (BISHOP et al., 2006).

O único estudo prospectivo comparando transplante de medula óssea alogênico e autólogo para pacientes com linfoma em recaída (metade com LDGCB) não demonstrou diferença na SLP em 2 anos (47% *versus* 24%, $p = 0,21$). Entretanto, as recaídas foram menores no grupo alogênico (RATANATHARATHORN et al., 1994; SHIPP et al., 1999).

Na era pré-rituximabe, melhores resultados eram obtidos em pacientes jovens com LDGCB e IPI intermediário alto ou alto com a consolidação com ATMO em primeira RC (HAIOUN et al., 2000; HALLACK NETO, 2008). Entretanto, na era pós-rituximabe a

quimioterapia em altas doses seguida de ATMO não é mais usada no tratamento inicial do LDGCB, uma vez que o ATMO está associado a morbidade significativa e a sobrevida é a mesma para pacientes tratados com ou sem ele. Essa estratégia é sustentada por uma meta-análise incluindo dados de 15 estudos randomizados controlados (N=3079) de pacientes com LNH agressivo, que demonstrou semelhante SG e SLE para pacientes consolidados ou não com o ATMO (GREB et al., 2008).

Da mesma forma, Glass et al. (2011) compararam 8 ciclos de R-CHOEP-14 (N=130) *versus* 4 ciclos de R-MegaCHOEP (N=132) seguido por ATMO em pacientes jovens com LNH agressivo IPI 2-3 e não demonstraram nenhum benefício da quimioterapia em altas doses seguida de ATMO sobre o rituximabe: SLP em 3 anos de 69,8% *versus* 73,7% (p=0,475) e SG em 3 anos de 77% *versus* 84,6% (p=0,081).

Entretanto dados conflitantes são relatados pelo estudo fase II LNH2003-3 (FITOUSSI et al., 2011) do grupo *Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte* (GELA). Neste estudo foram tratados 209 pacientes jovens com LDGCB IPI 2-3 com 4 ciclos de rituximabe, hidroxi-doxorrubicina, ciclofosfamida, vindesina, bleomicina e prednisona (R-ACVBP). A RG foi 80% e a RC 61%. Pacientes em remissão (N=155) foram submetidos a ATMO com SG e SLP em 4 anos de 78% e 76%, respectivamente. Esses resultados foram comparados ao controle histórico tratado com ACVBP seguido de ATMO resultando em SG em 4 anos de 78% *versus* 58% (p=0,0005) e SLP em 4 anos de 76% *versus* 68% (p=0,0494), respectivamente. No grupo R-ACVBP, o aumento na SG foi significativo, especialmente para os pacientes que realizaram ATMO (88% *versus* 77%; p=0,0264).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar o impacto da expressão absoluta dos genes BCL2, BCL6, CCND2, FN1, LMO2 e SCYA3 em pacientes com LDGCB tratados com R-CHOP no contexto dos desfechos de resposta global, resposta completa, resposta parcial, sobrevida livre de doença, sobrevida livre de progressão e sobrevida global.

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

1. Avaliar em nossa casuística de portadores de LDGCB a aplicabilidade do modelo dos seis genes (BCL2, BCL6, CCND2, FN1, LMO2 e SCYA3) quantificados pela técnica de qRT-PCR conforme proposto por Lossos et al. (2004) e Malumbres et al. (2008).
2. Propor escore de prognóstico molecular aplicável à nossa casuística de pacientes com LDGCB na era do rituximabe.
3. Implantar a técnica de quantificação absoluta de expressão gênica pela técnica de qRT-PCR em amostras fixadas em formol e incluídas em parafina.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 PACIENTES

Após aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa do HC-FMUSP foi realizado estudo de coorte prospectivo com portadores de LDGCB tratados no Serviço de Hematologia do HC-FMUSP e no ICESP da FMUSP. De forma consecutiva, de setembro de 2008 a março de 2010, foram incluídos pacientes com idade maior ou igual a 17 anos, com LDGCB CD20-positivo, virgens de tratamento, que seriam submetidos à quimioterapia com R-CHOP.

Foram excluídos pacientes com sorologia positiva para o vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV) ou portadores de outras imunodeficiências adquiridas ou congênitas, pacientes com doença linfoproliferativa pós-transplante de órgão sólido, com outra neoplasia concomitante à exceção do carcinoma basocelular, com cardiopatia impeditiva ao uso de antracíclico e os casos com amostras indisponíveis.

4.2 DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO

O diagnóstico de LDGCB foi obtido por biópsia incisional ou excisional do tecido acometido utilizando-se a coloração hematoxilina-eosina e a marcação com anticorpos por IHQ para antígenos linfóides B (CD20), T (CD3) e o Ki-67, na Divisão de Anatomia Patológica do HC/ICESP-FMUSP. O diagnóstico foi definido pela presença de células linfóides grandes com tamanho nuclear maior ou igual ao núcleo do macrófago ou duas vezes o tamanho dos linfócitos normais com padrão de infiltração difuso dos linfonodos ou órgãos acometidos (THE INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2008) e

marcação positiva para CD20 e negativa para CD3. Os pacientes foram classificados segundo critérios da OMS de 2008 (THE INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2008). Todas as biópsias externas ao serviço foram revisadas localmente para confirmação do diagnóstico.

4.3 ESTADIAMENTO

Para o estadiamento foram realizadas TC de pescoço, tórax, abdômen e pelve e PET-scan ou PET/TC de acordo com a época de entrada do paciente no estudo. Para caracterização de áreas comprometidas utilizou-se o critério estabelecido por Cheson et al. (2007). No início do estudo apenas o PET-scan do serviço de medicina nuclear do Instituto do Coração estava disponível no complexo HC-FMUSP, mas a partir de 2011 os pacientes foram submetidos ao exame de PET/TC no ICESP. Em casos de comprometimento de anel de Waldeyer indicava-se realização de endoscopia digestiva alta. Biópsia de medula óssea bilateral foi realizada de rotina no estadiamento.

Exames de avaliação geral à exemplo de ecocardiograma, sorologia para HIV, hepatite B, hepatite C, HTLV I/II (vírus T-linfotrópico humano I e II) e sífilis, dosagem sérica de DHL, β 2-microglobulina, ácido úrico, albumina, provas de função hepática e renal e hemograma completo foram realizados antes do início do tratamento.

Os pacientes foram estratificados em estadios clínicos I, II, III e IV de acordo com os critérios de Ann Arbor (CARBONE et al., 1971) (Tabela 2). Considerou-se como doença *bulky* a presença de massa tumoral de tamanho igual ou superior a 10 cm. Pacientes com linfoma do trato gastrointestinal foram estadiados pelos critérios de Lugano (ROHATINER et al., 1994). A presença de sintomas B definida por perda de peso superior a 10% do peso

corporal em seis meses, febre persistente acima de 38°C e/ou sudorese noturna recorrente (LISTER et al., 1989).

A avaliação de resposta foi realizada utilizando-se os critérios do *International Workshop to Standardize Response Criteria for Non-Hodgkin's Lymphomas* (CHESON et al., 1999; 2007) (Tabela 8). A TC foi repetida após o quarto ciclo de quimioterapia e ao final do tratamento. O PET/TC ou PET-scan foram repetidos após término do tratamento. A biópsia de medula óssea foi repetida após término do tratamento em pacientes que obtiveram RC e apresentavam infiltração de medula óssea ao diagnóstico. A programação de segmento dos pacientes após o término do tratamento inclui exames laboratoriais de rotina e visita médica com exame físico completo a cada três meses nos primeiros dois anos, a cada quatro meses no terceiro ano, a cada seis meses no quarto ano e anuais a partir do quinto ano.

Tabela 8 – Definições de resposta ao tratamento

Tipo de Resposta	Definição
RC	1. Desaparecimento completo de sinais e sintomas relacionados ao linfoma; 2a. Linfoma ávido no PET: qualquer massa residual PET-negativa é permitida; 2b. Linfoma não-ávido no PET (raro)/PET desconhecido: - Linfonodos ou massa linfonodais >1,5cm devem ter regredido para $\leq 1,5$ cm no maior diâmetro transversal; - Linfonodos com maior eixo entre 1,1-1,5cm e menor eixo >1cm devem regredir para ≤ 1 cm no menor eixo; 3. Fígado e/ou baço aumentados: devem regredir no exame físico ou na TC para o tamanho normal e seus nódulos devem desaparecer; 4. Se medula óssea era infiltrada, biópsia de medula óssea ao final não deve ter sinais do linfoma.
RP	1. Regressão de pelo menos 50% no SPD; 2. Nenhum aumento nos demais linfonodos, fígado ou baço; 3. Nódulos esplênicos ou hepáticos devem ter regredido $\geq 50\%$ no SPD ou se nódulo único, no maior diâmetro transversal; 4. Envolvimento de outros órgãos é usualmente acessível, mas nenhuma doença mensurável deve estar presente; 5. RC pelos critérios acima, exceto por medula óssea infiltrada ou desconhecida (se era infiltrada ao diagnóstico); 6. Nenhum sítio novo de doença; 7. Linfoma ávido no PET: PET ao final da quimioterapia positivo em pelo menos um local previamente acometido; 8. Linfoma não-ávido no PET/PET desconhecido: usar critério da TC.
Doença Estável	1. Sem critérios para RC, RP ou progressão; 2. Linfoma ávido no PET: PET positivo nos mesmo locais do diagnóstico, sem aparecimento de novas áreas; 3. Linfoma não-ávido no PET: ausência de mudança no tamanho das lesões na TC em relação ao início do tratamento.
Doença recaída ou progressão	1. Linfonodos são anormais: - Sempre que eixo maior >1,5cm; - Quando o eixo maior está entre 1,1-1,5cm, se o menor eixo >1cm; 2. Aparecimento de nova lesão com qualquer eixo >1,5cm durante ou ao final do tratamento; 3. Aumento da captação de FDG em sítio novo só deve ser considerado linfoma após confirmação histológica; 4. Pelo menos um aumento de 50% do nadir na SPD de linfonodos previamente envolvidos, ou linfonodo único envolvido, ou no tamanho de outras lesões (ex.: nódulos esplênicos ou hepáticos); 5. Para se considerar progressão: - Linfonodo com eixo menor <1cm: deve aumentar pelo menos 50% e para um tamanho de 1,5 x 1,5cm ou mais de 1,5cm no maior eixo; - Se eixo menor >1cm: pelo menos 50% no maior diâmetro de qualquer linfonodo; - As lesões devem ser PET positivas nos linfomas ávidos por FDG, a menos que muito pequenas para serem detectadas com PET (<1,5cm no maior eixo na TC)

Fonte: Cheson et al. (2007). Nota: Não existe mais resposta completa não confirmada (ver Cheson et al., 1999) por esse critério. Doença extranodal não mensurável (ex.: lesão óssea, derrame pleural, etc.) deve ser considerada ausente ou presente. SPD: Soma do produto dos diâmetros dos seis maiores linfonodos/massas linfonodais. FDG: 2-F18-fluoro-2-deoxi-glicose. RC: Resposta completa. RP: Resposta parcial. PET: Tomografia por emissão de pósitrons. TC: Tomografia computadorizada.

4.4 TRATAMENTO

Os pacientes foram tratados com 4 a 8 ciclos de R-CHOP (Tabela 9) repetidos em intervalos de 21 dias. Quimioterapia citoredutora com ciclofosfamida $300\text{mg}/\text{m}^2$ D1, vincristina $1\text{mg}/\text{m}^2$ (máximo de 2mg) D1 e prednisona $60\text{mg}/\text{m}^2$ D1 a D5 antes do primeiro ciclo de R-CHOP foi realizada em pacientes com doença *bulky*, alto risco de desenvolvimento de síndrome de lise tumoral ou que apresentassem estado funcional superior a 2 pelo ECOG ao diagnóstico. Radioterapia de consolidação com 30 a 40 Gy foi indicada em região de *bulky*, em doença extralinfonodal e paravertebral. Pacientes refratários foram tratados com o protocolo vigente no serviço. Profilaxia do sistema nervoso central foi empregada em pacientes com comprometimento de região paravertebral, testículo, ovário, seios da face, anel de Waldeyer ou órbita e, em casos em que havia infiltração de medula óssea associada a comprometimento de pelo menos duas áreas extralinfonodais. A profilaxia envolveu quatro aplicações intratecais de 12mg de metotrexate e 2mg de dexametasona associado ou não a metotrexate sistêmico na dose de $1,5\text{g}/\text{m}^2$ no D1 do R-CHOP.

Tabela 9 – Protocolo R-CHOP

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

Fonte: Coiffier et al. (2002). EV: Via endovenosa. VO: Via oral.

4.5 MÉTODO MOLECULAR

4.5.1 Extração de RNA de amostras fixadas em formol e incluídas em parafina

O processo de extração do RNA das amostras fixadas em formol e incluídas em parafina (Figura 6) foi realizado no Laboratório de Genética e Hematologia Molecular – LIM31 do HC-FMUSP.

Figura 6 – Etapas do processo de extração do RNA a partir de amostras fixadas em formol e incluídas em parafina

O RNA foi extraído de cortes de amostras fixadas em formol e incluídas em parafina de 20µm de espessura utilizando-se o reativo RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation (Ambion, Inc, Austin, Texas, EUA) (Figura 6). Aos tubos contendo os cortes das amostras adicionou-se 1000µL de xileno a 100%. Estes foram homogeneizados em agitador e centrifugados a 7.600 x g. Em seguida a amostra foi aquecida a 50°C por 3' para derretimento da parafina e então centrifugada novamente por 2' à temperatura ambiente (TA) e à

velocidade máxima para obter agregado celular visível no fundo do tubo. Subsequentemente removeu-se o xileno e lavou-se o agregado celular duas vezes com 1000µL de etanol a 100%. Procedeu-se a nova centrifugação a vácuo e à TA por 10' para secar o agregado celular.

Adicionou-se 100µL de tampão de digestão em amostras contendo quantidade de RNA menor ou igual a 40µm e 200µL do tampão de digestão em amostras com quantidade de RNA entre 40-80µm (Tabela 10). Em seguida adicionou-se 4µL de protease, homogeneizou-se a amostra e procedeu-se à incubação a 50°C por 15' e a 80°C por mais 15'.

Adicionou-se então etanol/aditivo de isolamento. Logo após, homogeneizou-se a amostra delicadamente com pipeta, colocou-se o filtro *Cartridge* em cada tubo coletor e subsequentemente 700µL da mistura amostra/etanol. Os tubos foram centrifugados a 10.000 x g por 30'', desprezou-se o líquido filtrado e novamente colocou-se o filtro com posterior adição de 700µL da solução de lavagem 1 ao referido filtro. Centrifugou-se por 30'' a 10.000 x g, desprezou-se o líquido filtrado e colocou-se o filtro no mesmo tubo coletor, adicionando-se 500µL da solução de lavagem 2/3. Centrifugou-se por 30'' a 10.000 x g, desprezou-se o líquido filtrado e colocou-se outro filtro no mesmo tubo coletor.

Centrifugou-se por mais 30'' para remover o fluído residual do filtro e posterior adição de 60µL da mistura de DNase (Tabela 11) ao centro do filtro *Cartridge*, incubando-o em seguida por 30' à TA. Após lavagem do filtro com 700µL de solução de lavagem 1, incubou-se novamente por 60'' à TA. Em seguida centrifugou-se por 30'' a 10.000 x g, desprezou-se o líquido filtrado e colocou-se o filtro no mesmo tubo. Lavou-se duas vezes com 500µL de solução de lavagem 2/3, centrifugou-se por 1' a 10.000 x g para remover o líquido residual do filtro. Transferiu-se o filtro *Cartridge* para outro tubo coletor, aplicou-se 60µL de solução eluidora ou água livre de nuclease ao centro do filtro, o qual foi então vedado com tampa. O tubo foi mantido entre 22°C e 25°C por 1' e então centrifugado por 1' a 7.600 x g.

Ao final o material eluído contendo o RNA extraído foi estocado à temperatura inferior a -20°C até o momento do uso.

Tabela 10 – Volume dos reativos de acordo com a quantidade de RNA da amostra

Conteúdo de RNA	≤40µm	40-80µm
Tampão de digestão (µL)	100	200
Aditivo de isolamento (µL)	120	240
Etanol a 100% (µL)	275	550
Total (µL)	395	790

Tabela 11 – Mistura de DNase

Quantidade por reação	Reativo
6µL	10X tampão de DNase
4µL	DNase
50µL	Água livre de nuclease

4. 5. 2 Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real

A síntese de cDNA (Figura 7) foi realizada a partir de 1µg do RNA total obtido conforme descrito anteriormente. A preparação foi realizada conforme orientações do fabricante Promega. O cDNA foi obtido em volume final da reação de 20µL contendo 1µg de RNA total, 1µL de iniciadores aleatórios (20pmol), 4µL de Improm-II (5X tampão de reação), 1µL de dNTP mix (10mM de cada dNTP), 1µL de Improm-II (transcriptase reversa) e H₂O tratada com dietilpirocarbonato para completar o volume final de 20µL. As amostras foram submetidas às variações de temperatura de 25°C por 5', 55°C por 60' e 70°C por 15' no termociclador Real-Time PCR System da Roche Applied Science para obtenção do cDNA.

A qRT-PCR (Figura 7) foi realizada com o sistema TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e a análise foi feita no equipamento LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Os

valores quantitativos foram obtidos a partir do ciclo limiar (*cycle threshold* [Ct]) – ponto no qual a elevação do sinal fluorescente corresponde ao crescimento exponencial dos produtos da reação em cadeia de polimerase.

Figura 7 – Etapas da síntese de cDNA e do qRT-PCR

Curvas de eficiência e quantificação foram realizadas utilizando-se plasmídeos específicos para cada gene analisado, a partir de diluições seriadas de cada um dos plasmídeos. Os plasmídeos utilizados foram preparados no laboratório da Dra. Rose-Ann Padua do Institut Universitaire d'Hématologie do Hôpital Saint-Louis (1 avenue Claude Vellefaux 75010 Paris, France) e foram gentilmente cedidos pela Agência Internacional de Energia Atômica pela Dra. Diana Paez. A quantificação absoluta baseou-se na construção de curva padrão (Figura 8) com quantidades conhecidas do gene de interesse, assim foi possível

saber a quantidade expressa em cada amostra, plotando-se o número de ciclos necessários para amplificar e comparando-se com a quantidade correspondente na curva padrão.

Figura 8 – Curva padrão dos genes ABL, BCL2, BCL6, CCND2, FN1, LMO2 e SCYA3

Por último, os níveis de expressão dos genes BCL2, BCL6, CCND2, FN1, LMO2 e SCYA3 foram normalizados (divisão do número de cópias estimadas de cada gene estudado pelo número de cópias estimadas do gene ABL endógeno) (ANEXO A).

4.6 CONSTRUÇÃO DA MATRIZ GÊNICA EM BUSCA DA ORIGEM CELULAR

Os genes LMO2 e BCL6 fazem parte da assinatura gênica CG (ALIZADEH et al., 2000; ROSENWALD et al., 2002) e suas expressões são usadas em algoritmos de IHQ para caracterizar o LDGCB-CG (HANS et al., 2004; CHOI et al., 2009; MEYER et al., 2011). O gene FN1 faz parte da assinatura gênica linfonodal e os genes BCL2, CCND2 e SCYA3 da assinatura gênica de células B ativada (pós-CG) (ALIZADEH et al., 2000; ROSENWALD et al., 2002; SHAFFER et al., 2000; LOSSOS et al., 2004). Ambos, BCL2 e BCL6 fazem parte de algoritmos de IHQ que caracterizam o LDGCB-NCG (HANS et al., 2004; MURIS et al., 2006; CHOI et al., 2009). Entretanto, estudos com qRT-PCR sugerem que o prognóstico do LDGCB é influenciado pela interação da expressão desses genes (LOSSOS et al., 2004; MALUMBRES et al., 2008), que são co-expressos em maior ou menor quantidade, e não permitem diferenciar de forma qualitativa os subtipos de LDGCB-GC e LDGCB-NCG.

Para se tentar determinar a origem gênica de forma quantitativa por qRT-PCR idealizamos a construção de uma matriz gênica (Figura 9) que correlacionasse a expressão dos seis genes estudados (BCL2, BCL6, CCND2, FN1, LMO2 e SCYA3), pertencentes a uma das três principais assinaturas gênicas em LDGCB (CG, linfonodal ou CBA).

Primeiramente, para facilitar a comparação entre a expressão dos seis genes, os valores da expressão gênica normalizados (ANEXO A) foram transformados em escala logarítmica na base dois (ANEXO B), princípio igualmente adotado em análise por cDNA *microarray*. Em seguida, esses valores em log na base 2 foram usados para a construção da matriz (Figura 9), onde estão representadas todas as combinações gráficas possíveis entre os seis genes. Cada ponto no gráfico corresponde à interseção da expressão de dois dos seis genes de cada amostra. Por último, por análise visual, buscamos em cada quadro da matriz uma região que agrupasse casos com maior expressão de genes de uma mesma assinatura. Este agrupamento

bem definido de casos foi chamado de cluster. O valor prognóstico do cluster foi medido em seguida por análise estatística. A expressão gênica dos genes das demais assinaturas, também foi analisada no cluster.

Figura 9 – Matriz de combinação da expressão absoluta (em log na base 2) dos genes LMO2, BCL6, FN1, CCND2, BCL2 e SCYA3. Cada quadrante apresenta um eixo X e um eixo Y que correspondem aos valores da expressão gênica de um dos seis genes estudados. Os pontos azuis representam a interseção dos valores de expressão de dois genes de cada amostra.

4.7 REPRODUÇÃO DO ESCORE PREDITIVO DE MORTALIDADE

Para a reprodução do escore preditivo de mortalidade (EPM) de Lossos et al. (2004), os valores da expressão gênica dos genes BCL2, BCL6, CCND2, FN1, LMO2 e SCYA3 normatizados e transformados em escala logarítmica na base 2 (ANEXO B) foram aplicados na seguinte equação “ $EPM = (-0,0273 \times LMO2) + (-0,2103 \times BCL6) + (-0,1878 \times FN1) +$

$(0,0346 \times CCND2) + (0,1888 \times SCYA3) + (0,5527 \times BCL2)$ ”, conforme descrito por Lossos et al. (2004). Para estratificação de risco com base no EPM foram aplicadas duas estratégias. A primeira, definida por Lossos et al. (2004), na era pré-rituximabe, separava os pacientes em baixo risco se EPM inferior a 0,06; médio risco se EPM entre 0,063 e 0,093 e alto risco se EPM superior ou igual a 0,093. A outra, adotada por Malumbres et al. (2008), para pacientes tratados com associação de rituximabe, dividia os pacientes em baixo risco se EPM inferior à mediana e alto risco se EPM maior ou igual à mediana.

4.8 CONSTRUÇÃO DO NOVO ESCORE GENÉTICO DE PROGNÓSTICO

O EPM não foi aplicável a nossa casuística (ver Resultados, item 5.5.3), assim desenvolvemos um modelo preditivo de SG ao qual denominamos Novo Escore Genético de Prognóstico (NEGP). Para a construção do NEGP, inicialmente procedeu-se análise univariada entre a expressão absoluta normatizada e transformada em escala logarítmica na base 2 de cada gene (BCL2, BCL6, CCND2, FN1, SCYA3 e LMO2) e a SG, por regressão de Cox, semelhantemente ao modelo de Lossos et al. (2004) (Tabela 12).

Tabela 12 – Análise univariada por regressão de Cox entre a expressão de cada gene em log na base 2 e a sobrevida global em LDGCB

Fatores	HR	z	p> z	95% IC	p-value
BCL2	0,95	-0,14	0,88	0,48-1,86	0,88
BCL6	0,87	-0,79	0,43	0,63-1,21	0,44
CCND2	1,69	1,45	0,14	0,83-3,47	0,11
FN1	0,83	-0,92	0,35	0,57-1,21	0,36
SCYA3	0,89	-0,52	0,60	0,58-1,35	0,60
LMO2	0,66	-1,78	0,07	0,41-1,04	0,06

Em negrito valores de $z \geq \pm 1,5$. HR: razão de risco. LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B. IC: Intervalo de confiança.

Foram selecionados a partir da análise univariada de Cox os genes que apresentaram maior poder estatístico baseado no valor absoluto de z maior ou igual a 1,5 (Tabela 12). Os genes LMO2 e CCND2 foram escolhidos, sendo este último selecionado por aproximação do escore z (z de $1,45 \approx 1,5$). Estes dois genes foram então submetidos à análise multivariada de Cox (Tabela 13).

Tabela 13 – Análise multivariada por regressão de Cox entre as expressões dos genes LMO2 e CCND2 em log na base 2 e sobrevida global em LDGCB

Fatores	HR	Z	$p > z$	95% IC
CCND2	1,59	1,39	0,16	0,82 - 3,06
LMO2	0,69	-1,27	0,20	0,39 - 1,22

Em negrito valores de $z \geq \pm 1,5$. HR: razão de risco. LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B. IC: Intervalo de confiança.

O escore z da análise multivariada foi utilizado como cofator para a construção do NEGP resultando na equação: $(-1,27 \times \text{LMO2 log2}) + (+1,39 \times \text{CCND2 log2})$. O NEGP foi calculado para cada uma das amostras de nossa casuística (ANEXO C) e seus valores plotados no Gráfico 1. Os pacientes refratários primários destacados em vermelho apresentaram $\text{NEGP} \geq 2,5$. Este valor foi escolhido como ponto de corte. Definiu-se dois grupos de risco para o NEGP: baixo risco ($\text{NEGP} < 2,5$) e alto risco ($\text{NEGP} \geq 2,5$). Em seguida procedeu-se análise estatística entre o NEGP e variáveis clínicas e de desfecho.

Novo Escore Genético de Prognóstico

Gráfico 1 – Valores obtidos para o novo escore genético de prognóstico definido por $(-1,27 \times \text{LMO2}) + (+1,39 \times \text{CCND2})$. Em vermelho: Casos refratários primários. Em verde: Recidivas. Em amarelo: Óbitos durante o tratamento.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis com dados numéricos são chamadas quantitativas e são divididas em discretas (determinadas por números inteiros) e contínuas (cujos dados podem apresentar qualquer valor de variação numa escala numérica infinita). As variáveis categóricas não são quantificáveis e são medidas pela sua classificação em categorias, são variáveis qualitativas (HULLEY et al., 2008).

A análise univariada para medir a associação das variáveis categóricas com RC e RG foi realizada pelo teste de Qui-Quadrado de *Mantel-Haenszel (mhodds)*. As variáveis que se mostraram estatisticamente significantes foram submetidas à análise multivariada por regressão logística *stepwise backward selection* para definição das variáveis independentes.

Pelo método de *Kaplan-Meier* foram estimadas as curvas de SG, SLD e SLP (KAPLAN; MEIER, 1958). A SG foi definida como o intervalo entre o diagnóstico a o último seguimento ou óbito, considerando-se como evento o óbito. A SLD foi definida como o intervalo entre a data da RC e a data da recidiva, último seguimento ou óbito, considerando-se eventos recidiva precoce e recidiva tardia. A SLP foi calculada como o tempo transcorrido entre o diagnóstico e o momento da progressão, recidiva, último seguimento ou óbito, os eventos foram progressão de doença e recidiva. O teste de *log-rank* foi usado para comparar as curvas de sobrevida e para determinar a associação univariada entre características clínicas individuais e SG, SLD ou SLP (SCHOENFELD, 1981). Os fatores significantes por este teste foram submetidos à análise multivariada por regressão de Cox *stepwise backward selection* (COX, 1972).

A análise univariada de Cox foi aplicada para estimar o poder da expressão absoluta de cada gene como variável contínua em relação à sobrevida. O escore z na análise de Cox reflete a magnitude de associação de cada gene com o desfecho (sobrevida). Ele mede quanto um resultado se afasta da média em unidades de desvio padrão, tendo como base uma curva normal de distribuição (Figura 10). Um escore z positivo correlaciona-se negativamente com o desfecho, ao passo que um escore z negativo correlaciona-se positivamente com o desfecho (LOSSOS et al., 2004; ALIZADEH et al., 2011). Foram considerados significativos valores absolutos de z superiores ou iguais a 1,5 (LOSSOS et al., 2004), em um caso aceitou-se $z = 1,45$. Os genes significativos foram então submetidos a análise multivariada de Cox para a elaboração de um novo modelo genético preditivo de sobrevida na era R-CHOP.

A análise estatística foi elaborada no *software* STATA™ 9.1, utilizando-se como base o conhecimento e treinamento adquiridos na disciplina da pós-graduação da FMUSP MPR 5729 Análise de Estudos Epidemiológico 1 e a apostila do STATA disponível no site www.fsp.usp.br/hep139/Stataapostila_2011.pdf. Aceitou-se como significativo um valor de p menor ou igual a 0,05.

Figura 10 – Curva normal de distribuição com a representação do escore z. Em cada área colorida está representando o percentual da população contido nela (x100).

5 RESULTADOS

5.1 CASUÍSTICA

Inicialmente 72 pacientes foram elegíveis para o estudo. Destes, dois foram excluídos após revisão de biópsia não confirmatória para LDGCB; cinco casos por não terem recebido rituximabe; um paciente por não apresentar expressão de CD20 e outro por ser portador de imunodeficiência comum variável. Dos 63 pacientes restantes, 21 apresentaram falha na obtenção (3 casos) ou amplificação (18 casos) do RNA e foram excluídos (Tabela 14). Ao final, 42 pacientes foram avaliáveis para análise de expressão gênica absoluta e correlação com aspectos clínicos e de prognóstico (Figura 11). A Tabela 14 demonstra que as características clínico-laboratoriais dos 21 pacientes excluídos por não obtenção/amplificação de RNA não diferiram dos pacientes incluídos.

Figura 11 – Casuística

Tabela 14 – Características dos pacientes com LDGCB tratados com R-CHOP excluídos por falha no RNA

Características	N	(%)	Comparação com casuística incluída (<i>p-value</i>) ¹
Sexo			
Masculino	7	(33,3)	0,5851
Feminino	14	(66,7)	
Idade (mediana)	53,25 (22,8-73,4)	-	-
≤60 anos	13	(38,0)	0,3753
>60 anos	8	(61,9)	
Estadio Clínico			
I/II	3/5	(14,3)/(23,8)	1,0
III/IV	2/11	(09,5)/(52,3)	
Sítio extranodal			
< 2	13	(61,9)	0,4476
≥ 2	8	(38,1)	
Bulky ≥ 10cm	9	(42,8)	0,2606
Estado funcional (ECOG)			
0-1	11	(52,4)	0,1418
≥ 2	9	(42,9)	
Desconhecido	1	(04,7)	
Sintomas B			
Ausente	9	(42,9)	0,9861
Presente	11	(52,4)	
Desconhecido	1	(04,7)	
DHL sérica > 1 x normal	12	(57,1)	0,7229
Albumina sérica < 1x normal	5	(23,8)	0,1518
β2-microglobulina			
≤ 1 x normal	1	(04,7)	0,7134
> 1 x normal	13	(61,9)	
Desconhecida	7	(33,3)	
IPI			
Baixo	7	(33,3)	0,5010
Intermediário baixo	4	(19,0)	
Intermediário alto	3	(14,3)	
Alto	7	(33,3)	
IPI adaptado			
Baixo	10	(47,6)	0,7221
Alto	11	(52,4)	
RIPI			
Muito bom	3	(14,3)	0,8975
Bom	8	(38,1)	
Ruim	10	(47,6)	
Concentração média de RNA (ng/μL)	23,172	-	123,029 ²
Grau de pureza médio do RNA (relação 260/280nM)	1,597	-	1,847 ²

¹Teste de *Mantel-Haenszel*. ²Valor absoluto na casuística incluída. LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B. R-CHOP: rituximabe, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona. RNA: ácido ribonucléico. ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*. DHL: Desidrogenase láctica. IPI: Índice Internacional de Prognóstico. RIPI: Índice Internacional de Prognóstico revisado para pacientes tratados com rituximabe.

5. 2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-LABORATORIAIS

As características dos 42 pacientes de acordo com os critérios de inclusão e exclusão estão disponibilizadas na Tabela 15. Sessenta por cento eram do sexo feminino, com mediana de idade de 59,4 anos (17-84 anos). Origem extranodal ocorreu em 33,4% dos pacientes, sendo o estômago o local mais freqüente (11,9%) e em segundo lugar, sítio ósseo (9,5%) (Gráfico 2). De acordo com os critérios de Cheson de 2007, 14,3% apresentavam estadios I, 23,8% estadios II, 16,7% estadios III e 45,2% estadios IV. Apenas um paciente não apresentou captação ao PET/TC ao diagnóstico. Sintomas B foram observados em 54,8% dos pacientes, DHL elevada superior a 480U/L em 52,4% dos pacientes e albumina menor que 3,4 g/dL em 9,5% dos casos. A dosagem de β 2-microglobulina ao diagnóstico foi avaliável em 66,7% dos casos e foi elevada (acima de 1,7 μ g/ μ L) em 25 pacientes. A maioria dos pacientes (73,8%) apresentou estado funcional (ECOG) inferior a dois, 15/42 (35,7%) foram classificados em IPI de baixo risco, 9/42 (21,4%) risco intermediário baixo, 10/42 (23,8%) risco intermediário alto e 8/42 (19,1%) alto risco. Em relação ao RIPI, 11,9% foram categorizados em muito bom, 45,2% em bom e 42,9% em ruim.

A média e a mediana de tempo entre o início dos sintomas relacionados ao linfoma e o diagnóstico anatomopatológico foi de 7,42 meses e 5,25 meses, respectivamente (0,57 a 28 meses). O intervalo entre o diagnóstico anatomopatológico e a consulta médica em nosso serviço de Hematologia variou de 0,5 a 5,7 meses, média de 1,43 mês e mediana de 1,2 mês (Gráfico 3). O tempo desde o início dos sintomas até o início do tratamento (TST) variou de 2,17 a 29,4 meses, com média de 9,3 meses e mediana de 6,4 meses.

Tabela 15 – Características ao diagnóstico dos 42 pacientes com LDGCB incluídos

Características	N	(%)
Sexo		
Masculino	17	(40)
Feminino	25	(60)
Idade (mediana)	59,4 (17-84)	
≤ 60 anos	21	(50)
> 60 anos	21	(50)
Estadio Clínico		
I	6	(14,3)
II	10	(23,8)
III	7	(16,7)
IV	19	(45,2)
Sítio Extranodal		
< 2	30	(71,4)
≥ 2	12	(28,6)
<i>Bulky</i> ≥10cm	12	(28,6)
Estado Funcional (ECOG)		
0-1	31	(73,8)
≥ 2	11	(26,2)
Sintomas B		
Ausente	19	(45,2)
Presente	23	(54,8)
DHL sérica		
≤ 1 x normal	20	(47,6)
> 1 x normal	22	(52,4)
Albumina sérica		
< 1 x normal	4	(09,5)
≥ 1 x normal	36	(85,7)
Desconhecida	2	(04,8)
β2-microglobulina		
≤ 1 x normal	3	(07,2)
> 1 x normal	25	(59,5)
Desconhecida	14	(33,3)
IPI		
Baixo	15	(35,7)
Intermediário baixo	9	(21,4)
Intermediário alto	10	(23,8)
Alto	8	(19,1)
IPI adaptado		
Baixo	24	(57,1)
Alto	18	(42,9)
RIPI		
Muito bom	5	(11,9)
Bom	19	(45,2)
Ruim	18	(42,9)

LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B. ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*. DHL: Desidrogenase láctica. IPI: Índice Internacional de Prognóstico. RIPI: IPI revisado para pacientes tratados com rituximabe.

Sítios Primários

Gráfico 2– Prevalência de sítios primários

Duração das Etapas até o início do Tratamento

Gráfico 3 – Duração das etapas desde o início dos sintomas até o início do tratamento dos pacientes com LDGCB. Azul: Tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico. Vermelho: Tempo entre o diagnóstico e a primeira avaliação pela Hematologia. Verde: Tempo entre a primeira consulta na Hematologia (incluindo estadiamento e revisão diagnóstica) até o início do tratamento.

5. 3 TAXAS DE RESPOSTA

Dois (4,8%) pacientes foram a óbito durante o tratamento inicial, um deles por choque séptico e outro por tromboembolismo pulmonar. Dos outros 40 pacientes, RC e RG (RC + RP) foram obtidas em 77,5% e 90% dos casos, respectivamente (Gráfico 4). Se consideradas RC e antiga resposta completa não confirmada a taxa foi 82,5%. Progressão de doença ocorreu em 4/40 (10%) dos pacientes (Gráfico 4): dois casos detectados clinicamente durante o tratamento, um detectado no PET do final do tratamento e outro que apresentou PET falso-negativo ao final do tratamento (captação em cavum foi reportada como fisiológica), posteriormente confirmada lesão ativa com biópsia.

Gráfico 4 – Resposta baseada nos critérios de Cheson et al. (2007) ao final da quimioterapia com ou sem radioterapia de consolidação, nos 40 pacientes vivos que concluíram o tratamento. Nota: Dois pacientes com RP correspondiam à antiga resposta completa não confirmada pelo critérios de Cheson et al. (1999). RC: Resposta completa. RP: Resposta parcial.

Os quatro pacientes que apresentaram progressão de doença foram a óbito: dois por complicações relativas ao tratamento de resgate e dois por progressão de doença em cuidados paliativos. Um paciente apresentou recidiva precoce isolada em sistema nervoso central após RC, foi resgatado com esquema de segunda linha, obteve segunda RC, mas foi a óbito durante a consolidação com ATMO. Na data da última avaliação realizada em julho de 2012, 16,7% dos pacientes haviam falecido, 4,8% estavam em RP pelos critérios de Cheson 2007 (antiga resposta completa não confirmada) e os demais em RC (78,5%).

Não se observou nenhuma recidiva tardia acima de 12 meses. Dos 5/40 pacientes que atingiram RP, dois foram submetidos à ATMO e um a transplante de medula óssea alogênico e alcançaram RC.

No total foram realizadas 26 (61,9%) citorreduções e 284 ciclos (média 6,8 ciclos/paciente) de quimioterapia. Destes, 268 ciclos foram feitos com rituximabe (média 6,4 ciclos/paciente) de forma que os pacientes receberam rituximabe em 92,4% dos ciclos. A maioria dos pacientes (54,8%) foi tratada com oito ciclos e 9,5% receberam somente quatro ciclos (Gráfico 5).

Número de ciclos de quimioterapia de primeira linha por paciente

Gráfico 5 - Número de ciclos de quimioterapia por paciente com LDGCB

5. 4 CURVAS DE SOBREVIDA

5. 4. 1 Sobrevida Global

A SG foi 82,8%, com mediana de 29 meses (1,6 a 41 meses) (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Sobrevida global nos paciente com LDGCB

5. 4. 2 Sobrevida Livre de Doença

A SLD foi 97,14%, com mediana de 22,8 meses (6,1 a 33,4 meses) (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Sobrevida livre de doença nos pacientes com LDGCB

5. 4. 3 Sobrevida Livre de Progressão

A SLP foi 87,53%, com mediana de 28,3 meses (1,6 a 41 meses) (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Sobrevida livre de progressão nos pacientes com LDGCB

5. 5. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES

5. 5. 1 Expressão absoluta dos genes

O resultado da normalização dos genes está representado no ANEXO A e na Figura 12, com as respectivas curvas normais. A expressão absoluta dos genes BCL2, BCL6, CCND2, FN1, LMO2 e SCYA3 foi avaliável respectivamente em 81%, 100%, 85,7%, 88,1%, 90,5% e 95,2% dos LDGCB (ANEXO A). A mediana de expressão foi, respectivamente, 2,177; 23,200; 10,657; 15,522; 14,035 e 1243,88 (ANEXO A).

Figura12 – Expressão absoluta e curvas normais dos genes da assinatura CG (BCL6 e LMO2), CBA (CCND2, SCYA3, BCL2) e Linfonodal (FN1)

5. 5. 2 Expressão Gênica e Origem Celular em LDGCB

Os valores dos genes BCL2, BCL6, CCND2, FN1, LMO2 e SCYA3 normalizados transformados em escala logarítmica na base 2 estão reportados no ANEXO B. Cada linha corresponde a uma amostra. Observa-se que cada amostra apresenta diferentes níveis de expressões dos seis genes. Por exemplo, não é possível dizer que uma amostra não expressa determinado gene, mas sim que ela o expressa em menor quantidade. Esses valores serviram de base para a construção da matriz gênica (Figura 9).

A mediana de expressão dos genes normalizados em escala logarítmica na base 2 foi 1,121 para BCL2; 4,535 para BCL6; 3,410 para CCND2; 3,956 para FN1; 3,810 para LMO2 e 10,279 para SCYA3 (ANEXO B).

Após análise visual, um cluster bem definido foi identificado no quadrante A da matriz gênica da Figura 9. A amplificação deste quadrante está representada no Gráfico 9. Esse cluster tinha níveis significativamente elevados de expressão dos genes LMO2 ($p=0,001$) e BCL6 ($p=0,001$). Era caracterizado por amostras de pacientes com expressão gênica transformada em log na base 2 do LMO2 acima de 3 logs e do BCL6 acima de 3,5 logs, ou seja, altos níveis de expressão de genes do CG. Assim, foi denominado cluster-centro germinativo (cluster-CG). Os pacientes que não faziam parte deste cluster foram chamados de cluster-não centro germinativo (cluster-NCG). Interessantemente, nenhum paciente refratário primário (pontos vermelhos representados no Gráfico 9) foi observado no cluster-CG, compatível com o bom prognóstico historicamente atribuído à assinatura CG.

Gráfico 9 – Correlação entre a expressão dos genes LMO2 e BCL6. Corresponde à amplificação do quadrante A da Figura 9. Em vermelho: Pacientes refratários primários. Em verde: Pacientes recidivados. Em amarelo: Pacientes que foram a óbito durante o tratamento de primeira linha.

Ao contrário do esperado, os genes da assinatura CBA não apresentaram menor expressão no cluster-CG do que no cluster-NCG (Figura 13). A expressão de BCL2 e CCND2 foi semelhante entre os grupos ($p=0,455$ e $p=0,754$, respectivamente). Por outro lado, o gene SCYA3 esteve altamente expresso em ambos clusters, entretanto sua expressão foi significativamente maior no cluster-CG ($p=0,046$). Não foi observada diferença significativa entre os grupos na expressão do gene FN1 da assinatura linfonodal ($p=0,060$), embora observada tendência a maior expressão no cluster-CG (Figura 13).

Figura 13 –Expressão dos genes BCL2, CCND2, FN1 e SCYA3 nos pacientes do cluster-CG em relação aos demais pacientes (cluster-NCG). NCG: Não centro germinativo. CG: Centro germinativo.

As características clínicas e epidemiológicas dos grupos cluster-CG e cluster-NCG foram semelhantes (Tabela 16). Os grupos diferiram significativamente apenas do ponto de vista genético (elevada expressão dos genes LMO2, BCL6 e SCYA3) (Figura 13) conforme reportado anteriormente.

Tabela 16– Características dos pacientes do cluster-CG e do cluster-NCG

Características	Cluster-CG (N=24)		Cluster-NCG (N=14)		p-value ¹
Sexo					0,747
Masculino (n/%)	9	(35,5)	6	(42,9)	
Feminino (n/%)	15	(62,5)	8	(57,1)	
Idade					0,184
≤ 60 anos (n/%)	10	(41,7)	9	(64,3)	
> 60 anos (n/%)	14	(58,3)	5	(35,7)	
Estadio Clínico					0,300
I/II (n/%)	11	(45,8)	4	(28,6)	
III/IV (n/%)	13	(54,2)	10	(71,4)	
Sítio Extralinfonodal					
< 2	20	(83,3)	8	(57,4)	0,081
≥ 2	4	(16,7)	6	(42,9)	
<i>Bulky</i> ≥ 10cm (n/%)	5	(20,8)	5	(35,7)	0,321
Estado Funcional (ECOG)					
0-1 (n/%)	17	(70,8)	11	(78,6)	0,606
≥ 2 (n/%)	7	(29,2)	3	(21,4)	
Sintomas B (n/%)	12	(50,0)	7	(50,0)	1,00
DHL sérica					
≤ 1 x normal (n/%)	13	(54,2)	6	(42,9)	0,506
> 1 x normal (n/%)	11	(45,8)	8	(57,1)	
Albumina sérica					
< 1 x normal (n/%)	3	(12,5)	1	(07,1)	0,711
≥ 1 x normal (n/%)	21	(87,5)	11	(78,6)	
Desconhecida (n/%)	0	(0,0)	2	(14,3)	
β2-microglobulina					
≤ 1 x normal (n/%)	1	(04,2)	2	(14,3)	0,223
> 1 x normal (n/%)	16	(66,7)	7	(50,0)	
Desconhecida	7	(29,1)	5	(35,7)	
IPI					0,751
Baixo (n/%)	9	(37,5)	5	(35,7)	
Intermediário baixo (n/%)	6	(25,0)	2	(14,3)	
Intermediário alto (n/%)	5	(20,8)	5	(35,7)	
Alto (n/%)	4	(16,7)	2	(14,3)	
IPI adaptado					0,457
Baixo (n/%)	15	(62,5)	7	(50,0)	
Alto (n/%)	9	(37,5)	7	(50,0)	
RIPI					0,345
Muito bom (n/%)	4	(16,7)	1	(07,1)	
Bom (n/%)	11	(45,8)	6	(42,9)	
Ruim (n/%)	9	(37,5)	7	(50,0)	
RC (n/%)	20	(86,96)	9	(69,23)	0,203
RG (n/%)	23	(100,00)	9	(69,23)	0,005
SG 3 anos (n/%)	22	(91,00)	9	(64,30)	0,040
SLP 3 anos (n/%)	23	(95,50)	10	(70,10)	0,031

¹Teste de *Mantel-Haenszel*. Em negrito valores com significância estatística (p<0,05). CG: Centro germinativo. NCG: Não centro germinativo. ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*. DHL: Desidrogenase láctica. IPI: Índice Internacional de Prognóstico. RIPI: Índice Internacional de Prognóstico revisado para pacientes tratados com rituximabe. RC: Resposta completa. RG: Resposta global. SG: Sobrevida global. SLP: Sobrevida livre de progressão. n: número absoluto.

5. 5. 2. 1 Análise Univariada

A SG em 3 anos foi significativamente maior no cluster-CG ($LMO2 \geq 3$ logs e $BCL6 \geq 3,5$ logs) do que no cluster-NCG (91% *versus* 64,3%, $p=0,040$) (Figura 14A). A SLP em 3 anos (95,5% *versus* 70,1%, $p=0,031$) (Figura 14E) e a RG (100% *versus* 69,23%, $p=0,005$) (Tabela 16) também foram superiores no cluster-CG em relação ao cluster-NCG.

5. 5. 2. 2 Análise Multivariada

A análise multivariada de Cox demonstrou que pacientes pertencentes ao cluster-CG ($LMO2 \geq 3$ logs & $BCL6 \geq 3,5$ logs) apresentaram SG ($p=0,026$) e SLP ($p=0,042$) significativamente melhores do que o cluster-NCG, de forma independente do IPI ($p=0,010$ e $p=0,042$, respectivamente). A SG e a SLP no cluster-CG e no cluster-NCG em relação ao número de pontos de IPI estão representadas na Figura 14, B a D e F a H, respectivamente.

Figura 14 – Sobrevida global e sobrevida livre de progressão entre os pacientes do cluster-CG e cluster-NCG, no geral (painéis A e E) e estratificadas pelo número de fatores de risco do IPI (painéis B a D e F a H)

A análise visual da expressão do gene FN1 em relação à SG não separou grupos com prognóstico distintos (Figura 15). Nos pacientes que falharam (refratários primários e recidivas) avaliáveis a expressão de FN1 foi inferior a 4 logs (ANEXO B e Figura 16).

Figura 15 – Sobrevida global conforme expressão do FN1

Visualmente na Figura 9 os genes da assinatura NCG não separaram claramente dois grupos que pudessem ser avaliados. A expressão do gene CCND2 foi superior a 4 logs nos pacientes refratários primários e recidivados avaliáveis (ANEXO B e Figura 16). Em oposição, os genes BCL2 e SCYA3 não foram hiperexpressos nos pacientes que falharam (ANEXO B e Figura 16).

Figura 16 – Expressão dos genes BCL2, CCND2, SCYA3, BCL6, LMO2 e FN1 nos grupos que apresentaram falha de tratamento (refratários ou recidivas) em relação aos demais pacientes

5. 5. 3 Escore preditivo de mortalidade e correlação com SG e SLP

O cálculo do escore preditivo de mortalidade (EPM) foi possível em 31 pacientes (Tabela 17). Dois pacientes refratários primários não tiveram todos os genes avaliáveis para a quantificação do escore.

A maioria dos pacientes foi classificada como alto risco ($EPM \geq 0,093$) com base no ponto de corte de Lossos et al. (2004) (83,9%) e em baixo risco ($EPM < \text{mediana}$) pelo ponto de corte de Malumbres et al. (2008) (51,6%) (Tabela 17).

Todos os pacientes refratários e recidivados foram categorizados em alto risco de Lossos et al. (2004) e 66,7% em alto risco de Malumbres et al. (2008), entretanto um paciente refratário primário com alto risco pelo IPI foi classificado como baixo risco genético segundo o ponto de corte de Malumbres.

Nenhum dos dois critérios de EPM apresentou correlação estatisticamente significativa com SG ou SLP ($p=0,66$ e $p=0,35$; $p=0,46$ e $p=0,26$) (Tabela 22 e Gráfico 10). Na nossa casuística, o EPM não foi avaliável em pacientes com IPI de baixo risco/risco intermediário baixo ou RIPI muito bom/bom pelos dois critérios de corte devido à ausência de óbito, progressão de doença ou recidiva neste grupo. O EPM obtido pelos critérios de Lossos et al. (2004) e de Malumbres et al. (2008) em pacientes com IPI de risco intermediário alto, IPI de alto risco e RIPI ruim não foi efetivo ($p > 0,05$) para individualizar diferentes grupos de risco genético em relação à SG (Gráficos 11 A e B, 12 A e B, 13 A e B) e à SLP (Gráficos 11 C e D, 12 C e D, 13 C e D). O EPM não apresentou aplicação prática como preditivo de prognóstico em nossa casuística independente do ponto de corte.

Tabela 17 – Cálculo do escore preditivo de mortalidade e estratificação de risco

Amostras¹	EPM	Ponto de corte de Lossos et al. (2004)	Ponto de corte de Malumbres et al. (2008)
1*	1,703	alto risco	alto risco
3	0,313	alto risco	baixo risco
4	0,694	alto risco	baixo risco
6	1,576	alto risco	alto risco
7*	0,702	alto risco	baixo risco
8	0,477	alto risco	baixo risco
9	2,370	alto risco	alto risco
17	0,888	alto risco	alto risco
18	0,291	alto risco	baixo risco
20	1,586	alto risco	alto risco
22**	-0,174	baixo risco	baixo risco
27	1,382	alto risco	alto risco
34	-0,853	baixo risco	baixo risco
39	1,174	alto risco	alto risco
41	1,238	alto risco	alto risco
42	1,922	alto risco	alto risco
43***	1,170	alto risco	alto risco
45	0,460	alto risco	baixo risco
50	1,257	alto risco	alto risco
56	1,840	alto risco	alto risco
57	0,795	alto risco	baixo risco
58	1,541	alto risco	alto risco
59	1,052	alto risco	alto risco
62**	2,354	alto risco	alto risco
63	-0,480	baixo risco	baixo risco
65	0,096	alto risco	baixo risco
67	1,296	alto risco	alto risco
68	0,343	alto risco	baixo risco
69	-0,502	baixo risco	baixo risco
70	0,660	alto risco	baixo risco
71	-0,672	baixo risco	baixo risco
Mediana	0,888	-	-
Grupos de risco por Lossos:			
Baixo Risco (< 0,063)		5 (16,1%)	
Médio Risco 0,063 - 0,093		0,0 (0,0%)	
Alto Risco (≥ 0,093)	-	26 (83,9%)	-
Grupos de risco por Malumbres:			
Baixo Risco (< mediana)			15 (48,4%)
Alto Risco (≥ mediana)	-	-	16 (51,6%)

¹A numeração das amostras seguiu o número original atribuído para a realização desse trabalho que partiu de uma casuística de 72 amostras. EPM: Escore preditivo de mortalidade definido por $(-0,0273 \times LMO2) + (-0,2103 \times BCL6) + (-0,1878 \times FNI) + (0,0346 \times CCND2) + (0,1888 \times SCYA3) + (0,5527 \times BCL2)$. * Casos refratários primários. ** Óbito durante o tratamento. *** Recaída precoce.

Gráfico 10 – Sobrevida global e sobrevida livre de progressão em 3 anos dos pacientes com LDGCB conforme o EPM. A e C: Com base no ponto de corte de Lossos et al. (2004). Não houve pacientes no grupo de médio risco. B e D: Com base no ponto de corte de Malumbres et al. (2008). EPM: Escore preditivo de mortalidade.

Gráfico 11– Sobrevida global e sobrevida livre de progressão em 3 anos dos pacientes com LDGCB com IPI intermediário alto conforme o EPM. A e C: Com base no ponto de corte de Lossos et al. (2004). Não houve pacientes no grupo de médio risco. B e D: Com base no ponto de corte de Malumbres et al. (2008). EPM: Escore preditivo de mortalidade.

Gráfico 12 – Sobrevida global e sobrevida livre de progressão em 3 anos dos pacientes com LDGCB com IPI de alto risco conforme o EPM. A e C: Com base no ponto de corte de Lossos et al. (2004). Não houve pacientes no grupo de médio risco. B e D: Com base no ponto de corte de Malumbres et al. (2008). EPM: Escore preditivo de mortalidade.

Gráfico 13 – Sobrevida global e sobrevida livre de progressão em 3 anos dos pacientes com LDGCB com RIPI ruim conforme o EPM. A e C: Com base no ponto de corte de Lossos et al. (2004). Não houve pacientes no grupo de médio risco. B e D: Com base no ponto de corte de Malumbres et al. (2008). EPM: Escore preditivo de mortalidade.

5. 5. 4 Novo Escore Genético de Prognóstico e correlação com sobrevida global e sobrevida livre de progressão

Em decorrência dos resultados insatisfatórios associados ao EPM propusemos novo modelo genético preditivo de prognóstico aplicável à nossa casuística. A descrição detalhada da construção do Novo Escore Genético de Prognóstico (NEGP) encontra-se no item 4.8.

Os valores do NEGP obtidos para cada paciente estão representados no ANEXO C. A média e a mediana do NEGP foram, respectivamente, -0,118 e -0,062 (-6,304 a +6,061).

As características clínicas e epidemiológicas dos subgrupos de risco determinados pelo NEGP (baixo risco ou $NEGP < 2,5$ e alto risco ou $NEGP \geq 2,5$) não diferiram significativamente (Tabela 18).

Em análise univariada o NEGP estratificou de forma estatisticamente significativa subgrupos de riscos para SG ($p=0,011$) e SLP ($p=0,013$) em LDGCB (Gráficos 14A e 15A), em particular no grupo de pacientes com IPI de risco intermediário alto ($p=0,003$ e $p=0,014$) (Gráficos 14B e 15B) e no grupo de IPI adaptado de alto risco ($p=0,001$ e $p=0,001$) (Gráficos 14D e 15D).

O NEGP também foi eficaz em separar entre os pacientes com RIPI ruim, subgrupos com diferentes taxas de SG ($p=0,001$) e SLP ($p=0,0001$) (Gráficos 14E e 15E). No grupo de pacientes com IPI de risco intermediário alto e alto, o NEGP foi preditivo para SG e SLP e individualizou dois subgrupos distintos com significância estatística ($p=0,021$ e $p=0,012$) (Gráficos 14F e 15F).

O pequeno número de eventos ocorridos no grupo isolado de IPI de alto risco não permitiu análise adequada da SG ($p=0,246$) (Gráficos 14C), mas manteve importância estatística em termos de SLP ($p=0,0253$) (Gráfico 15C). A ausência de eventos nos grupos de baixo risco de IPI e RIPI não permitiu avaliar a influência do NEGP nesses grupos.

Tabela 18 – Características dos pacientes conforme novo escore genético de prognóstico

Características	NEGP <2,5 (N= 28)		NEGP ≥2,5 (N= 7)		p-value ¹
Sexo					0,865
Masculino (n/%)	11	(39,3)	3	(42,9)	
Feminino (n/%)	17	(60,7)	4	(57,1)	
Idade					0,503
≤60 anos (n/%)	12	(42,9)	4	(57,1)	
>60 anos (n/%)	16	(57,1)	3	(42,9)	
Estadio clínico					0,496
I/II (n/%)	12	(42,9)	2	(28,6)	
III/IV (n/%)	16	(57,1)	5	(71,4)	
Sítio extranodal					0,848
< 2 (n/%)	21	(75,0)	5	(71,4)	
≥ 2	7	(25,0)	2	(28,6)	
Bulky ≥ 10cm (n/%)	19	(67,9)	6	(85,7)	0,356
Estado Funcional (ECOG)					0,848
0-1 (n/%)	21	(75,0)	5	(71,4)	
≥ 2 (n/%)	7	(25,0)	2	(28,6)	
Sintomas B (n/%)	13	(46,4)	4	(57,1)	0,617
DHL sérica					0,503
≤ 1 x normal (n/%)	16	(57,1)	3	(42,9)	
> 1 x normal (n/%)	12	(42,9)	4	(57,1)	
Albumina sérica					0,127
< 1 x normal (n/%)	2	(07,1)	2	(28,6)	
≥ 1 x normal (n/%)	25	(89,3)	5	(71,4)	
Desconhecida (n/%)	1	(03,6)	0	-	
β2-microglobulina					0,546
≤ 1 x normal (n/%)	2	(07,1)	1	(20,0)	
> 1 x normal (n/%)	18	(64,3)	4	(80,0)	
Desconhecida	8	(28,6)	0	(0,0)	
IPI					0,881
Baixo (n/%)	10	(31,7)	3	(42,9)	
Intermediário baixo (n/%)	7	(25,0)	1	(14,3)	
Intermediário alto (n/%)	6	(21,4)	2	(28,6)	
Alto (n/%)	5	(17,9)	1	(14,3)	
IPI adaptado					0,865
Baixo (n/%)	17	(60,7)	4	(57,1)	
Alto (n/%)	11	(39,3)	3	(42,9)	
RIPI					0,904
Muito bom (n/%)	4	(14,3)	1	(14,3)	
Bom (n/%)	13	(46,3)	3	(42,9)	
Ruim (n/%)	11	(39,3)	3	(42,9)	
RC (n/%)	24	(88,9)	4	(66,7)	0,176
RG (n/%)	27	(100)	4	(66,7)	0,002
SG 3 anos (n/%)	26	(92,4)	4	(57,1)	0,011
SLP 3 anos (n/%)	27	(96,2)	5	(66,7)	0,013

¹Teste de *Mantel-Haenszel*. Em negrito os valores com significância estatística (p<0,05). NEGP: Novo escore genético de prognóstico. ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*. DHL: Desidrogenase láctica. IPI: Índice Internacional de Prognóstico. RIPI: Índice Internacional de Prognóstico revisado para pacientes tratados com rituximabe. RC: Resposta completa. RG: Resposta global. SG: Sobrevida global. SLP: Sobrevida livre de progressão. n: número absoluto.

Gráfico 14 - Sobrevida global segundo novo escore genético de prognóstico nos pacientes com LDGCB. A: Na população geral. B: No grupo de IPI intermediário alto. C: No grupo de IPI alto risco. D: No grupo de IPI adaptado de alto risco. E: No grupo com RIPI ruim. F: No grupo com IPIai intermediário alto ou alto risco. NEGP: Novo escore genético de prognóstico. IPI: Índice Internacional de Prognóstico. RIPI: Índice Internacional de Prognóstico revisado.

Gráfico 15 - Sobrevida livre de progressão segundo novo escore genético de prognóstico nos pacientes com LDGCB. A: Na população geral. B: No grupo de IPI intermediário alto. C: No grupo de IPI alto risco. D: No grupo de IPI adaptado de alto risco. E: No grupo com RIPI ruim. F: No grupo com IPIai intermediário alto ou alto risco. NEGP: Novo escore genético de prognóstico. IPI: Índice Internacional de Prognóstico. RIPI: Índice Internacional de Prognóstico revisado.

5.6 FATORES DE PROGNÓSTICO PARA RESPOSTA GLOBAL

5.6.1 Análise Univariada

Em análise univariada pelo teste de *Mantel-Haenszel*, as variáveis idade >60 anos ($p=0,039$), estado funcional <2 ($p=0,0008$), DHL normal ($p=0,004$), estadio clínico localizado ($p=0,018$), IPI baixo ou intermediário baixo ($p=0,005$), IPI adaptado de baixo risco ($p=0,0004$) ou RIPI muito bom ou bom ($p=0,001$) e expressão absoluta de BCL2 acima da mediana ($p=0,016$) se correlacionaram de forma estatisticamente significativa com a obtenção de RC (Tabelas 19 e 20). Pacientes idosos obtiveram maior taxa de RC que os jovens (95% *versus* 70%) e 100% dos pacientes com BCL2 acima da mediana obtiveram RC.

As variáveis ausência de sintomas B ($p=0,047$), DHL normal ($p=0,037$), número de sítio extralinfonodais <2 ($p=0,026$), IPI adaptado de baixo risco ($p=0,010$), RIPI muito bom ou bom ($p=0,024$) e expressão absoluta de BCL6 ($p=0,037$) e LMO2 ($p=0,027$) acima da mediana se correlacionaram significativamente com maiores taxas de RG.

O EPM independentemente do ponto de corte (Lossos et al. ou Malumbres et al.) não apresentou correlação com taxas de resposta, entretanto o NEGP de baixo risco foi preditivo de melhor RG ($p=0,02$) (Tabela 20).

Tabela 19 – Análise univariada dos fatores clínicos e laboratoriais para resposta completa e resposta global

Fatores	RC (%)	p-value	RG (%)	p-value ¹
Sexo		0,983		0,752
Masculino	82,4		88,2	
Feminino	82,6		91,3	
Idade > 60 anos		0,039		0,298
Não	70,0		85,0	
Sim	95,0		95,0	
β2-microglobulina		0,390		0,610
≤ 1 x normal	100,0		100,0	
> 1 x normal	79,2		91,7	
Albumina		0,391		0,093
≥ 1 x normal	85,7		94,3	
< 1 x normal	66,7		66,7	
Sintomas B		0,055		0,047
Ausente	94,7		100,0	
Presente	71,4		81,0	
Estado funcional ≥ 2 (ECOG)		0,0008		0,170
Não	93,6		93,6	
Sim	44,4		77,8	
DHL		0,004		0,037
≤ 1 x normal	100,0		100,0	
> 1 x normal	65,0		80,0	
Sítios Extralinfonodal ≥ 2		0,056		0,026
Não	89,7		96,6	
Sim	63,4		72,7	
Bulky ≥ 10cm		0,928		0,363
Não	82,1		92,9	
Sim	83,3		83,3	
Estadio clínico III/IV		0,018		0,089
Não	100,0		100,0	
Sim	70,8		83,3	
IPI		0,005		0,051
Baixo	100,0		100,0	
Intermediário baixo	100,0		100,0	
Intermediário alto	44,4		66,7	
Alto	71,4		85,7	
IPI adaptado		0,0004		0,010
Baixo	100,0		100,0	
Alto	56,3		75,0	
RIPI		0,001		0,024
Muito Bom	100,0		100,0	
Bom	100,0		100,0	
Ruim	56,3		75,0	

¹Teste de *Mantel-Haenszel*. Nota: Em negrito estão destacados fatores com significância estatística (p<0,05). RC: Resposta Completa. RG: Resposta Global. ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*. DHL: Desidrogenase láctica. IPI: Índice Internacional de Prognóstico. RIPI: Índice Internacional de Prognóstico revisado para pacientes tratados com rituximabe.

Tabela 20 – Análise univariada dos fatores genéticos para resposta completa e resposta global

Fatores	RC (%)	<i>p-value</i>	RG (%)	<i>p-value</i> ³
BCL2 > média ¹		0,166		0,406
Não	79,0		91,7	
Sim	100,0		100,0	
BCL2 > mediana ¹		0,016		0,150
Não	68,8		87,5	
Sim	100,0		100,0	
BCL6 > média ¹		0,502		0,089
Não	79,2		83,3	
Sim	87,5		100,0	
BCL6 > mediana ¹		0,681		0,037
Não	80,0		80,0	
Sim	85,0		100,0	
CCND2 > média ¹		0,814		0,051
Não	86,4		100,0	
Sim	83,3		83,0	
CCND2 > mediana ¹		0,633		0,151
Não	82,4		100,0	
Sim	88,2		88,2	
FN1 > média ¹		0,324		0,197
Não	78,3		87,0	
Sim	91,7		100,0	
FN1 > mediana ¹		0,939		0,082
Não	83,3		83,3	
Sim	82,3		100,0	
SCYA3 > média ¹		0,350		0,183
Não	77,8		85,2	
Sim	90,9		100,0	
SCYA3 > mediana ¹		0,679		0,296
Não	79,0		84,2	
Sim	84,2		94,7	
LMO2 > média ¹		0,683		0,115
Não	82,6		82,6	
Sim	76,9		100,0	
LMO2 > mediana ¹		0,563		0,027
Não	76,5		76,5	
Sim	84,2		100,0	
EPM ²		0,066		0,564
Baixo Risco (<0,063)	50,0		100,0	
Médio Risco (0,063-0,093)	NA		NA	
Alto Risco (≥0,093)	88,0		92,0	
EPM ²		0,419		0,508
Baixo Risco (< mediana)	73,3		93,3	
Alto Risco (> mediana)	85,7		85,7	
NEGP ²		0,176		0,002
Baixo risco (< 2,5)	88,9		100,0	
Alto risco (≥ 2,5)	66,7		66,7	

¹O valor da expressão gênica foi medido em número absoluto de cópias normatizadas. ²Expressão gênica normatizada transformada em escala logarítmica na base de 2. ³Teste de *Mantel-Haenszel*. RC: Resposta Completa. RG: Resposta Global. EPM: Escore preditivo de mortalidade. NEGP: Nove escore genético de prognóstico. Nota: Em negrito estão destacados fatores com significância estatística ($p < 0,05$). NA: Não avaliável.

5. 6. 2 Análise Multivariada

Os fatores estatisticamente significantes na análise univariada foram submetidos à análise multivariada por regressão logística *stepwise backward selection*.

A inclusão da variável BCL2 acima da mediana no modelo multivariado ficou comprometida pela limitação da amostra. Nenhum paciente com valor de BCL2 acima da mediana foi refratário. O mesmo foi observado para as variáveis DHL, estadio clínico, IPI/IPI adaptado e RIPI, as quais não puderam ser usadas por estimabilidade. Procedeu-se assim análise multivariada das duas variáveis restantes estado funcional pelo ECOG ($p=0,003$) e idade ($p=0,3586$), e apenas o estado funcional pelo ECOG foi independente para RC.

Da mesma forma, no modelo multivariado para RG, as variáveis sintomas B, DHL, IPI adaptado, RIPI, BCL6 acima da mediana, LMO2 acima da mediana e o NEGP também não puderam ser incluídas por estimabilidade. Restou apenas a variável número de sítios extralinfonodais, comprometendo assim a construção do modelo multivariado.

A ampliação da amostra pode viabilizar o aprofundamento da análise multivariada para RC e RG.

5.7 FATORES DE PROGNÓSTICO PARA SOBREVIDA GLOBAL

5.7.1 Análise univariada

Em análise univariada, hipoalbuminemia ($p=0,018$), sintomas B ($p=0,010$), estado funcional ≥ 2 ($p=0,037$), DHL aumentada ($p=0,007$), estadio clínico III/IV ($p=0,030$), IPI intermediário alto e alto ($p=0,004$), IPI adaptado de alto risco ($p=0,0008$), RIPI ruim ($p=0,003$), ausência de RC ($p<0,0001$), CCND2>média ($p=0,035$), LMO2<média ($p=0,038$), LMO2<mediana ($p=0,003$) e o NEGP de alto risco ($p=0,011$) estiveram associados com pior SG (Tabela 21 e 22).

O EPM, independentemente de ter sido estratificado pela referência de Lossos et al. (2004) ou de Malumbres et al. (2008), não apresentou correlação significativa com SG. Entretanto os valores do NEGP, categorizados como baixo risco ou inferior a 2,5 *versus* alto risco ou superior ou igual a 2,5, foram associados de forma estatisticamente significativa com a SG (92,4% *versus* 57,1%, $p=0,011$) (Tabela 22).

Tabela 21 – Análise univariada dos fatores clínicos e laboratoriais em relação à sobrevida global e sobrevida livre de progressão

Fatores	Taxa (%)	SG 3 anos		SLP 3 anos	
		Taxa (%)	<i>p-value</i> ²	Taxa (%)	<i>p-value</i> ²
Todos os pacientes	100,0	82,8	-	87,5	-
Sexo			0,512		0,971
Masculino	40,5	87,5		88,2	
Feminino	59,5	79,6		87,1	
Idade >60 anos			0,729		0,663
Não	50	81,0		85,5	
Sim	50	84,2		89,7	
TST >3 meses			0,688		0,439
Não	10,8	75,0		100,0	
Sim	89,2	81,5		84,4	
TST >6 meses			0,133		0,049
Não	40,5	93,3		100,0	
Sim	59,5	72,1		76,2	
TST >12 meses			0,614		0,936
Não	78,4	78,8		85,4	
Sim	21,6	87,5		87,5	
β2-microglobulina			0,460		0,528
< 1 x normal	10,7	100,0		100,0	
≥ 1 x normal	89,3	83,4		87,3	
Albumina			0,018		0,147
≥ 1 x normal	90,0	88,4		91,3	
< 1 x normal	10,0	50,0		66,7	
Sintomas B			0,010		0,028
Não	45,2	100,0		100,0	
Sim	54,8	68,6		76,8	
Estado funcional ≥ 2 (ECOG)			0,037		0,402
Não	73,8	89,6		90,2	
Sim	26,2	63,6		78,8	
DHL			0,007		0,021
≤ 1 x normal	47,6	100,0		100,0	
> 1 x normal	52,4	67,5		75,6	
Sítios extranodais ≥2			0,052		0,076
Não	71,4	89,6		92,9	
Sim	28,6	66,7		75,0	
Bulky ≥ 10cm			0,925		0,560
Não	71,4	83,2		89,5	
Sim	28,6	81,8		82,5	
Estadio clínico III/IV			0,030		0,062
Não	38,1	100,0		100,0	
Sim	61,9	72,7		79,6	
IPI			0,004		0,005
Baixo	35,7	100,0		100,0	
Intermediário baixo	21,4	100,0		100,0	
Intermediário alto	23,8	50,0		55,6	
Alto	19,1	75,0		87,5	(continua)

Fatores (conclusão)	Taxa (%)	SG 3 anos		SLP 3 anos	
		Taxa (%)	<i>p-value</i> ¹	Taxa (%)	<i>p-value</i> ¹
IPI adaptado			0,0008		0,004
Baixo	57,1	100,0		100,0	
Alto	42,9	60,0		69,7	
RIPI			0,003		0,016
Muito bom	11,9	100,0		100,0	
Bom	45,2	100,0		100,0	
Ruim	42,9	60,0		69,7	
Resposta					
RC	82,5	96,6	<0,0001	96,9	< 0,0001
RP	7,5	100,0	0,501	100,0	0,5097

Nota: Em negrito estão destacados os fatores com significância estatística ($p < 0,05$). ¹Teste de *log-rank*. SG: Sobrevida global. SLP: Sobrevida livre de progressão. TST: Tempo entre o início dos sintomas e o início do tratamento. ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*. RC: Resposta Completa. RP: Resposta parcial. DHL: Desidrogenase láctica. IPI: Índice Internacional de Prognóstico. RIPI: Índice Internacional de Prognóstico revisado para pacientes tratados com rituximabe.

Tabela 22 – Análise univariada dos fatores genéticos em relação à sobrevida global e sobrevida livre de progressão

Fatores	Taxa (%)	SG 3 anos		SLP 3 anos	
		Taxa (%)	<i>p-value</i> ¹	Taxa (%)	<i>p-value</i> ¹
BCL2 > média ²			0,793		0,309
Não	73,5	84,0		87,6	
Sim	26,5	88,9		100,0	
BCL2 > mediana ²			0,620		0,534
Não	50,0	83,5		88,2	
Sim	50,0	88,2		93,8	
BCL6 > média ²			0,471		0,329
Não	59,5	81,6		83,6	
Sim	40,5	87,4		93,8	
BCL6 > mediana ²			0,201		0,151
Não	50,0	79,3		80,4	
Sim	50,0	87,4		95,0	
CCND2 > média ²			0,035		0,013
Não	63,9	95,7		100,0	
Sim	36,1	69,2		75,0	
CCND2 > mediana ²			0,174		0,071
Não	50,0	94,4		100,0	
Sim	50,0	77,4		83,4	
FN1 > média ²			0,372		0,135
Não	64,9	78,9		82,6	
Sim	35,1	92,3		100,0	
FN1 > mediana ²			0,112		0,042
Não	51,4	73,3		77,8	
Sim	48,6	94,4		100,0	
SCYA3 > média ²			0,999		0,666
Não	70,0	82,1		85,6	
Sim	30,0	81,5		90,0	
SCYA3 > mediana ²			0,737		0,681
Não	50,0	80,0		84,7	
Sim	50,0	83,7		89,2	
LMO2 > média ²			0,038		0,078
Não	65,8	70,8		78,3	
Sim	34,2	100,0		100,0	
LMO2 > mediana ²			0,003		0,011
Não	50,0	61,5		70,5	
Sim	50,0	100,0		100,0	
EPM ³			0,665		0,463
Baixo Risco (< 0,06)	16,1	80,0		100,0	
Médio Risco (0,06-0,09)	0,0	NA		NA	
Alto Risco (≥ 0,09)	83,9	84,3		88,0	
EMP ³			0,353		0,268
Baixo Risco (< mediana)	51,6	87,1		93,8	
Alto Risco (> mediana)	48,4	72,0		78,6	
NEGP ³			0,011		0,013
Baixo risco (< 2,5)	80,0	92,4		96,2	
Alto risco (≥ 2,5)	20,0	57,1		66,7	

Nota: Em negrito estão destacados os fatores com significância estatística ($p < 0,05$). ¹Teste de *log-rank*.

²Expressão gênica em número absoluto de cópias normalizadas. ³Expressão gênica normalizada transformada em escala logarítmica na base de 2. SG: Sobrevida global. SLP: Sobrevida livre de progressão. EPM: Escore preditivo de mortalidade. NEGP: Novo escore genético de prognóstico. NA: Não avaliável.

A análise univariada dos valores da expressão normatizada transformada em escala logarítmica na base 2 dos genes individualmente como variável contínua em relação à SG não evidenciou nenhum gene com impacto prognóstico independente ($p>0,05$) (Tabela 23). Em nossa casuística, o padrão de polaridade z negativo, associado a melhor SG, foi encontrado para os genes BCL2, BCL6, FN1 e SCYA3, enquanto o gene CCND2 apresentou sinal positivo, relacionado a pior desfecho. Somente o LMO2 apresentou valor absoluto maior ou igual a 1,5. O gene CCND2 apresentou valor absoluto de z muito próximo a 1,5. A comparação com os resultados de Malumbres et al. (2008), encontra-se na Tabela 23.

Tabela 23 – Análise univariada da expressão gênica individual como variável contínua em relação à sobrevida global e sobrevida livre de progressão comparativamente aos resultados de Malumbres et al. (2008)

Genes	Sobrevida Global				Sobrevida Livre de Progressão			
	Estudo atual		Malumbres et al. (2008)		Estudo atual		Malumbres et al. (2008)	
	z	p	z	p	z	p	z	p
BCL2	-0,14	0,88	2,27	0,02	-0,24	0,80	2,10	0,03
BCL6	-0,79	0,44	-2,58	0,01	-1,06	0,29	-2,15	0,03
CCND2	1,45	0,11	2,14	0,03	1,58	0,06	1,90	>0,05
FN1	-0,92	0,36	-1,03	>0,05	-1,52	0,12	-1,36	>0,05
SCYA3	-0,52	0,60	-0,71	>0,05	-1,26	0,20	-1,85	>0,05
LMO2	-1,78	0,06	-3,7	<0,001	-1,60	0,09	-3,98	<0,001

Em negrito estão destacados com valores com significância estatística ($p<0,05$).

5. 7. 2 Análise Multivariada

Em análise multivariada utilizando a expressão absoluta normatizada dos genes BCL2, BCL6, CCND2, FN1, SCYA3 e LMO2 em log na base 2, nenhum deles foi preditivo de SG de forma independente (Tabela 24).

Tabela 24 – Análise multivariada de Cox do modelo de seis genes em relação à sobrevida global

Fatores	HR	z	p>/z/	95% IC
BCL2	0,91	-0,21	0,83	0,39-2,09
BCL6	0,69	-0,52	0,60	0,17-2,71
CCND2	1,40	0,72	0,46	0,56-3,48
FN1	0,98	-0,04	0,97	0,43-2,23
SCYA3	1,52	1,00	0,31	0,66-3,47
LMO2	0,72	-0,70	0,48	0,29-1,77

O *p-value* do modelo foi 0,548. HR: razão de risco. IC: Intervalo de confiança.

Tomadas as variáveis com significância na análise univariada, as variáveis sintomas B, DHL, estadió clínico foram removidas do modelo por estimabilidade. Restaram no modelo hipoalbuminemia e estado funcional pelo ECOG $\geq$ 2 que foram submetidas à análise multivariada de Cox. Ambos foram fatores de prognóstico independentes de resposta ($p=0,045$ e $p=0,038$). A substituição do estado funcional $\geq$ 2 pela variável IPI demonstrou que hipoalbuminemia e IPI foram variáveis independentes ($p=0,026$ e $p=0,023$). O que não se manteve para o IPI adaptado ($p=1$) ou para o RIPI ($p=1$). Quando realizada análise multivariada entre as variáveis clínicas significantes (estado funcional pelo ECOG $\geq$ 2 e hipoalbuminemia) com as variáveis genéticas CCND2>média e LMO2>mediana, o único fator significativo para SG foi hipoalbuminemia ($p=0,044$). O mesmo se manteve quando da substituição do estado funcional pelo IPI.

Por outro lado, a análise multivariada das variáveis clínicas significantes (hipoalbuminemia e estado funcional $\geq$ 2) com a variável genética NEGP mostrou que estado funcional $\geq$ 2 e NEGP foram variáveis independentes de prognóstico para SG ($p=0,02$ e $p=0,048$) (Tabela 25). Da mesma forma, a substituição do estado funcional $\geq$ 2 pelo IPI, demonstrou que ambos, IPI e NEGP, permaneceram como variáveis independentes preditivas de SG ($p=0,018$ e $p=0,017$) (Tabela 25). Excluído do modelo a variável hipoalbuminemia, a análise multivariada de Cox entre NEGP e IPI, demonstrou que ambas são variáveis

independentes para SG, seja utilizando-se o NEGP como variável categórica (ponto de corte em 2,5) ou como variável contínua (Tabela 26).

Tabela 25 – Análise multivariada de Cox em relação à sobrevida global

Variáveis	<i>p-value</i>
Hipoalbuminemia	0,616
NEGP	0,020
Estado funcional pelo ECOG $\geq$ 2	0,048
Hipoalbuminemia	0,921
NEGP	0,017
IPI	0,018

Em negrito destacam-se as variáveis significantes ($p < 0,05$). NEGP: Novo escore genético de prognóstico. ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*. IPI: Índice Internacional de Prognóstico.

Tabela 26 – Análise multivariada de Cox entre NEGP e IPI ou IPI adaptado para sobrevida global e sobrevida livre de progressão em LDGB tratados com R-CHOP

Variável	SG		SLP	
	<i>z</i>	<i>p</i>	<i>z</i>	<i>p</i>
IPI <i>versus</i>	2,38	0,017	1,94	0,053
NEGP categórico	2,41	0,016	2,22	0,027
IPI adaptado	0,0	1,0	0,0	1,0
NEGP categórico	2,02	0,043	1,99	0,046
IPI <i>versus</i>	2,47	0,014	2,00	0,045
NEGP contínuo	2,27	0,023	2,09	0,037
IPI adaptado <i>versus</i>	0,0	1,00	0,00	1,00
NEGP contínuo	2,39	0,017	1,98	0,048

Em negrito os valores com significância estatística ($p < 0,05$). LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B. R-CHOP: rituximabe, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona. SG: Sobrevida global. SLP: Sobrevida livre de progressão. IPI: Índice Internacional de Prognóstico. NEGP: Novo escore genético de prognóstico.

Em resumo, em análise multivariada o NEGP se manteve como variável preditiva para SG independente do IPI, tanto como variável contínua, quanto como variável categórica (Tabela 26).

5. 8. FATORES DE PROGNÓSTICO PARA SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA

Uma vez que ocorreu apenas uma recidiva nos pacientes que obtiveram RC, esta análise ficou prejudicada.

5. 9 FATORES DE PROGNÓSTICO PARA SOBREVIDA LIVRE DE PROGRESSÃO

5. 9. 1 Análise univariada

A análise univariada demonstrou que as variáveis TST > 6 meses ($p=0,049$), sintomas B ($p=0,028$), DHL alterado ($p=0,021$), IPI intermediário alto ou alto ($p=0,005$), IPI adaptado de alto risco ($p=0,004$), RIPI ruim ($p=0,016$), ausência de RC ($p<0,0001$), CCND2 > média ($p=0,013$), FN1 < mediana ($p=0,042$), LMO2 < mediana ($p=0,011$) e o NEGP de alto risco ($p=0,013$) associaram-se significativamente com pior SLP (Tabelas 21 e 22).

A análise univariada da expressão gênica individual (normatizada e transformada em log na base 2) como variável contínua em relação à SLP não demonstrou nenhum gene como variável independente ($p>0,05$) (Tabela 23). O padrão de polaridade de z negativo, associado a melhor SG, foi observado em todos os genes, à exceção do gene CCND2 que apresentou sinal positivo, e esteve portanto relacionado à pior evolução. O escore z absoluto foi maior ou igual a 1,5 para os genes CCND2, FN1 e LMO2 em relação à SLP. Na Tabela 23 também está representada a comparação dos nossos dados com os resultados obtidos por Malumbres et al., (2008).

5. 9. 2 Análise multivariada

Na análise multivariada para SLP nenhum dos genes avaliados apresentou impacto prognóstico independente ($p>0,05$) (Tabela 27). Porém o NEGP, que reflete a interação entre os genes LMO2 e CCND2, foi significativa e independente do IPI para SLP, seja como variável contínua ou como variável categórica (Tabela 26).

Tabela 27 – Análise multivariada de Cox do modelo dos seis genes estudados para sobrevida livre de progressão como variável dependente em LDGCB tratado com R-CHOP

Fatores	HR	z	p> z 	95% IC
BCL2	1,54	0,42	0,67	0,20-11,71
BCL6	1,09	0,09	0,93	0,13-8,65
CCND2	2,11	1,01	0,313	0,49-9,05
FN1	0,27	-1,08	0,27	0,02-0,83
SCYA3	1,40	0,53	0,59	0,39-5,27
LMO2	1,01	0,02	0,98	0,38-2,62

LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B. R-CHOP: rituximabe, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona. HR: razão de risco. IC: Intervalo de confiança.

6 DISCUSSÃO

Embora a SG dos portadores de LDGCB tenha obtido um ganho de 20% com a adição do rituximabe ao CHOP (SEHN et al. 2005; COIFFIER et al., 2010), para pacientes com IPI de mais baixo risco, 8,6% a 19,1% permanecem com evolução desfavorável e 13% a 25,3% irão recidivar (SEHN et al. 2007; ZIEPERT et al., 2010). Os fatores de prognóstico clínico-laboratorial ainda possuem zonas cegas e não conseguem identificar subgrupos de muito pior prognóstico. Cerca de 60% dos pacientes com IPI de alto risco estarão vivos e 51% estarão livres de progressão em quatro anos (SEHN et al. 2007; ZIEPERT et al., 2010). Demonstrando que também dentro do grupo de maior risco devam existir subgrupos com distintos prognósticos. Essas diferenças parecem ser determinadas por fatores genéticos definidores da biologia tumoral e foram o escopo desse trabalho.

A investigação do perfil de expressão gênica por cDNA *microarray* implica em alta complexidade técnica, custos, tempo e raramente encontra-se disponível na prática clínica, além de necessitar de amostras à fresco ou congeladas. Por outro lado, apesar de amplamente disponível, a técnica de IHQ apresenta resultados conflitantes, carece de padronização internacional e está sujeita às variações entre observadores (MALUMBRES et al., 2008). Por isso, implantamos com esse trabalho a técnica de medição absoluta de expressão gênica em LDGCB por qRT-PCR em amostras fixadas em formol e incluídas em parafina. A validação desta técnica para este tipo de amostra proporciona vantagem ímpar devido à dificuldade de obtenção de amostras à fresco. O qRT-PCR ainda reúne como vantagens maior rapidez e menor custo que o *microarray* e maior padronização e reprodutibilidade que a IHQ.

Dos 72 pacientes inicialmente selecionados, 9 foram excluídos por não preencheram critérios clínicos ou anatomopatológicos de inclusão no trabalho (Figura 11). Dos 63 pacientes restantes, a análise de expressão gênica absoluta por qRT-PCR foi avaliável em 42

casos. A casuística final (N=42) foi semelhante à utilizada no trabalho pioneiro de Alizadeh et al. (2000) (N=40) que identificou por cDNA *microarray* as duas principais assinaturas gênicas do LDGCB, os tipos centro germinativo (N=19) e células B ativadas (N=21). Além disso, os 21 pacientes excluídos por não obtenção ou amplificação de RNA não diferiram em aspectos clínicos e epidemiológicos dos 42 pacientes incluídos, tornando improvável viés de seleção neste trabalho (Tabela 14).

A concentração média de RNA dos 18 casos com falha de amplificação foi muito inferior à obtida nos 42 casos com adequada amplificação (23,172ng/μL *versus* 123,029ng/μL). Igualmente foi observado menor grau de pureza médio do RNA (relação 260/280nM) nos casos que falharam (1,597 *versus* 1,847). Concentrações de RNA acima de 50ng/μL com grau de pureza entre 1,7 e 1,9 geralmente são adequadas para a amplificação pela técnica de qRT-PCR (GOUVEIA et al., 2011b).

Muitos fatores podem influenciar a qualidade do RNA extraído de amostras fixadas em formol e incluídas em parafina, podendo justificar falhas no isolamento ou amplificação do RNA. Após a realização da biópsia, o tecido deve ser fixado o mais breve possível para prevenir a degradação do RNA induzida por autólise (GRUBER et al., 1994; SRINIVASAN, SEDMAK, JEWELL, 2002; ABRAHAMSEN et al. 2003; VON SMOLINSKI et al., 2005; SCORSATO, TELLES, 2011), a duração do processo de fixação não deve exceder 48 horas uma vez que um intervalo mais prolongado pode resultar na redução do número de moléculas de RNA detectáveis (GRUBER et al., 1994; MACABEO-ONG et al. 2002; ABRAHAMSEN et al. 2003; VON SMOLINSKI et al., 2005; SCORSATO, TELLES, 2011), a degradação ácida do RNA pode ser reduzida pelo uso formalina neutra tamponada (IMPRAIM et al. 1987; BEN-EZRA et al. 1991; GRUBER et al., 1994; SRINIVASAN, SEDMAK, JEWELL, 2002; ABRAHAMSEN et al. 2003; VON SMOLINSKI et al., 2005) e fragmentos de ácido nucléico amplificados por qRT-PCR entre 80 e 120 pares de bases de extensão geralmente

dão os melhores resultados (BEN-EZRA et al. 1991; KOOPMANS et al. 1993 ; SPECHT et al., 2001; ABRAHAMSEN et al. 2003). Na Divisão de Anatomia Patológica do HC/ICESP-FMUSP a introdução da formalina neutra tamponada ocorreu a partir de maio de 2010, assim nenhuma das amostras avaliadas neste trabalho foi fixada em formol tamponado, podendo ser este o principal fator implicado nas falhas de amplificação do RNA. As amostras que falharam eram ainda em média 5 meses mais antigas do que as que amplificaram.

O trabalho de Malumbres et al. (2008) não faz referência às características do processo de fixação e parafinização utilizado. Entretanto reporta uma eficácia de 100% (132 amostras) na extração e amplificação de RNA de alta qualidade, baseado em modificações do tampão de lise com docetil sulfato de sódio, otimização da temperatura de digestão e aplicação de grandes quantidades de proteinase K para completa recuperação do material genético (CHEN, BYRNE, LOSSOS, 2007). Em nosso laboratório, a reprodução dessa metodologia não foi efetiva.

Por outro lado, nosso grupo havia comparado previamente três metodologias de extração de RNA a partir de amostras fixadas em formol e incluídas em parafina e demonstrou que os *kits RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation* (Ambion, Inc, Austin, Texas, EUA) e *Paradise® Whole Transcript RT Reagent System* (Arcturus Bioscience, Inc, Mountain View, Califórnia, EUA) foram eficientes para obtenção de RNA suficiente e de qualidade adequada para estudos de expressão gênica (GOUVEIA et al., 2011b).

No trabalho atual, o *kit RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation* (Ambion, Inc, Austin, Texas, EUA) levou a resultados adequados por qRT-PCR em dois terços das amostras estudadas. Conforme mencionado anteriormente, as perdas ocorridas podem ser consequência principalmente da não utilização de formol tamponado pelo nosso serviço antes de maio de 2010. Diversos passos no protocolo de extração de RNA visam melhorar a qualidade do RNA extraído. A retirada incompleta da parafina pode resultar em RNA de qualidade inferior,

ressaltando a importância da etapa de desparafinização com xilol; o uso de tampão de digestão, proteinase e aquecimento (não exceder 80°C) objetiva reverter os cruzamentos entre proteínas e RNA provocado pela formalina que prejudicam a extração do RNA; além disso a manutenção do pH do tampão entre 3 e 6,5 aumenta a eficiência da amplificação (GOUVEIA et al., 2011b).

A inclusão de pelo menos um gene de referência, no nosso caso o ABL, é importante para controle de variações devido à degradação do RNA, diferenças de quantidade de RNA total analisado e variabilidade de eficiência da qRT-PCR (GRUBER et al., 1994; VANDESOMPELE et al., 2002; VON SMOLINSKI et al., 2005).

Diferentemente da literatura (0,8 mulher: 1 homem) (THE INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2008), observou-se em nossa casuística discreto predomínio do sexo feminino (1 mulher : 0,7 homem). Uma vez que a casuística excluída também tinha predomínio de mulheres torna-se improvável que esse fato se deva à limitação da amostra. Fato semelhante ocorreu no estudo LNH-98.5 do grupo GELA onde 54% da casuística eram mulheres (COIFFIER et al., 2002). Pode-se encontrar uma possível explicação nas características demográficas da população brasileira.

No geral existem 3.941.819 de mulheres a mais do que homens no Brasil, esse valor chega a 5.505.446 nas áreas urbanas (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2012). O Censo brasileiro de 2010 também concluiu que o nível de instrução das mulheres continuou mais elevado que o dos homens. Dessa forma, a educação pode determinar melhor entendimento do processo saúde-doença e mais eficaz identificação de sinais e sintomas, resultando em autocuidado e maior procura por auxílio médico.

Outra possível explicação seria o fato de que, apesar da maior escolaridade das mulheres, o nível de ocupação formal e rendimento masculino continuam superiores aos femininos, determinando maior acesso masculino aos serviços de saúde privados e planos de

saúde, o que resultaria num aumento relativo de mulheres usuárias do Sistema Único de Saúde (SUS) e numa prevalência falsamente elevada de patologias nesse grupo populacional do ponto de vista da saúde pública.

Por outro lado, a mediana de idade da casuística (59,4 anos) foi próxima à da literatura (64 anos) (ARMITAGE; WEISENBURGER, 1998), assim como a prevalência de sítios primários extranodais (33,4% *versus* até 40%) (THE INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2008).

A maior prevalência ao diagnóstico dos estádios clínicos avançados (61,9%) em relação à literatura (cerca de 50%) pode ser consequência da demora em se conseguir acesso ao tratamento no SUS. Conforme demonstrado no Gráfico 3 os pacientes levaram em média 8,85 meses para ter acesso ao hematologista, em alguns casos esse intervalo foi superior a 28 meses. A lentidão na triagem e diagnóstico no tocante a uma doença agressiva como o LDGCB, explicam não somente o maior número de pacientes com estadió clínico avançado, como também a maior prevalência de sintomas B, podendo implicar ainda em pior resposta ao tratamento. Em análise univariada encontramos correlação significativa entre o intervalo para início do tratamento superior a 6 meses e pior SLP (76,2% *versus* 100%, $p=0,049$).

No Brasil não existem estudos em LNH determinando o impacto da demora do diagnóstico e do tratamento na sobrevida. No Reino Unido, o *Review of Cancer Waiting Times Standards* (2011) determina que um paciente com suspeita de câncer deva ser referido como urgente e avaliado pelo especialista em no máximo duas semanas; tenha o diagnóstico feito em no máximo um mês e que o tempo entre ser referido e ter o tratamento iniciado seja no máximo dois meses. No Brasil, em 22 de novembro de 2012 foi sancionada a lei 12.732 que estabelece o prazo máximo de sessenta dias, contados a partir do diagnóstico, para início do tratamento de pacientes com câncer pelo SUS (BRASIL [...], 2012). A lei entrará em vigor

após 180 dias, aproximando o prazo para o tratamento de câncer no Brasil ao de países mais desenvolvidos.

Dentro do serviço de Hematologia do HC/ICESP-FMUSP, em média, em menos de 20 dias os pacientes foram estadiados, tiveram suas biópsias realizadas ou revisadas e o tratamento iniciado. Esse bom desempenho é resultado do trabalho conjunto e integrado das áreas da Hematologia, Patologia, Cirurgia e Radiologia do nosso serviço. A partir de fevereiro de 2009, o serviço de Onco-hematologia foi iniciado no ICESP, hospital da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo e da FMUSP que se tornou modelo para o tratamento do câncer no país e foi eleito em 2011 o melhor hospital público de São Paulo com base na avaliação dos usuários. O ICESP conta com instalações modernas, equipamentos novos, qualidade e rapidez no atendimento e um excelente suporte de terapia intensiva. A maioria dos pacientes da casuística terminou, ou iniciou e terminou o tratamento no ICESP, e sem dúvida, além do preparo, dedicação e empenho da equipe da Hematologia, os recursos disponíveis contribuíram para as excelentes curvas de SG (82,8%) e SLP (87,53%) descritas nesse trabalho (Gráficos 6 e 8).

Considerando-se o exposto anteriormente, uma importante medida para se obter taxas de sobrevida ainda melhores no serviço seria a redução no tempo que os pacientes com LDGCB levam para chegar ao hematologista, o que poderá se concretizar com o cumprimento da lei 12.732 (BRASIL [...], 2012), o que entretanto somente será possível se houver investimento e desenvolvimento dos demais hospitais e centros encaminhadores da rede do SUS.

As taxas de IPI baixo (35,7% *versus* 35%), intermediário baixo (21,4% *versus* 27%), intermediário alto (23,8% *versus* 22%) e alto (19,1% *versus* 16%) não diferiram significativamente entre nossa casuística e os dados da literatura (PROJECT TIN-HSLPF, 1993), respectivamente. Igualmente foram semelhantes os percentuais de pacientes com RIPI

muito bom (11,9% *versus* 10%), bom (45,2% *versus* 45%) e ruim (42,9% *versus* 45%) em relação aos achados de Sehn et al. (2007). Dessa forma, nossa casuística espelha a distribuição da estratificação de risco clínica encontrada na literatura.

Comparativamente a estudo prévio realizado em nosso serviço (HALLACK NETO et al., 2005) na era pré-rituximabe houve aumento da taxa de RC (incluindo resposta completa não confirmada) de 73% para 82,5%. Quando estratificada pela idade, a taxa de RC variou de 70% nos pacientes jovens a 95% nos pacientes idosos (ANEXO D). A RC no grupo jovem no geral foi inferior à do estudo MInT (86%) (PFREUNDSCHUH et al., 2006), entretanto cabe lembrar que nesse estudo somente foram incluídos pacientes com IPIai 0-1, enquanto que na nossa casuística apenas 38,1% dos pacientes jovens tinham IPIai 0-1. Entre estes, a RC foi 100% (ANEXO D). A RC em idosos na nossa casuística (95%) foi muito superior às obtidas nos estudos LNH-98.5 (76%) (COIFFIER et al., 2002) e no estudo RICOVER-60 (78%) (PFREUNDSCHUH et al., 2008a). O percentual de pacientes com IPI intermediário alto e alto não diferiu significativamente entre nossa casuística e o estudo RICOVER-60 (38% *versus* 40%, respectivamente), entretanto no estudo LNH-98.5 esse percentual chegou a 54% podendo ter contribuído para resultados inferiores.

A casuística atual apresentou SG de 82,8% com mediana de seguimento de 29 meses. A SG reportada em nosso serviço com o tratamento CHOP era 71% com mediana de 88 meses (HALLACK NETO et al., 2005). A superposição das curvas de SG do nosso serviço aos 3,4 anos mostra vantagem para os pacientes tratados com R-CHOP (Figura 17).

Figura 17 – Sobrevida global no nosso serviço na era pré-rituximabe (HC-FMUSP) e na era pós-rituximabe (HC/ICESP-FMUSP). Modificada de Hallack Neto et al. (2005), acrescentada curva de sobrevivida global da tese atual.

Comparativamente ao MInT (PFREUNDSCHUH et al., 2006), a SG do grupo jovem da nossa casuística com IPIai 0-1 foi superior (93% *versus* 100%, respectivamente) (ANEXO D). Da mesma forma a SG no grupo de idosos da casuística foi melhor do que nos estudos LNH-98.5 (COIFFIER et al., 2002) e RICOVER-60 (PFREUNDSCHUH et al., 2008a) (84,2% *versus* 70% *versus* 78,1%) (ANEXO D). Nossa casuística incluiu pacientes com prognóstico clínico pouco melhor que os pacientes do estudo LNH-98.5. Entretanto em relação ao RICOVER-60, o melhor resultado não pode ser atribuído à seleção de pacientes, uma vez que o percentual de pacientes com IPI intermediário alto e alto foi semelhante, além disso, na nossa casuística houve maior número de pacientes com doença avançada do que no RICOVER-60 (61,9% *versus* 49,7%). Resultados semelhantes foram observados para SLP em ambos os grupos etários em relação aos estudos de referência (ANEXO D).

As melhores taxas de RC na nossa casuística de idosos em relação aos jovens esteve relacionada com o maior percentual de idosos com estado funcional menor que 2 (90,5% *versus* 57,14%, $p=0,0152$). Demonstramos em análise univariada ($p=0,0008$) (Tabela 19) e multivariada ($p=0,003$) que o ECOG foi variável independente para a RC. Entretanto os

grupos etários não diferiram significativamente em SG, SLP ou do ponto de vista genético (ANEXO E).

Uma possível explicação para as melhores taxas de SG (84,2% *versus* 78,1%), SLP (89,7% *versus* 73,4%) e RC (95% *versus* 78%) entre nossa casuística e a do estudo RICOVER-60 (ANEXO D), apesar das semelhanças em relação ao estado funcional (90,5% *versus* 86%) e ao IPI adaptado de maior risco (38% *versus* 40%); e de um maior número de pacientes com doença avançada em nossa casuística (61,9% *versus* 49,7%), seria a possibilidade de inclusão ao acaso de pacientes com melhor genética tumoral em nossa casuística de idosos. Observamos que 73,7% do pacientes idosos pertenciam ao cluster-CG e que 84,2% apresentam NEGP de baixo risco. Uma vez que essas características não foram avaliadas por Pfreundschuh et al. (2008a), não é possível comparação e confirmação dessa hipótese. É provável que em nosso país, idosos com linfomas com pior genética tumoral morram antes de ter acesso ao especialista no SUS, resultando em estatísticas subestimadas.

A necessidade de revelar os aspectos genéticos do LDGCB responsáveis por diferentes desfechos dentro de subgrupos de risco clínico semelhante levou Alizadeh et al. (2000) a comparar por cDNA *microarray* os perfis de expressão gênica dos LDGCB e dos linfócitos B normais em diferentes estágios de maturação (repouso, centro germinativo e células ativadas). Esse estudo resultou na identificação das duas principais assinaturas gênicas em LDGCB, o tipo LDGCB-CG e o tipo LDGCB-CBA. Posteriormente foram descritas as assinaturas gênicas CMH classe II, tipo 3 e linfonodal (ROSENWALD et al., 2002). Hans et al. (2004) construiu o primeiro modelo imuno-histoquímico (CD10, BCL6 e MUM-1/IRF-4) capaz de separar o LDGCB em CB e CBA com concordância de 80% com o cDNA *microarray*. Outros modelos de IHQ seguiram-se na tentativa de melhorar essa correlação (CHOI et al., 2009; MEYER et al., 2011). No mesmo ano, Lossos et al. (2004) criaram um modelo matemático baseado na correlação da expressão de seis genes (BCL2, BCL6, CCND2, FN1, LMO2 e

SCYA3) por qRT-PCR capaz de separar grupos de prognósticos distintos nas diversas categorias de IPI. Esse trabalho foi posteriormente validado por Malumbres et al. (2008) na era pós-rituximabe, entretanto não alcançou significância estatística no grupo de IPI de alto risco.

Com base nesses estudos, os genes LMO2 e BCL6 fazem parte da assinatura gênica CG de bom prognóstico (ALIZADEH et al., 2000; ROSENWALD et al., 2002, HANS et al., 2004; CHOI et al., 2009; MEYER et al., 2011), o gene FN1 faz parte da assinatura gênica linfonodal igualmente de bom prognóstico e os genes BCL2, CCND2 e SCYA3 da assinatura gênica de células B ativada (pós-CG) relacionada à pior prognóstico (ALIZADEH et al., 2000; ROSENWALD et al., 2002; SHAFFER et al., 2000; LOSSOS et al., 2004, HANS et al., 2004; MURIS et al., 2006; CHOI et al., 2009).

Os estudos com qRT-PCR sugerem que o prognóstico do LDGCB seja influenciado pela interação da expressão desses seis genes (LOSSOS et al.; 2004; MALUMBRES et al., 2008), que seriam co-expressos em maior ou menor quantidade, não permitindo diferenciar de forma qualitativa os subtipos de LDGCB-GC e LDGCB-NCG. Por outro lado, equações matemáticas construídas a partir do peso prognóstico de cada gene poderiam refletir melhor a realidade do microambiente genético tumoral. No trabalho atual, baseado na técnica de qRT-PCR a partir de amostras fixadas no formol e incluídas em parafina, investigamos numa casuística brasileira (com distribuição de IPI e RIPI semelhantes às internacionais conforme já mencionado) a possibilidade de separarmos os LDGCB conforme maior ou menor expressão dos genes de determinada assinatura (CG *versus* NCG), bem como testamos o modelo matemático de interação dos seis genes de Lossos et al. (2004) e construímos novo modelo matemático (NEGP) aplicável à nossa casuística.

No presente estudo ficou claro que os seis genes (BCL2, BCL6, CCND2, FN1, LMO2 e SCYA3) estiveram concomitantemente expressos em amostras de LDGCB, mas com

diferentes níveis de expressão (ANEXOS A e B). Nós também demonstramos a correlação da alta expressão dos genes LMO2, BCL6 e SCYA3 com melhor prognóstico. Identificamos um ponto de corte quantitativo para o qRT-PCR, caracterizado por LMO2 (log na base 2) >3 logs e BCL6 (log na base 2) $>3,5$ logs, que definiu um cluster (cluster-CG) com significativamente maior SG (91% *versus* 64,3%, $p=0,04$) e SLP (95,5% *versus* 70,7%, $p=0,031$) do que pacientes não pertencentes ao cluster (cluster-NCG), e que também era caracterizado por maior expressão do gene SCYA3 ($p=0,046$). A expressão dos demais genes FN1, CCND2 e BCL2 não diferiu significativamente entre os clusters. O valor prognóstico do cluster-CG foi independente do IPI para SG ($p=0,026$) e SLP ($p=0,042$).

A SG nos grupos de risco (cluster-CG e NCG) definidos nesta tese pelo qRT-PCR foi superior à dos grupos LDGCB-CG (76% em 5 anos) e LDGCB-CBA (16% em 5 anos) de Alizadeh et al. (2000); e à dos grupos LDGCB-CG (60% em 5 anos) e LDGCB-NCG (35-39% em 5 anos) de Rosenwald et al. (2002). Entretanto cabe lembrar que esses estudos foram realizados antes da introdução do rituximabe.

Dessa forma, corroboramos que o melhor prognóstico atribuído aos genes da assinatura CG (BCL6 e LMO2) se mantém na era pós-rituximabe. Por outro lado, a hiperexpressão de gene SCYA3, atribuído à assinatura CBA por Lossos et al. (2004), passou a se correlacionar com melhor evolução, incompatível com as características dessa assinatura. Malumbres et al. (2008) também observou correlação da expressão do SCYA3 com melhor prognóstico em pacientes tratados com rituximabe. O SCYA3 recruta uma variedade de células para locais de inflamação (PROOST; WUYTS; VAN DAMME, 1996) e possivelmente influencia o microambiente tumoral do LDGCB. A adição de rituximabe alterou o significado prognóstico do gene SCYA3 provavelmente devido a suas propriedades antiinflamatórias (CANIONI et al., 2008; TAYLOR; LINDORFER, 2007).

Ao contrário de Malumbres et al. (2008) não conseguimos validar o EPM em nossa casuística de LDGCB tratada de forma homogênea com R-CHOP. O EPM não se mostrou significativo como preditivo de RC, RG, SG ou SLP (Tabelas 19, 20, 21 e 22) independentemente do ponto de corte utilizado (Lossos et al. ou Malumbres et al.). Pelo critério de Lossos et al. pacientes com evolução favorável foram contraditoriamente classificados em alto risco, superestimando assim o risco (Tabela 17). Por outro lado, pelo critério de Malumbres et al. um paciente de prognóstico clínico ruim foi classificado em bom prognóstico genético (Tabela 17). Além disso, o EPM não foi eficaz para separar grupos com prognósticos distintos dentro dos subgrupos de risco de IPI (Gráficos 11 a 13).

O EPM é um escore de interação gênica, criado a partir de genes que individualmente não atingiam significância estatística para SG, que foi eficaz em separar grupos de prognósticos distintos dentro dos subgrupos de IPI na era pré-rituximabe (LOSSOS et al., 2004). O conceito de interação gênica pode ser exemplificado pelo gene BCL6 que regula negativamente a expressão de CCND2 e SCYA3 (SHAFFER et al., 2000). Para a construção do EPM, Lossos et al. (2004) escolheram os seis genes cuja expressão normatizada e transformada na escala logarítmica na base 2 apresentava escore z absoluto acima de 1,5 em análise univariada para SG. Os genes BCL6, FN1 e LMO2 tinham escore z negativo e associavam-se a melhor prognóstico, enquanto o inverso foi observado para os genes BCL2, CCND2 e SCYA3.

Malumbres et al. (2008) aplicaram a mesma equação definida por Lossos et al. (2004) “EPM= $(-0,0273 \times LMO2) + (-0,2103 \times BCL6) + (-0,1878 \times FN1) + (0,0346 \times CCND2) + (0,1888 \times SCYA3) + (0,5527 \times BCL2)$ ” para pacientes tratados com quimioterapia associada a rituximabe, validando o EPM nesses pacientes. Algumas críticas são pertinentes ao se analisar o trabalho de Malumbres et al. (2008). O valor do escore z absoluto dos genes FN1 ($z=-1,03$) e SCYA3 ($z=-0,71$) foi muito inferior a 1,5 e mesmo assim foram mantidos na equação do

EPM. Além disso, apesar da inversão do sinal do escore z do gene SCYA3 (passou de positivo para negativo) ele foi mantido na equação como positivo, ainda que isso signifique correlação inversa de prognóstico. Foi mudado também o ponto de corte para a mediana do EPM e o EPM não alcançou significância estatística no grupo de IPI de alto risco. Não parece lógico, portanto, que com tantas diferenças, o EPM permaneça imutado e aplicável na era pós-rituximabe. Uma vantagem em relação à Lossos et al. (2004) foi a extração de RNA a partir de amostras fixadas no formol e incluídas em parafina, princípio também aplicado nesta tese.

Assim como Lossos et al. (2004), não observamos em análise univariada significância estatística para nenhum dos genes isoladamente em relação a SG (Tabela 23), enquanto que Malumbres et al. (2008) demonstraram significância estatística para SG para os genes BCL2 ($p=0,02$), BCL6 ($p=0,01$), CCND2 ($p=0,03$) e LMO2 ($p<0,001$) (Tabela 23).

Nossos resultados divergiram dos obtidos por Lossos et al. (2004) em vários aspectos. Dos seis genes avaliados, todos tiveram escore z negativo, exceto o gene CCND2 e, portanto seriam categorizados como tendo impacto prognóstico favorável, enquanto Lossos et al. (2004) encontraram valores de z negativos somente para LMO2, FN1 e BCL6, mas neste estudo os pacientes não usaram rituximabe. No estudo de Malumbres que usou rituximabe, todos os genes tiveram escore negativo à exceção do BCL2 e do CCND2.

Diferentemente de Lossos et al. (2004) e Malumbres et al. (2008), o sinal de z para o gene BCL2 foi negativo em nossa casuística. Esse resultado é compatível com estudos recentes em pacientes com LDGCB tratados com rituximabe que demonstraram perda do impacto prognóstico negativo do gene BCL2 (MOUNIER et al., 2003; MOUNIER et al., 2006; WINTER et al., 2006; SHIVAKUMAR; ARMITAGE, 2006; SJÖ et al., 2007; FU et al., 2008; WILSON et al., 2008). O rituximabe age na via de sinalização intracelular sobre a P38/MAPK, levando à inibição das vias NFkB e SP1, reduzindo a síntese de IL-10, o que leva à subregulação da via da STAT3, resultando na inibição do gene BCL2 e consequentemente

em apoptose e quimiossensibilização da célula tumoral CD20-positiva (Figura 4) (FU et al., 2008; AMOROSO et al., 2011). Além disso, observamos que 100% dos pacientes com BCL2 acima da mediana apresentaram RC (Tabela 20).

Inversamente a Lossos et al. (2004) e em acordo com Malumbres et al. (2008) encontramos um escore z negativo para o gene SCYA3, que conforme já discutimos participa do microambiente inflamatório tumoral e pode ter sido modificado pelas propriedades anti-inflamatórias do rituximabe.

Uma vez que para a criação do EPM somente foram incluídos genes com valor de z absoluto maior ou igual a 1,5, Malumbres et al. (2008) não deveriam ter mantido os genes FN1 ($z=-1,03$) e SCYA3 ($z=-0,71$) no modelo. Na nossa casuística, apenas o gene LMO2 apresentou valor absoluto de z superior ou igual a 1,5 ($-1,78$). O gene CCND2 seria mantido por aproximação ($z = +1,45$). A correlação de CCND2 com pior SG e de LMO2 com maior SG foram compatíveis com a literatura (LOSSOS et al., 2004; AMEN et al. 2007; MALUMBRES et al., 2008; ALIZADEH et al., 2011). A Tabela 23 demonstra os resultados da análise univariada para SG e SLP da expressão gênica individual dos seis genes em nossa casuística e na casuística de Malumbres et al. (2008). Em relação à SLP, não encontramos associação estatística para nenhum dos seis genes, entretanto Malumbres et al. (2008), observou associação dos genes BCL6 e LMO2 com maior SLP e do gene BCL2 com pior SLP.

Por tudo isso, estabelece-se como verdade que os genes avaliados não têm o mesmo poder de prognóstico em pacientes com LDGCB tratados com ou sem rituximabe. Desta forma rejeitamos a validade da equação de Lossos et al. (2004) para o cálculo do EPM em pacientes com LDGCB tratados com R-CHOP. Por isso propusemos novo escore genético preditivo de prognóstico (NEGP) com significância estatística em pacientes com LDGCB tratados com R-CHOP tanto para SG quanto para SLP. Esse escore foi baseado nos dois genes

que apresentaram escore z absoluto próximo ou superior a 1,5, o gene LMO2 e o gene CCND2.

Conforme demonstrado em nosso estudo, o NEGP dividiu os pacientes com LDGCB em grupos genéticos de baixo risco e alto risco, com distintas SG (92,4% *versus* 57,1, $p=0,011$), SLP (96,2% *versus* 66,7%, $p=0,013$) e RG (100% *versus* 66,7%, $p=0,002$) (Tabela 18). Esses grupos apresentaram características clínicas e epidemiológicas semelhantes, diferindo unicamente do ponto de vista genético (NEGP). Portanto podemos inferir que a significativa melhora da SG, SLP e RG tem relação com fatores genéticos estimáveis pelo NEGP. Além disso, o NEGP conseguiu identificar subgrupos distintos de prognóstico dentro do grupo de pacientes com IPI de maior risco, demonstrando ser independente do IPI como variável categórica (ponto de corte em 2,5) ou contínua (Tabela 26). Entretanto, no grupo de IPI de baixo risco, devido às limitações da amostra, o NEGP não pode ser validado.

Portanto, não validamos modelo dos seis genes tal qual o fizera Malumbres et al. (2008) em LDGCB tratados com rituximabe. Por outro lado, criamos um modelo mais prático e com significância estatística para SG, SLP e RG em LDGCB com IPI de risco intermediário alto e alto. Esse modelo demonstra o valor da interação entre os genes LMO2 e CCND2.

7 CONCLUSÃO

1. As taxas de SLP e SG não foram influenciadas individualmente pelos genes LMO2, FN1, BCL6, BCL2, CCND2 e SCYA3 em pacientes com LDGCB tratados com a associação de rituximabe e quimioterapia.
2. A hiperexpressão do gene LMO2 de acordo com o valor de z foi associada à maior SLP e SG.
3. A hiperexpressão do gene CCND2 de acordo com o valor de z foi associada à pior SLP e SG.
4. A hiperexpressão de BCL2 não foi preditiva de mau prognóstico.
5. A hiperexpressão do SCYA3 não foi preditiva de mau prognóstico.
6. A hiperexpressão dos genes LMO2 acima de 3 logs e BCL6 acima de 3,5 logs definiu um grupo de pacientes com superior SG e SLP (cluster-CG), independente do IPI.
7. O gene SCYA3 foi significativamente hiperexpresso no cluster-CG.
8. Em nossa casuística o EPM com base nos seis genes conforme proposto por Lossos et al. e Malumbres et al. não se confirmou como preditivo de RG, RC, SLP ou SG.
9. Foi estabelecido um novo escore de prognóstico molecular baseado nos valores absolutos de expressão dos genes LMO2 e CCND2 com impacto significativo na SLP e SG em LDGCB tratados com rituximabe associado à quimioterapia independentemente do IPI para o subgrupo de pacientes de IPI de risco intermediário alto e alto.
10. Não foi possível validar o novo escore de prognóstico molecular baseado nos valores absolutos de expressão dos genes LMO2 e CCND2 em pacientes de IPI de baixo risco.
11. A técnica de quantificação absoluta de expressão gênica a partir de amostras fixadas em formol e incluídas em parafina foi implantada no laboratório de Imunopatologia do serviço de Hematologia do HC e no LIM 31 da FMUSP.

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSEN, H.N.; STEINICHE, T.; NEXO, E.; HAMILTON-DUTOIT, S.J.; SORENSEN, B.S. Towards quantitative mRNA analysis in paraffin-embedded tissues using real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction: a methodological study on lymph nodes from melanoma patients. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 5, n. 1, p. 34–41, 2003

ABRAMSON, J.S.; SHIPP, M.A. Advances in the biology and therapy of diffuse large B-cell lymphoma: moving toward a molecularly targeted approach. **Blood**, v. 106, n. 4, p. 1164–1174, 2005.

AKIYAMA, S.K.; OLDEN, K.; YAMADA, K.M. Fibronectin and integrins in invasion and metastasis. **Cancer and Metastasis Review**, v. 14, n. 3, p. 173–189, 1995.

ALIZADEH AA, GENTLES AJ, ALENCAR AJ, LIU CL, KOHRT HE, HOUOT R, GOLDSTEIN MJ, ZHAO, S.; NATKUNAM, Y.; ADVANI, R.H.; GASCOYNE, R.D.; BRIONES, J.; TIBSHIRANI, R.J.; MYKLEBUST, J.H.; PLEVITIS, S.K.; LOSSOS, I.S.; LEVY, R. Prediction of survival in diffuse large B-cell lymphoma based on the expression of 2 genes reflecting tumor and microenvironment. **Blood**, v. 118, n. 5, p. 1350–1358, 2011.

ALIZADEH, A.A.; EISEN, M.B.; DAVIS, R.E.; MA, C.; LOSSOS, I.S.; ROSENWALD, A.; BOLDRICK, J.C.; SABET, H.; TRAN, T.; YU, X.; POWELL, J.I.; YANG, L.; MARTI, G.E.; MOORE, T.; HUDSON, J.JR.; LU, L.; LEWIS, D.B.; TIBSHIRANI, R.; SHERLOCK, G.; CHAN, W.C.; GREINER, T.C.; WEISENBURGER, D.D.; ARMITAGE, J.O.; WARNKE, R.; LEVY, R.; WILSON, W.; GREVER, M.R.; BYRD, J.C.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P.O.; STAUDT, L.M. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. **Nature**, v. 403, n. 6769, p. 503–511, 2000.

AMARA, K.; TRIMECHE, M.; ZIADI, S.; LAATIRI, A.; MESTIRI, S.; SRIHA, B.; MOKNI, M.; KORBI, S. Presence of simian virus 40 in diffuse large B-cell lymphomas in Tunisia correlates with germinal center B-cell immunophenotype, t(14;18) translocation, and P53 accumulation. **Modern Pathology**, v. 21, n. 3, p. 282–296, 2008.

AMOROSO, A.; HAFSI, S.; MILITELLO, L.; RUSSO, A.E.; SOUA, Z.; MAZZARINO, M.C.; STIVALA, F.; LIBRA, M. Understanding rituximab function and resistance: implications for tailored therapy. **Frontiers in Bioscience**, v. 16, p. 770–782, 2011.

ANDERSON, J.R.; ARMITAGE, J.O.; WEISENBURGER, D.D. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. **Annals of Oncology**, v. 9, n. 7, p. 717-720, 1998.

ARMITAGE, J.O. How I treat patients with diffuse large B-cell lymphoma. **Blood**, v. 110, n. 1, p. 29-36, 2007.

ARMITAGE, J.O. STAGING NON-HODGKIN LYMPHOMA. **CA – A Cancer Journal for Clinicians**, v. 55, n. 6, p. 368–376, 2005.

ARMITAGE, J.O.; WEISENBURGER, D.D. New Approach to Classifying Non-Hodgkin's Lymphomas: Clinical Features of the Major Histologic Subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 16, p. 2780-2795, 1998.

AVILÉS, A.; NERI, N.; DELGADO, S.; PÉREZ, F.; NAMBO, M.J.; CLETO, S.; TALAVERA, A.; HUERTA-GUZMÁN, J. Residual disease after chemotherapy in aggressive malignant lymphoma: the role of radiotherapy. **Medical Oncology**, v. 22, n. 4, p. 383-7, 2005.

B-CELL CLL/LYMPHOMA 2 [HOMO SAPIENS]. **Gene**: banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/596>>. Acesso em: 5 agos. 2012.

BEN-EZRA, J.; JOHNSON, D.A.; ROSSI, J.; COOK, N.; WU, A. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffinembedded material by the polymerase chain reaction. **J Histochemistry & Cytochemistry**, v. 39, n. 3, p:351–354, 1991.

BERGLUND, M.; THUNBERG, U.; AMINI, R.M.; BOOK, M.; ROOS, G.; ERLANSON, M.; LINDEROTH, J.; DICTOR, M.; JERKEMAN, M.; CAVALLIN-STÅHL, E.; SUNDSTRÖM, C.; REHN-ERIKSSON, S.; BACKLIN, C.; HAGBERG, H.; ROSENQUIST, R.; ENBLAD, G. Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis. **Modern Pathology**, v. 18, n. 8, p. 1113-1120, 2005.

BISHOP, M. R.; DEAN, R.M.; STEINBERG, S.; ODOM, J.; PAVLETIC, S.Z.; KASTENSPORTES C.; HARDY, N.; PITTALUGA, S.; GRESS, R.; FOWLER D.H. Reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation for diffuse large B-cell lymphoma: Clinical evidence of a graft-versus-lymphoma effect. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 18S, abstract 6546, 2006.

BOEHM, T.; FORONI, L.; KANEKO, Y.; PERUTZ, M.F.; RABBITTS, T.H. The rhombotin family of cysteine-rich LIM-domain oncogenes: distinct members are involved in T-cell translocations to human chromosomes 11p15 and 11p13. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 88, p. 4367-4371, 1991.

BRASIL. Lei nº 12732, de 22 de novembro de 2012. Dispõe sobre o primeiro tratamento de paciente com neoplasia maligna comprovada e estabelece prazo para seu início. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 nov. 2012. Seção 1, p. 1.

BROWN RA. Failure of fibronectin as an opsonin in the host defence system: a case of competitive self-inhibition? **Lancet**, v. 2, n. 8358, p. 1058-1060, 1983.

CANIONI, D.; SALLES, G.; MOUNIER, N.; BROUSSE, N.; KEUPPENS, M.; MORCHHAUSER, F.; LAMY, T.; SONET, A.; ROUSSELET, M.C.; FOUSSARD, C.; XERRI, L. High numbers of tumor-associated macrophages have an adverse prognostic value that can be circumvented by rituximab in patients with follicular lymphoma enrolled onto the GELA-GOELAMS FL-2000 Trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 3, p: 440-446, 2008.

CARBONE, P.P.; KAPLAN, H.S.; MUSSHOFF, K.; SMITHERS, D.W.; TUBIANA, M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. **Cancer Research**, v. 31, n. 11, p. 1860-1861, 1971.

CASANOVAS, R.O.; MEIGNAN, M.; BERRIOLO-RIEDINGER, A.; ITTI, E.; HUGLO, D.; HAIOUN, C.; MORSCHHAUSER, F. Early Interim PET Scans in Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Can There Be Consensus About Standardized Reporting, and Can PET Scans Guide Therapy Choices? **Current Hematologic Malignancy Report**, 2012.

CASHEN, A; DEHDASHTI, F.; LUO, J.; BARTLETT, N.L. Poor Predictive Value of FDG-PET/CT Performed after 2 Cycles of R-CHOP in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLCL). **Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)**, v. 112, p. 371, 2008

CATTORETTI, G.; CHANG, C.C.; CECHOVA, K.; ZHANG, J.; YE, B.H.; FALINI, B.; LOUIE, D.C.; OFFIT, K.; CHAGANTI, R.S.; DALLA-FAVERA, R. BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. **Blood**, v. 86, n. 1, p. 45-53, 1995.

CCL3 CHEMOKINE (C-C MOFIT) LIGAND 3 [*HOMO SAPIENS*]. **Gene**: banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6348>>. Acesso em: 5 agosto. 2012.

CCND2 cyclin D2 [*HOMO SAPIENS*]. **Gene**: banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/894>>. Acesso em: 5 agosto. 2012.

CHAGANTI, S.R.; CHEN, W.; PARSA, N.; OFFIT, K.; LOUIE, D.C.; DALLA-FAVERA, R.; CHAGANTI, R.S. Involvement of BCL6 in chromosomal aberrations affecting band 3q27 in B-cell non-Hodgkin lymphoma. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 23, n. 4, p. 323-327, 1998.

CHEN, J.; BYRNE, G.E. JR.; LOSSOS, I.S. Optimization of RNA extraction from formalin-fixed, paraffinembedded lymphoid tissues. **Diagnostic Molecular Pathology**, v. 16, n. 2, p: 61-72, 2007.

CHESON, B.D. Role of functional imaging in the management of lymphoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 14, p. 1844-1854, 2011.

CHESON, B.D.; HORNING, S.J.; COIFFIER, B.; SHIPP, M.A.; FISHER, R.I.; CONNORS, J.M.; LISTER, T.A.; VOSE, J.; GRILLO-LÓPEZ, A.; HAGENBEEK, A.; CABANILLAS, F.; KLIPPENSTEN, D.; HIDDEMANN, W.; CASTELLINO, R.; HARRIS, N.L.; ARMITAGE, J.O.; CARTER, W.; HOPPE, R.; CANELLOS, G.P. Report of an International Workshop to Standardize Response Criteria for Non-Hodgkin's Lymphomas. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, n. 4, p. 1244-1253, 1999.

CHESON, B.D.; PFISTNER, B.; JUWEID, M.E.; GASCOYNE, R.D.; SPECHT, L.; HORNING, S.J.; COIFFIER, B.; FISHER, R.I.; HAGENBEEK, A.; ZUCCA, E.; ROSEN, S.T.; STROOBANTS, S.; LISTER, T.A.; HOPPE, R.T.; DREYLING, M.; TOBINAI, K.; VOSE, J.M.; CONNORS, J.M.; FEDERICO, M.; DIEHL, V.; International Harmonization Project on Lymphoma. Revised response criteria for malignant lymphoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 5, p. 579-86, 2007.

CHILES, T.C. Regulation and function of cyclin D2 in B lymphocyte subsets. **Journal of Immunology**, v. 173, n. 5, p. 2901-2907, 2004.

CHO, J.; MOSHER, D.F. Impact of fibronectin assembly on platelet thrombus formation in response to type I collagen and von Willebrand factor. **Blood**, v. 108, n. 7, p. 2229-2236, 2006.

CHOI, W.W.; WEISENBURGER, D.D.; GREINER, T.C.; PIRIS, M.A.; BANHAM, A.H.; DELABIE, J.; BRAZIEL, R.M.; GENG, H.; IQBAL, J.; LENZ, G.; VOSE, J.M.; HANS, C.P.; FU, K.; SMITH, L.M.; LI, M.; LIU, Z.; GASCOYNE, R.D.; ROSENWALD, A.; OTT, G.; RIMSZA, L.M.; CAMPO, E.; JAFFE, E.S.; JAYE, D.L.; STAUDT, L.M.; CHAN, W.C. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 17, p. 5494-5502, 2009.

CHRISTIE, D.; GRACIA, E.; GOSPODAROWICZ, M.; MARTINELLI, G. Patterns of outcome and prognostic factors in primary bone lymphoma (osteolymphoma): a survey of 499 cases by the International Extranodal Lymphoma Study Group. **Haematologica**, v. 92, abstract 717, 2007.

CLARK, E.A.; GOLUB, T.R.; LANDER, E.S.; HYNES, R.O. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. **Nature**, v. 406, n. 6795, p. 532-535, 2000.

COIFFIER, B.; LEPAGE, E.; BRIERE, J.; HERBRECHT, R.; TILLY, H.; BOUABDALLAH, R.; MOREL, P.; VAN DEN NESTE, E.; SALLES, G.; GAULARD, P.; REYES, F.; LEDERLIN, P.; GISSELBRECHT, C. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n.4, p. 235-242, 2002.

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**, v. 116, n. 12, p. 2040-2045, 2010.

COLOMO, L.; LÓPEZ-GUILLERMO, A.; PERALES, M.; RIVES, S.; MARTÍNEZ, A.; BOSCH, F.; COLOMER, D.; FALINI, B.; MONTSERRAT, E.; CAMPO, E. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. **Blood**, v. 101, n. 1, p. 78-84, 2003.

CORTELAZZO, S.; MIAN, M.; ROSSI, A.; OLDANI, E. Primary extranodal diffuse large B-cell lymphomas arising in distinct sites of head and neck have different clinical characteristics and outcome. **Haematologica**, v. 92, abstract 862, 2007.

COX, D.R. Regression Models and Life-Tables. **Journal of the Royal Statistical Society, series B (Methodological)**, v. 34, n. 2, p: 187-220, 1972.

CUBEDO, E.; GENTLES, A.J.; HUANG, C.; NATKUNAM, Y.; BHATT, S.; LU, X.; JIANG, X.; ROMERO-CAMARERO, I.; FREUD, A.; ZHAO, S.; BACCHI, C.E.; MARTÍNEZ-CLIMENT, J.A.; SÁNCHEZ-GARCÍA, I.; MELNICK, A.; LOSSOS, I.S. Identification of LMO2 transcriptome and interactome in diffuse large B-cell lymphoma. **Blood**, v. 119, n. 23, p. 5478-5491, 2012.

DAVIS, R.E.; BROWN, K.D.; SIEBENLIST, U., STAUDT, L.M. Constitutive nuclear factor kappa B activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 12, p. 1861-1874, 2001.

DE PAEPE, P.; ACHTEN, R.; VERHOEF, G.; WLODARSKA, I.; STUL, M.; VANHENTENRIJK, V.; PRAET, M.; DE WOLF-PEETERS, C. Large cleaved and immunoblastic lymphoma may represent two distinct clinicopathologic entities within the group of diffuse large B-cell lymphomas. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 28, p. 7060-7068, 2005.

DEPARTMENT OF HEALTH. **Review of Cancer Waiting Times Standards. Improving Outcomes: A Strategy for Cancer.** Reino Unido, 2011.

DELARUE, R.; TILLY, T.; SALLES, G.A.; THIEBLEMONT, C.; MOUNIER, N.; MOLINA, T.J.; HAIOUN, C.; BOSLY A. R-CHOP14 compared to R-CHOP21 in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): Final analysis of the LNH03-6B GELA study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n.15, p. 2012. Supplement.

DUNLEAVY, K.; WILSON, W.H. Differential role of BCL2 in molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 24, p. 7505-7507, 2011.

DUPUIS, J.; GAULARD, P.; HEMERY, F.; ITTI, E.; GISSELBRECHT, C.; RAHMOUNI, A.; COPIE-BERGMAN, C.; BRIÈRE, J.; EL GNAOUI, T.; GAILLARD, I.; MEIGNAN, M.; HAIOUN, C. Respective prognostic values of germinal center phenotype and early (18)fluorodeoxyglucose-positron emission tomography scanning in previously untreated patients with diffuse large B-cell lymphoma. **Haematologica**. v. 92, n. 6, p. 778-83, 2007.

DUPUIS, J.; ITTI, E.; RAHMOUNI, A.; HEMERY, F.; GISSELBRECHT, C.; LIN, C.; COPIE-BERGMAN, C.; BELHADJ, K.; EL GNAOUI, T.; GAILLARD, I.; KUHNOWSKI, F.; MEIGNAN, M.; HAIOUN, C. Response assessment after an inductive CHOP or CHOP-like regimen with or without rituximab in 103 patients with diffuse large B-cell lymphoma: integrating 18fluorodeoxyglucose positron emission tomography to the International Workshop Criteria. **Annals of Oncology**, v. 20, n. 3, p. 503-507, 2009.

ELIAS, L.; PORTLOCK, C.S.; ROSENBERG, S.A. Combination chemotherapy of diffuse histiocytic lymphoma with cyclophosphamide, adriamycin, vincristine and prednisone (CHOP). **Cancer**, v. 42, n. 4, p. 1705-10, 1978.

FISHER, R.I.; GAYNOR, E.R.; DAHLBERG, S.; OKEN, M.M.; GROGAN, T.M.; MIZE, E.M.; GLICK, J.H.; COLTMAN, C.A.; MILLER, T.P. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. **New England Journal of Medicine**, v. 328, n. 14, p. 1002-1006, 1993.

FITOUSSI, O.; BELHADJ, K.; MOUNIER, N.; PARRENS, M.; TILLY, H.; SALLES, G.; FEUGIER, P.; FERME, C.; YSEBAERT, L.; GABARRE, J.; HERBRECHT, R.; JANVIER, M.; VAN DEN NESTE, E.; MORSCHHAUSER, F.; CASASNOVAS, O.; GHESQUIERES, H.; ANGLARET, B.; BRECHIGNAC, S.; HAIOUN, C.; GISSELBRECHT, C. Survival impact of rituximab combined with ACVBP and upfront consolidation autotransplantation in high-risk diffuse large B-cell lymphoma for GELA. **Haematologica**, v. 96, n. 8, p. 1136-1143, 2011.

FN1 FIBRONECTIN 1 [*HOMO SAPIENS*]. **Gene**: banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2335>>. Acesso em: 4 agos. 2012.

FU, K.; WEISENBURGER, D.D.; CHOI, W.W.; PERRY, K.D.; SMITH, L.M.; SHI, X.; HANS, C.P.; GREINER, T.C.; BIERMAN, P.J.; BOCIEK, R.G.; ARMITAGE, J.O.; CHAN, W.C.; VOSE, J.M. 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. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 28., p. 4587-4594, 2008.

GASCOYNE, R.D.; ADOMAT, S.A.; KRAJEWSKI, S.; KRAJEWSKA, M.; HORSMAN, D.E.; TOLCHER, A.W.; O'REILLY, S.E.; HOSKINS, P.; COLDMAN, A.J.; REED, J.C.; CONNORS, J.M. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. **Blood**, v. 90, n. 1, p. 244-251, 1997.

GAUDIO, F.; GIORDANO, A.; PERRONE, T.; PASTORE, D.; CURCI, P.; DELIA, M.; NAPOLI, A.; DE' RISI, C.; SPINA, A.; RICCO, R.; LISO, V.; SPECCHIA G. High Ki67 index and bulky disease remain significant adverse prognostic factors in patients with diffuse large B cell lymphoma before and after the introduction of rituximab. **Acta Haematologica**, v. 126, n. 1, p. 44-51, 2011.

GISSELBRECHT, C.; GLASS, B.; MOUNIER, N.; GILL, D.; LINCH, D.; TRNENY, M.; BOSLY, A.; SHPILBERG, O.; KETTERER, N.; MOSKOWITZ, C.; SCHMITZ, N. Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 27, p. 4184-4190, 2010.

GOUVEIA G.R.; SIQUEIRA, S.A.C.; CHAMONE, D.A.F.; PEREIRA, J. Prevalence of non-Hodgkin lymphomas in São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 33, n. 4, p. 317, 2011a.

GOUVEIA, G.R.; FERREIRA, S.C.; SABINO, E.C.; SIQUEIRA, S.A.C; PEREIRA, J. Comparação de três protocolos distintos para extração de RNA de amostras fixadas em formalina e emblocadas em parafina. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 6, p: 649-654, 2011b.

GREB, A.; BOHLIUS, J.; SCHIEFER, D.; SCHWARZER, G.; SCHULZ, H.; ENGERT, A. High-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation in the first line treatment of aggressive non-Hodgkin lymphoma (NHL) in adults. **Cochrane Database Systematic Review**, n. 1, 2008.

GRUBER, A.D.; MOENNIG, V.; HEWICKER-TRAUTWEIN, M.; TRAUTWEIN, G. Effect of formalin fixation and long-term storage on the detectability of bovine viral-diarrhoea-virus (BVDV) RNA in archival brain tissue using polymerase chain reaction. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 41, p:654–661, 1994.

HAIOUN, C.; ITTI, E.; RAHMOUNI, A.; BRICE, P.; RAIN, J.D.; BELHADJ, K.; GAULARD, P.; GARDERET, L.; LEPAGE, E.; REYES, F.; MEIGNAN, M. [18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography (FDG-PET) in aggressive lymphoma: an early prognostic tool for predicting patient outcome. **Blood**, v. 106, n. 4, p. 1376-1381, 2005.

HAIOUN, C.; LEPAGE, E.; GISSELBRECHT, C.; SALLES, G.; COIFFIER, B.; BRICE, P.; BOSLY, A.; MOREL, P.; NOUVEL, C.; TILLY, H.; LEDERLIN, P.; SEBBAN, C.; BRIÈRE, J.; GAULARD, P.; REYES, F. Survival benefit of high-dose therapy in poor-risk aggressive non-Hodgkin's lymphoma: final analysis of the prospective LNH87-2 protocol--a groupe d'Etude des lymphomes de l'Adulte study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, n. 16, p. 3025-3030, 2000.

HALLACK NETO, A.E. **Estudo observacional do prognóstico e terapêutica dos portadores de linfoma difuso de grandes células B e de IPIa de risco intermediário alto e alto**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2008.

HALLACK NETO A.E.; PEREIRA, J.; BEITLER, B.; CHAMONE, D.A.F.; LLACER, P.D.; DULLEY, F.L.; MACEDO, M.C.M.A.; CHAOUBAH, A. Results of CHOP chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 10, p. 1315-1322, 2006.

HALLACK NETO, A.E.; PEREIRA, J.; DORLHIAC-LLACER, P.E.; BEITLER, B.; CHAMONE, D.A.F. Aplicação do índice prognóstico internacional em pacientes com linfoma difuso de grandes células B em uma instituição brasileira. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, vol.27, n.1, p: 27-30, 2005.

HANS, C.P.; WEISENBURGER, D.D.; GREINER, T.C.; CHAN, W.C.; AOUN, P.; COCHRAN, G.T.; PAN, Z.; SMITH, L.M.; LYNCH, J.C.; BOCIEK, R.G.; BIERMAN, P.J.; VOSE, J.M.; ARMITAGE, J.O. Expression of PKC-beta or cyclin D2 predicts for inferior survival in diffuse large B-cell lymphoma. **Modern Pathology**, v. 18, n. 10, p. 1377-1384, 2005.

HAN, H.S.; ESCALÓN, M.P.; HSIAO, B.; SERAFINI, A.; LOSSOS, I.S. High incidence of false-positive PET scans in patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma treated with rituximab-containing regimens. **Annals of Oncology**, v. 20, n. 2, 309-318, 2009.

HANS, C.P.; WEISENBURGER, D.D.; GREINER, T.C.; GASCOYNE, R.D.; DELABIE, J.; OTT, G.; MÜLLER-HERMELINK, H.K.; CAMPO, E.; BRAZIEL, R.M.; JAFFE, E.S.; PAN, Z.; FARINHA, P.; SMITH, L.M.; FALINI, B.; BANHAM, A.H.; ROSENWALD, A.; STAUDT, L.M.; CONNORS, J.M.; ARMITAGE, J.O.; CHAN, W.C. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. **Blood**, v. 103, n. 1, p. 275-282, 2004.

HARRIS, N.L.; JAFFE, E.S.; STEIN, H.; BANKS, P.M.; CHAN, J.K.; CLEARY, M.L.; DELSOL, G.; DE WOLF-PEETERS, C.; FALINI, B.; GATTER, K.C. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. **Blood**, v. 84, n. 5, p. 1361-1392, 1994.

HERMINE, O.; HAIOUN, C.; LEPAGE, E.; D'AGAY, M.F.; BRIERE, J.; LAVIGNAC, C.; FILLET, G.; SALLES, G.; MAROLLEAU, J.P.; DIEBOLD, J.; REYAS, F.; GAULARD, P. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). **Blood**, v. 87, n. 1, p: 265-72, 1996.

HILL, M.E.; MACLENNAN, K.A.; CUNNINGHAM, D.C.; VAUGHAN HUDSON, B.; BURKE, M.; CLARKE, P.; DI STEFANO, F.; ANDERSON, L.; VAUGHAN HUDSON, G.; MASON, D.; SELBY, P.; LINCH, D.C. Prognostic significance of BCL-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. **Blood**, v. 88, n. 3, p. 1046-1051, 1996.

HULLEY, S.B.; CUMMINGS, S.R.; BROWNER, W.S.; GRADY, D.G.; NEWMAN, T.B. Delineando a Pesquisa Clínica. Um abordagem Epidemiológica. 3. ed.. Porto Alegre, RS: Artmed, 2008, capítulos 4, 5 e 6, p. 55-112.

IMPRAIM, C.C.; SAIKI, R.K.; ERLICH, H.A.; TEPLITZ, R.L. Analysis of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by enzymatic amplification and hybridization with sequencespecific oligonucleotides. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 142, n. 3, p:710–716, 1987.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>>. Acesso em: 24 julho. 2012.

INTERNATIONAL LYMPHOMA STUDY GROUP. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. **Blood**, v. 89, n. 11, p. 3909-3918, 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <www.ibge.gov.br/>. Visitada em 25 de Julho de 2012.

IQBAL, J.; MEYER, P.N.; SMITH, L.M.; JOHNSON, N.A.; VOSE, J.M.; GREINER, T.C.; CONNORS, J.M.; STAUDT, L.M.; RIMSZA, L.; JAFFE, E.; ROSENWALD, A.; OTT, G.; DELABIE, J.; CAMPO, E.; BRAZIEL, R.M.; COOK, J.R.; TUBBS, R.R.; GASCOYNE, R.D.; ARMITAGE, J.O.; WEISENBURGER, D.D.; CHAN, W.C. BCL2 predicts survival in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP-like therapy and rituximab. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 24, p. 7785-7795, 2011.

IQBAL, J.; NEPPALLI, V.T.; WRIGHT, G.; DAVE, B.J.; HORSMAN, D.E.; ROSENWALD, A.; LYNCH, J.; HANS, C.P.; WEISENBURGER, D.D.; GREINER, T.C.; GASCOYNE, R.D.; CAMPO, E.; OTT, G.; MÜLLER-HERMELINK, H.K.; DELABIE, J.; JAFFE, E.S.; GROGAN, T.M.; CONNORS, J.M.; VOSE, J.M.; ARMITAGE, J.O.; STAUDT, L.M.; CHAN, W.C. BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 6, p. 961-968, 2006.

JUWEID, M.E.; STROOBANTS, S.; HOEKSTRA, O.S.; MOTTAGHY, F.M.; DIETLEIN, M.; GUERMAZI, A.; WISEMAN, G.A.; KOSTAKOGLU, L.; SCHEIDHAUER, K.; BUCK, A.; NAUMANN, R.; SPAEPEN, K.; HICKS, R.J.; WEBER, W.A.; RESKE, S.N.; SCHWAIGER, M.; SCHWARTZ, L.H.; ZIJLSTRA, J.M.; SIEGEL, B.A.; CHESON, B.D. IMAGING SUBCOMMITTEE OF INTERNATIONAL HARMONIZATION PROJECT IN LYMPHOMA. Use of positron emission tomography for response assessment of lymphoma: consensus of the Imaging Subcommittee of International Harmonization Project in Lymphoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 5, p. 571-578, 2007.

KAPLAN, E.; MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **Journal of American Statistical Association**, v. 53, p. 457–81, 1958.

KLEIN, U.; DALLA-FAVERA, R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 1, p. 22-33, 2008.

KOOPMANS, M.; MONROE, S.S.; COFFIELD, L.M.; ZAKI, S.R. Optimization of extraction and PCR amplification of RNA extracts from paraffin-embedded tissue in different fixatives. **Journal of Virological Methods**, v. 43, n. 2., p:189–204, 1993.

KRAMER, M.H.; HERMANS, J.; PARKER, J.; KROL, A.D.; KLUIN-NELEMANS, J.C.; HAAK, H.L.; VAN GRONINGEN, K.; VAN KRIEKEN, J.H.; DE JONG, D.; KLUIN, P.M. Clinical significance of bcl2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 14, n. 7, p. 2131-2138, 1996.

LENNERT, K.; STEIN, H.; KAISERLING, E. Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata. **British Journal of Cancer**, v. 2, p: 29-43, 1975, suplemento.

LISTER, T.A.; CROWTHER, D.; SUTCLIFFE, S.B.; GLATSTEIN, E.; CANELLOS, G.P.; YOUNG, R.C.; ROSENBERG, S.A.; COLTMAN, C.A.; TUBIANA, M. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswold's meeting. **Journal of Clinical Oncology**, v. 7, n. 11, p. 1630-60, 1989.

LMO2 LIM DOMAIN ONLY 2 (RHOMBOTIN-LIKE 1) [*HOMO SAPIENS*]. **Gene**: banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4005>>. Acesso em 4 agos. 2012.

LOSSOS, I.S.; CZERWINSKI, D.K.; ALIZADEH, A.A.; WECHSER, M.A.; TIBSHIRANI, R.; BOTSTEIN, D.; LEVY, R. Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 18, p. 1828-1837, 2004.

LOSSOS, I.S.; JONES, C.D.; WARNKE, R.; NATKUNAM, Y.; KAIZER, H.; ZEHNDER, J.L.; TIBSHIRANI, R.; LEVY, R. Expression of a single gene, BCL-6, strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. **Blood**, v. 98, n. 4, p. 945-951, 2001.

LUKES, R.J.; COLLINS, R.D. Immunologic characterization of human malignant lymphomas. **Cancer**, v. 34, p. 1488-1503, 1974.

MACABEO-ONG, M.; GINZINGER, D.G.; DEKKER, N.; MCMILLAN, A.; REGEZI, J.A.; WONG, D.T.; JORDAN, R.C. Effect of duration of fixation on quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analyses. **Methods in Pathology**, v. 15, n. 9, p:979–987, 2002.

MALUMBRES, R.; CHEN, J.; TIBSHIRANI, R.; JOHNSON, N.A.; SEHN, L.H.; NATKUNAM, Y.; BRIONES, J.; ADVANI, R.; CONNORS, J.M.; BYRNE, G.E.; LEVY, R.; GASCOYNE, R.D.; LOSSOS, I.S. Paraffin-based 6-gene model predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. **Blood**, v. 111, n. 12, p. 5509-5514, 2008.

MAO, Y.; SCHWARZBAUER, J.E. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. **Matrix Biology**, v. 24, n. 6, p. 389-399, 2005.

MCCORMACK, M.P.; RABBITTS, T.H. Activation of the T-cell oncogene LMO2 after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 9, p. 913-922, 2004.

MEYER, P.N.; FU, K.; GREINER, T.C.; SMITH, L.M.; DELABIE, J.; GASCOYNE, R.D.; OTT, G.; ROSENWALD, A.; BRAZIEL, R.M.; CAMPO, E.; VOSE, J.M.; LENZ, G.; STAUDT, L.M.; CHAN, W.C.; WEISENBURGER, D.D. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 2, p. 200-207, 2011.

MIDWOOD, K.S.; MAO, Y.; HSIA, H.C.; VALENICK, L.V.; SCHWARZBAUER, J.E. Modulation of cell-fibronectin matrix interactions during tissue repair. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 11, n. 1, p. 73-78, 2006.

MILLER, T.P. The Limits of Limited Stage Lymphoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 15, p. 2982-2984, 2004.

MILLER, T.P.; DAHLBERG, S.; CASSADY, J.R.; ADELSTEIN, D.J.; SPIER, C.M.; GROGAN, T.M.; LEBLANC, M.; CARLIN, S.; CHASE, E.; FISHER, R.I. Chemotherapy alone compared with chemotherapy plus radiotherapy for localized intermediate- and high-grade non-Hodgkin's lymphoma. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 1, p. 21-26, 1998.

MILLER, T.P.; LEBLANC, M.; SPIER, C.M. ET AL. CHOP alone compared to CHOP plus radiotherapy for early stage aggressive non-Hodgkin's lymphoma: update of the Southwest Oncology Group (SWOG) randomized trial. **Blood**, v. 98, p. 742-743, 2001. Supplement.

MOSKOWITZ, C.H.; SCHÖDER, H.; TERUYA-FELDSTEIN, J.; SIMA, C.; IASONOS, A.; PORTLOCK, C.S.; STRAUS, D.; NOY, A.; PALOMBA, M.L.; O'CONNOR, O.A.; HORWITZ, S.; WEAVER, S.A.; MEIKLE, J.L.; FILIPPA, D.A.; CARAVELLI, J.F.; HAMLIN, P.A.; ZELENETZ, A.D. Risk-adapted dose-dense immunochemotherapy determined by interim FDG-PET in Advanced-stage diffuse large B-Cell lymphoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 11, 1896-1903, 2010

MOUNIER, N.; BRIERE, J.; GISSELBRECHT, C.; EMILE, J.F.; LEDERLIN, P.; SEBBAN, C.; BERGER, F.; BOSLY, A.; MOREL, P.; TILLY, H.; BOUABDALLAH, R.; REYES, F.; GAULARD, P.; COIFFIER, B. Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2-associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). **Blood**, v. 101, n. 11, p. 4279-4284, 2003.

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**, v. 91, n. , p. 715-716, 2006.

MURIS, J.J.; MEIJER, C.J.; VOS, W.; VAN KRIEKEN, J.H.; JIWA, N.M.; OSSENKOPPELE, G.J.; OUDEJANS, J.J. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. **Journal of Pathology**, v. 208, n. 5, p. 714-723, 2006.

NAM, C.H.; RABBITTS, T.H. The role of LMO2 in development and in T cell leukemia after chromosomal translocation or retroviral insertion. **Molecular Therapy**, v. 13, p. 15-25, 2006.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Disponível em: <<http://seer.cancer.gov/data/>>. Acesso em: 24 julho. 2012.

NATKUNAM Y. The Biology of the Germinal Center. **ASH Education Book**, v. 2007, n. 1, p. 210-215, 2007.

NATKUNAM, Y.; FARINHA, P.; HSI, E.D.; HANS, C.P.; TIBSHIRANI, R.; SEHN, L.H.; CONNORS, J.M.; GRATZINGER, D.; ROSADO, M.; ZHAO, S.; POHLMAN, B.; WONGCHAOWART, N.; BAST, M.; AVIGDOR, A.; SCHIBY, G.; NAGLER, A.; BYRNE, G.E.; LEVY, R.; GASCOYNE, R.D.; LOSSOS, I.S. LMO2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy with and without rituximab. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 3, p. 447-454, 2008.

NATKUNAM, Y.; ZHAO, S.; MASON, D.Y.; CHEN, J.; TAIDI, B.; JONES, M.; HAMMER, A.S.; HAMILTON DUTOIT, S.; LOSSOS, I.S.; LEVY, R. The oncoprotein LMO2 is expressed in normal germinal-center B cells and in human B-cell lymphomas. **Blood**, v. 109, n. 4, p. 1636-1642, 2007.

OKEN, M.M.; CREECH, R.H.; TORMEY, D.C.; HORTON, J.; DAVIS, T.E.; MCFADDEN, E.T.; CARBONE, P.P. Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group. **American Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n.6, p. 649-655, 1982.

PAREKH, S.; POLO, J.M.; SHAKNOVICH, R.; JUSZCZYNSKI, P.; LEV, P.; RANUNCOLO, S.M.; YIN, Y.; KLEIN, U.; CATTORETTI, G.; DALLA FAVERA, R.; SHIPP, M.A.; MELNICK, A. BCL6 programs lymphoma cells for survival and differentiation through distinct biochemical mechanisms. **Blood**, v. 110, n. 6, p. 2067-2074, 2007.

PFREUNDSCHUH M.; HO, A.D.; CAVALLIN-STAHN, E.; WOLF, M.; PETTENGELL, R.; VASOVA, I.; BELCH, A.; WALEWSKI, J.; ZINZANI, P.L.; MINGRONE, W.; KVALOY, S.; SHPILBERG, O.; JAEGER, U.; HANSEN, M.; CORRADO, C.; SCHELIGA, A.; LOEFFLER, M.; KUHN, E.; MABTHERA INTERNATIONAL TRIAL (MINT) GROUP. Prognostic significance of maximum tumour (bulk) diameter in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma treated with CHOP-like chemotherapy with or without rituximab: an exploratory analysis of the MabThera International Trial Group (MINT) study. **The Lancet Oncology**, v. 9, n. 5, p. 435-444, 2008b.

PFREUNDSCHUH, M.; KUHN, E.; TRÜMPER, L.; OSTERBORG, A.; TRNENY, M.; SHEPHERD, L.; GILL, D.S.; WALEWSKI, J.; PETTENGELL, R.; JAEGER, U.; ZINZANI, P.L.; SHPILBERG, O.; KVALOY, S.; DE NULLY BROWN, P.; STAHEL, R.; MILPIED, N.; LÓPEZ-GUILLERMO, A.; POESCHEL, V.; GRASS, S.; LOEFFLER, M.; MURAWSKI, N.; MABTHERA INTERNATIONAL TRIAL (MINT) GROUP. CHOP-like chemotherapy with or without rituximab in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: 6-year results of an open-label randomised study of the MabThera International Trial (MINT) Group. **The Lancet Oncology**, v. 12, n. 11, p. 1013-1022, 2011.

PFREUNDSCHUH, M.; SCHUBERT, J.; ZIEPERT, M.; SCHMITS, R.; MOHREN, M.; LENGFELDER, E.; REISER, M.; NICKENIG, C.; CLEMENS, M.; PETER, N.; BOKEMEYER, C.; EIMERMACHER, H.; HO A.; HOFFMANN, M.; MERTELSMANN, R.; TRÜMPER, L.; BALLEISEN, L.; LIERSCH, R.; METZNER, B.; HARTMANN, F.; GLASS, B.; POESCHEL, V.; SCHMITZ, N.; RUEBE, C.; FELLER, A.C.; LOEFFLER, M.; GERMAN HIGH-GRADE NON-HODGKIN LYMPHOMA STUDY GROUP (DSHNHL). Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60). **The Lancet Oncology**, v. 9, n. 2, p. 105-116, 2008a.

PFREUNDSCHUH, M.; TRUMPER, L.; KLOESS, M.; SCHMITS, R.; FELLER, A.C.; RUDOLPH, C.; REISER, M.; HOSSFELD, D.K.; METZNER, B.; HASENCLEVER, D.; SCHMITZ, N.; GLASS, B.; RÜBE, C.; LOEFFLER, M.; GERMAN HIGH-GRADE NON-HODGKIN'S LYMPHOMA STUDY GROUP. Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of young patients with good-prognosis (normal LDH) aggressive lymphomas: results of the NHL-B1 trial of the DSHNHL. **Blood**, v. 104, n. 3, p. 626–33, 2004b.

PFREUNDSCHUH, M.; TRÜMPER, L.; KLOESS, M.; SCHMITS, R.; FELLER, A.C.; RÜBE, C.; RUDOLPH, C.; REISER, M.; HOSSFELD, D.K.; EIMERMACHER, H.; HASENCLEVER, D.; SCHMITZ, N.; LOEFFLER, M.; GERMAN HIGH-GRADE NON-HODGKIN'S LYMPHOMA STUDY GROUP. Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of elderly patients with aggressive lymphomas: results of the NHL-B2 trial of the DSHNHL. **Blood**, v. 104, n. 3, p. 634–641, 2004a.

PFREUNDSCHUH, M.; TRÜMPER, L.; ÖSTERBORG, A.; PETTENGELL, R.; TRNENY, M.; IMRIE, K.; MA, D.; GILL, D.; WALEWSKI, J.; ZINZANI, P.L.; 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.; KUHN, 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. **The Lancet Oncology**, v. 7, n. 5, p. 379–391, 2006.

PHILIP, T.; GUGLIELMI, C.; HAGENBEEK, A.; SOMERS, R.; VAN DER LELIE, H.; BRON, D.; SONNEVELD, P.; GISSELBRECHT, C.; CAHN, J.Y.; HAROUSSEAU, J.L.; COIFFIER, B.; BIRON, P.; MANDELLI, F.; CHAUVIN, F. Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma. **New England Journal of Medicine**, v. 333, n. 23, p. 1540–1545, 1995.

PREGNO, P.; CHIAPPELLA, A.; BELLÒ, M.; BOTTO, B.; FERRERO, S.; FRANCESCHETTI, S.; GIUNTA, F.; LADETTO, M.; LIMERUTTI, G.; MENGA, M.; NICOLOSI, M.; PRIOLO, G.; PUCCINI, B.; RIGACCI, L.; SALVI, F.; VAGGELLI, L.; PASSERA, R.; BISI, G.; VITOLO, U. Interim 18-FDG-PET/CT failed to predict the outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated at the diagnosis with rituximab-CHOP. **Blood**, v. 119, n. 9, p. 2066–2073, 2012.

PROJECT TIN-HSLPF. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. **New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 14, p. 987–994, 1993.

PROOST, P.; WUYTS, A.; VAN DAMME, J. The role of chemokines in inflammation. *International Journal of Clinical and Laboratory Research*, v. 26, n. 4, p. 211-223, 1996.

RAPPAPORT, H. Tumors of the hematopoietic system. **In Atlas of Tumor Pathology**. Section III, Fascicle 8, Washington, D.C., Armed Forces Institute of Pathology, 1966.

RATANATHARATHORN, V.; UBERTI, J.; KARANES, C.; ABELLA, E.; LUM, L.G.; MOMIN, F.; CUMMINGS, G.; SENSENBRENNER, L.L. Prospective comparative trial of autologous versus allogeneic bone marrow transplantation in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, n. 84, v. 4, p: 1050-1055, 1994.

ROBB-SMITH, A.H.T.. U.S. National Cancer Institute working formulation of non-Hodgkin's lymphomas for clinical use. *The Lancet*, v. 320, n. 8295, p: 432 - 434, 1982.

ROHATINER, A.; D'AMORE, F.; COIFFIER, B.; CROWTHER, D.; GOSPODAROWICZ, M.; ISAACSON, P.; LISTER, T. A.; NORTON, A.; SALEM, P.; SHIPP, M.; SOMERS, R. Report on a workshop convened to discuss the pathological and staging classifications of gastrointestinal tract lymphoma. *Annals of Oncology*, v. 5, n. 5, p. 397-400, 1994.

ROSENWALD, A.; WRIGHT, G.; CHAN, W.C.; CONNORS, J.M.; CAMPO, E.; FISHER, R.I.; GASCOYNE, R.D.; MULLER-HERMELINK, H.K.; SMELAND, E.B.; GILTNAME, J.M.; HURT, E.M.; ZHAO, H.; AVERETT, L.; YANG, L.; WILSON, W.H.; JAFFE, E.S.; SIMON, R.; KLAUSNER, R.D.; POWELL, J.; DUFFEY, P.L.; LONGO, D.L.; GREINER, T.C.; WEISENBURGER, D.D.; SANGER, W.G.; DAVE, B.J.; LYNCH, J.C.; VOSE, J.; ARMITAGE, J.O.; MONTSERRAT, E.; LÓPEZ-GUILLERMO, A.; GROGAN, T.M.; MILLER, T.P.; LEBLANC, M.; OTT, G.; KVALOY, S.; DELABIE, J.; HOLTE, H.; KRAJCI, P.; STOKKE, T.; STAUDT, L.M.; LYMPHOMA/LEUKEMIA MOLECULAR PROFILING PROJECT. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine*, v. 346, n. 25, p. 1937-1947, 2002.

ROYER-POKORA, B.; LOOS, U.; LUDWIG, W.D. TTG-2, a new gene encoding a cysteine-rich protein with the LIM motif, is overexpressed in acute T-cell leukaemia with the t(11;14)(p13;q11). *Oncogene*, v. 6, p. 1887-1893, 1991.

RYAN, G.; MARTINELLI, G.; YUEN, K.; SEYMOUR, J. Primary non-Hodgkin's lymphoma of the breast: first report of the multicentre retrospective study of the International Extranodal Lymphoma Study Group (IELSG-15). *Journal of Clinical Oncology*, n. 23, n. 16S, abstract 6575, 2005.

SCHOENFELD, D. The asymptotic properties of nonparametric tests for comparing survival distributions. *Biometrika*, v. 68, n. 1, p: 316-319, 1981.

SEAM, P.; JUWEID, M.E.; CHESON, B.D. The role of FDG-PET scans in patients with lymphoma. **Blood**, v. 110, n. 10, p. 3507-3516, 2007.

SEHN, L.H.; BERRY, B.; CHHANABHAI, M.; FITZGERALD, C.; GILL, K.; HOSKINS, P.; KLASA, R.; SAVAGE, K.J.; SHENKIER, T.; SUTHERLAND, J.; GASCOYNE, R.D.; CONNORS, J.M. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. **Blood**, v. 109, n. 5, p. 1857-1861, 2007.

SEHN, L.H.; DONALDSON, J.; CHHANABHAI, M.; FITZGERALD, C.; GILL, K.; KLASA, R.; MACPHERSON, N.; O'REILLY, S.; SPINELLI, J.J.; SUTHERLAND, J.; WILSON, K.S.; GASCOYNE, R.D.; CONNORS, J.M. Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia. **Journal of Clinical Oncology**, v.23, n. 22, p. 5027-5033, 2005.

SHAFFER, A.L.; YU, X.; HE, Y.; BOLDRICK, J.; CHAN, E.P.; STAUDT, L.M. BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. **Immunity**, v. 13, n. 2, p. 199-212, 2000.

SHENKIER, T.N.; VOSS, N.; FAIREY, R.; GASCOYNE, R.D.; HOSKINS, P.; KLASA, R.; KLIMO, P.; O'REILLY, S.E.; SUTCLIFFE, S.; CONNORS, J.M. Brief chemotherapy and involved-region irradiation for limited-stage diffuse large-cell lymphoma: An 18-year experience from the British Columbia Cancer Agency. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 1, p. 197-204, 2002.

SHIPP, M.A.; ABELOFF, M.D.; ANTMAN, K.H.; CARROLL, G.; HAGENBEEK, A.; LOEFFLER, M.; MONTSERRAT, E.; RADFORD, J.A.; SALLES, G.; SCHMITZ, N.; SYMANN, M.; ARMITAGE, J.O.; PHILIP, T.; COIFFIER, B. International Consensus Conference on High-Dose Therapy with Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Aggressive Non-Hodgkin's Lymphomas: report of the jury. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, n. 1, p. 423-429, 1999.

SHIVAKUMAR, L.; ARMITAGE, J.O. Bcl-2 gene expression as a predictor of outcome in diffuse large B- cell lymphoma. **Clinical Lymphoma & Myeloma**, v. 6, n. 6, p. 455-457, 2006.

SJÖ, L.D.; POULSEN, C.B.; HANSEN, M.; MØLLER, M.B.; RALFKIAER, E. Profiling of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry: identification of prognostic subgroups. **European Journal of Haematology**, v. 79, n. 6, p. 501-507, 2007.

SPAEPEN, K.; STROOBANTS, S.; DUPONT, P.; VAN STEENWEGHEN, S.; THOMAS, J.; VANDENBERGHE, P.; VANUYTSEL, L.; BORMANS, G.; BALZARINI, J.; DE WOLF-PEETERS, C.; MORTELMANS, L.; VERHOEF, G. Prognostic value of positron emission tomography (PET) with fluorine-18 fluorodeoxyglucose ([18F]FDG) after first-line chemotherapy in non-Hodgkin's lymphoma: is [18F]FDG-PET a valid alternative to conventional diagnostic methods? **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, n 2, p. 414-419, 2001.

SPECHT, L. 2-[18F]fluoro-2-deoxyglucose positron-emission tomography in staging, response evaluation, and treatment planning of lymphomas. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 17, n. 3, p. 190-197, 2007.

SPECHT, K.; RICHTER, T.; MULLER, U.; WALCH, A.; WERNER, M.; HOFER, H. Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue. **American Journal of Pathology**, v. 158, n. 2, p:419–429, 2001.

SONG, M.K.; CHUNG, J.S.; SUNG-YONG, O.; LEE, G.W.; KIM, S.G.; SEOL, Y.M.; SHIN, H.J.; CHOI, Y.J.; CHO, G.J.; SHIN, D.H.; YUN, E.Y. Clinical impact of bulky mass in the patient with primary extranodal diffuse large B cell lymphoma treated with R-CHOP therapy. **Annals of Hematology**, v. 89, n. 10, p. 985-991, 2010.

SCORSATO, A.P.; TELLES, J.E.Q. Fatores que interferem na qualidade do DNA extraído de amostras biológicas armazenadas em blocos de parafina Factors that affect the quality of DNA extracted from biological samples stored in paraffin blocks. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 5, p: 541-548, 2011.

SPICER, J.; SMITH, P.; MACLENNAN, K.; HOSKIN, P.; HANCOCK, B.; LINCH, D.; PETTINGELL, R. Long-term follow-up of patients treated with radiotherapy alone for early-stage histologically aggressive non-Hodgkin's lymphoma. **British Journal of Cancer**, v. 90, p. 1151-1155, 2004.

SRINIVASAN, M.; SEDMAK, D.; JEWELL, S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. **American Journal of Pathology**, v. 161, p:1961–1971, 2002.

STANSFELD, A.G.; DIEBOLD, J.; NOEL, H.; KAPANCI, Y.; RILKE, F.; KELÉNYI, G.; SUNDSTROM, C.; LENNERT, K.; VAN UNNIK, J.A.; MIODUSZEWSKA, O.; NOEL, H.; RILKE, F.; SUNDSTROM, C.; VAN UNNIK, J.A.M.; WRIGHT, D.H.. Updated Kiel classification for lymphomas. **The Lancet**, v. 1, n. 8580, p: 292-3, 1988.

TAKAHASHI, S.; LEISS, M.; MOSER, M., OHASHI, T.; KITAO, T.; HECKMANN, D.; PFEIFER, A.; KESSLER, H.; TAKAGI, J.; ERICKSON, H.P.; FÄSSLER, R. The RGD motif in fibronectin is essential for development but dispensable for fibril assembly. **The Journal of Cell Biology**, v. 178, n. 1, p. 167-178, 2007.

TERASAWA T, LAU J, BARDET S, COUTURIER O, HOTTA T, HUTCHINGS M, NIHASHI T, NAGAI H. Fluorine-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography for interim response assessment of advanced-stage Hodgkin's lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma: a systematic review. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 11, p. 1906-1914, 2009.

TAYLOR, R.P.; LINDORFER, M.A. Drug insight: the mechanism of action of rituximab in autoimmune disease--the immune complex decoy hypothesis. **Nature Clinical Practice, Rheumatology**, v. 3, n. 2, p: 86-95, 2007.

THE INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue**. Lyon, France, 2008.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 7, p: 1-12, 2002.

VAN KAMPEN, R.J.; CANALS, C.; SCHOUTEN, H.C.; NAGLER, A.; THOMSON, K.J.; VERNANT, J.P.; BUZYN, A.; BOOGAERTS, M.A.; LUAN, J.J.; MAURY, S.; MILPIED, N.J.; JOUET, J.P.; OSSENKOPPELE, G.J.; SUREDA, A. Allogeneic stem-cell transplantation as salvage therapy for patients with diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma relapsing after an autologous stem-cell transplantation: an analysis of the European Group for Blood and Marrow Transplantation Registry. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 10, p. 1342-8, 2011.

VITOLO, U.; ZUCCA, E.; MARTELLI, M.; CHIAPELLA, A.; BALDI, I.; BALZARROTTI, M.; CONCONI, A.; GOMEZ, H.; LOPEZ-GUILLERMO, A.; MARTINELLI, G.; ORSUCCI, L.; PAVONE, V.; ROSSI, G.; STORTI, S.; GOSPODAROWICZ, M.K.; CAVALLI, F.; SARRIS, A.H. Primary diffuse large B-cell lymphoma of the testis: a prospective study of rituximab (R)-CHOP with CNS and contralateral testis prophylaxis. Results of IELSG 10 study. **Blood**, v. 108, p. 208, 2006.

VON SMOLINSKI, D.; LEVERKOEHN, I.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; GRUBER, A.D. Impact of formalin-fixation and paraffin-embedding on the ratio between mRNA copy numbers of differently expressed genes. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 124, n. 2, p: 177-188, 2005.

WARREN, A.J.; COLLEDGE, W.H.; CARLTON, M.B.; EVANS, M.J.; SMITH, A.J.; RABBITTS, T.H. The oncogenic cysteine- rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development. **Cell**, n. 78, p. 45-57, 1994.

WILDER, R.B.; RODRIGUEZ, M.A.; HA, C.S.; PRO, B.; HESS, M.A.; CABANILLAS, F.; COX, J.D. Bulky disease is an adverse prognostic factor in patients treated with chemotherapy comprised of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone with or without radiotherapy for aggressive lymphoma. **Cancer**, v. 91, n. 12, p. 2440-2446, 2001.

WILSON, W.H.; DUNLEAVY, K.; PITTALUGA, S.; HEGDE, U.; GRANT, N.; STEINBERG, S.M.; RAFFELD, M.; GUTIERREZ, M.; CHABNER, B.A.; STAUDT, L.; JAFFE, E.S.; JANIK, J.E. 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. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 16, p. 2717-2724, 2008.

WINTER, J.N.; WELLER, E.A.; HORNING, S.J.; KRAJEWSKA, M.; VARIAKOJIS, D.; HABERMANN, T.M.; FISHER, R.I.; KURTIN, P.J.; MACON, W.R.; CHHANABHAI, M.; FELGAR, R.E.; HSIM E.D.; MEDEIROS L.J.; WEICK, J.K.; REED, J.C.; GASCOYNE, R.D. Prognostic significance of Bcl-6 protein expression in DLBCL treated with CHOP or R-CHOP: a prospective correlative study. **Blood**, v. 107, n. 11, p. 4207-4013, 2006.

WIRTH, A. The rationale and role of radiation therapy in the treatment of patients with diffuse large B-cell lymphoma in the Rituximab era. **Leukemia and Lymphoma**, v. 48, n. 11, p.: 2121-36, 2007.

YAMADA, Y.; PANNELL, R.; FORSTER, A.; RABBITTS, T.H. The oncogenic LIM-only transcription factor Lmo2 regulates angiogenesis but not vasculogenesis in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 97, p. 320- 324, 2000.

YE, B.H.; CATTORETTI, G.; SHEN, Q.; ZHANG, J.; HAWES, N.; DE WAARD, R.; LEUNG, C.; NOURI-SHIRAZI, M.; ORAZI, A.; CHAGANTI, R.S.; ROTHMAN, P.; STALL, A.M.; PANDOLFI, P.P.; DALLA-FAVERA, R. The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. **Nature Genetics**, v. 16, n. 2, p. 161-170, 1997.

ZERBINI, M.C.N.; SOARES, F.A.; MORAIS, J.C.; VASSALLO, J.; VELLOSO, E.D.R.P.; CHAUFAILLE, M.L.L.F.; CHIATTONE, C.S.; ALDRED, V.L.; SIQUEIRA, S.A.C.; ALVES, A.C.; CASTELLI, J.B.; OLIVEIRA, C.R.G.M.C.; MENEZES, Y.; PAES, R.P. Classificação dos tumores hematopoéticos e linfóides de acordo com a OMS: padronização da nomenclatura em língua portuguesa, 4ª edição. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 6, p. 643-648, 2011.

ZIEPERT M.; HASENCLEVER, D.; KUHNT, E.; GLASS, B.; SCHMITZ, N.; PFREUNDSCHUH, M.; LOEFFLER, M. Standard International prognostic index remains a valid predictor of outcome for patients with aggressive CD20+ B-cell lymphoma in the rituximab era. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 14, p. 2010.

ZUCCA, E.; CONCONI, A.; MUGHAL, T.I.; SARRIS, A.H.; SEYMOUR, J.F.; VITOLO, U.; KLASA, R.; OZSAHIN, M.; MEAD, G.M.; GIANNI, M.A.; CORTELAZZO, S.; FERRERI, A.J.; AMBROSETTI, A.; MARTELLI, M.; THIÉBLEMONT, C.; MORENO, H.G.; PINOTTI, G.; MARTINELLI, G.; MOZZANA, R.; GRISANTI, S.; PROVENCIO, M.; BALZAROTTI, M.; LAVEDER, F.; OLTEAN, G.; CALLEA, V.; ROY, P.; CAVALLI, F.; GOSPODAROWICZ, M.K.; INTERNATIONAL EXTRANODAL LYMPHOMA STUDY GROUP. Patterns of outcome and prognostic factors in primary large-cell lymphoma of the testis in a survey by the International Extranodal Lymphoma Study Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n.1 p. 20 – 27, 2003.

ANEXO A – Valores absolutos, média e mediana da expressão normalizada dos genes BCL6, LMO2, CCND2, BCL2, SCYA3 e FN1

Assinatura	CG	CG	CBA	CBA	CBA	Linfonodal
Amostra ¹	BCL6/ABL	LMO2/ABL	CCND2/ABL	BCL2/ABL	SCYA3/ABL	FN1/ABL
1*	8,181	5,594	17,202	1,763	2320,804	2,982
3	31,589	49,456	1,523	1,945	843,096	25,020
4	37,187	3,018	56,356	1,012	3353,353	8,743
6	6,664	1,783	17,043	2,467	511,560	4,156
7*	10,494	4,571	43,483	1,400	408,978	9,836
8	55,304	17,663	7,034	2,095	936,723	15,522
9	36,895	14,274	12,052	11,687	15699,7	68,787
10	22,598	33,452	5,643	NA	6000,59	9,771
12	1,110	NA	NA	NA	NA	NA
14	1,441	2,081	3,033	NA	321,321	NA
17	27,299	24,846	34,107	2,733	1203,614	26,815
18	35,088	47,012	4,222	1,660	3731,646	82,025
19	7,450	NA	NA	NA	153,346	3,464
20	30,167	40,872	14,136	5,429	6025,254	54,954
22**	6,663	3,300	2,019	0,912	376,945	64,703
25*	2,576	6,441	NA	NA	174,767	NA
27	18,009	17,338	21,616	7,313	842,454	84,742
34	75,058	65,440	4,502	0,427	3012,73	34,229
38	1,119	5,067	NA	NA	242,915	0,742
39	25,496	31,101	34,424	2,258	1762,897	8,204
41	40,980	46,309	6,156	8,529	1938,744	143,644
42	126,587	13,796	1,293	20,830	2055,827	42,777
43***	84,519	13,028	19,532	3,215	3906,494	13,979
45	32,131	17,178	6,403	1,405	1284,145	12,672
46	6,349	1,870	6,170	1,019	1560,284	NA
48	1,424	NA	NA	NA	NA	5,026
50	0,563	2,580	0,735	0,655	155,208	0,694
51*	0,735	1,437	NA	NA	59,290	3,032
56	12,985	2,192	19,285	3,130	2690,476	7,893
57	23,801	28,106	23,276	5,085	778,088	162,408
58	61,788	39,821	7,714	9,276	1312,543	27,347
59	47,295	14,905	22,855	3,147	2381,132	23,886
60	0,860	2,930	2,408	1,277	112,900	NA
62**	53,087	13,456	81,589	6,558	18067,47	14,665
63	35,441	13,611	6,195	0,566	2601,926	52,969
65	32,921	23,355	11,418	1,905	1125,947	108,090
66	6,305	NA	9,895	2,944	510,489	7,027
67	25,681	17,259	44,189	4,354	664,992	15,308
68	20,260	28,612	13,786	1,011	350,289	3,612
69	26,053	95,402	6,398	1,032	1358,238	186,781
70	12,292	7,899	12,797	2,447	464,105	41,656
71	14,701	10,690	8,446	0,287	3762,136	61,823
Média	26,361	20,204	16,359	3,582	2376,587	38,919
Mediana	23,200	14,035	10,657	2,177	1243,88	15,522
Rendimento	100%	90,5%	85,7%	81%	95,2%	88,1%

¹A numeração das amostras seguiu o número original atribuído para a realização desse trabalho que partiu de uma casuística de 72 amostras. * Casos refratários primários. ** Óbitos durante o tratamento. *** Recaída precoce. CG: Centro germinativo. CBA: Células B ativadas. NA: Não avaliável.

ANEXO B – Valores absolutos, média e mediana da expressão normalizada dos genes BCL6, LMO2, CCND2, BCL2, SCYA3, FN1 na escala logarítmica na base 2

Assinatura	CG	CG	CBA	CBA	CBA	Linfonodal
	<u>Log(BCL6)</u>	<u>Log(LMO2)</u>	<u>Log(CCND2)</u>	<u>log(BCL2)</u>	<u>log(SCYA3)</u>	<u>log(FN1)</u>
Amostra ¹	log2	log2	log2	log2	log2	log2
1*	3,032	2,483	4,104	0,818	11,180	1,576
3	4,981	5,628	0,606	0,960	9,719	4,645
4	5,216	1,593	5,816	0,017	11,711	3,128
6	2,736	0,834	4,091	1,303	8,998	2,055
7*	3,391	2,192	5,442	0,486	8,675	3,298
8	5,789	4,142	2,814	1,067	9,871	3,956
9	5,205	3,835	3,591	3,546	13,938	6,104
10	4,498	5,064	2,496	NA	12,550	3,288
12	0,151	NA	NA	NA	NA	NA
14	0,527	1,057	1,600	NA	8,327	NA
17	4,770	4,634	5,092	1,450	10,233	4,744
18	5,132	5,554	2,078	0,731	11,865	6,357
19	2,897	NA	NA	NA	7,260	1,792
20	4,914	5,353	3,821	2,440	12,556	5,780
22**	2,736	1,722	1,013	-0,132	8,558	6,015
25*	1,365	2,687	NA	NA	7,449	NA
27	4,170	4,115	4,434	2,870	9,718	6,405
34	6,229	6,032	2,170	-1,227	11,556	5,097
38	0,162	2,341	NA	NA	7,924	-0,428
39	4,672	4,958	5,105	1,175	10,783	3,036
41	5,356	5,533	2,622	3,092	10,920	7,166
42	6,983	3,786	0,370	4,380	11,005	5,418
43***	6,401	3,703	4,287	1,685	11,931	3,805
45	5,005	4,102	2,678	0,490	10,326	3,663
46	2,666	0,903	2,625	0,027	10,607	NA
48	0,509	NA	NA	NA	NA	2,329
50	-0,828	1,367	-0,442	-0,609	7,278	-0,525
51*	-0,443	0,523	NA	NA	5,889	1,600
56	3,698	1,132	4,269	1,646	11,393	2,980
57	4,572	4,812	4,540	2,346	9,603	7,343
58	5,949	5,315	2,947	3,213	10,358	4,773
59	5,563	3,897	4,514	1,654	11,217	4,578
60	-0,217	1,551	1,267	0,353	6,818	NA
62**	5,730	3,750	6,350	2,713	14,141	3,874
63	5,147	3,766	2,631	-0,819	11,345	5,727
65	5,040	4,545	3,513	0,9298	10,136	6,756
66	2,656	NA	3,306	1,557	8,995	2,813
67	4,682	4,109	5,465	2,122	9,377	3,936
68	4,340	4,838	3,785	0,016	8,452	1,853
69	4,703	6,575	2,677	0,046	10,407	7,545
70	3,619	2,981	3,677	1,291	8,858	5,380
71	3,877	3,418	3,078	-1,800	11,877	5,950
Média	3,752	3,548	3,290	1,172	10,095	4,157
Mediana	4,535	3,810	3,410	1,121	10,279	3,956

¹A numeração das amostras seguiu o número original atribuído para a realização desse trabalho que partiu de uma casuística de 72 amostras. * Casos refratários primários. ** Óbitos durante o tratamento. *** Recaída precoce. CG: Centro germinativo. CBA: Células B ativadas. NA: Não avaliável.

ANEXO C – Novo Escore Genético de Prognóstico

Amostra ¹	Novo Escore Genético de Prognóstico (-1,27 x LMO2 log2) + (+1,39 x CCND2 log2)
1*	2,550
3	-6,304
4	6,061
6	4,626
7*	4,780
8	-1,349
9	0,120
10	-2,960
12	NA
14	0,882
17	1,191
18	-4,166
19	NA
20	-1,486
22**	-0,778
25*	NA
27	0,936
34	-4,643
38	NA
39	0,798
41	-3,382
42	-4,293
43***	1,256
45	-1,486
46	2,502
48	NA
50	-2,351
51*	NA
56	4,496
57	0,199
58	-2,653
59	1,324
60	-0,207
62**	4,064
63	-1,126
65	-0,889
66	NA
67	2,378
68	-0,883
69	-4,629
70	1,325
71	-0,062
Média	-0,118
Mediana	-0,062 (-6,304 a +6,061)

¹A numeração das amostras seguiu o número original atribuído para a realização desse trabalho que partiu de uma casuística de 72 amostras. * Casos refratários primários. ** Óbitos durante o tratamento. *** Recaída precoce. NA: Não avaliável.

ANEXO D – Características dos pacientes da casuística com LDGCB por subgrupos conforme a idade e comparação com os estudos MInT, LNH-98.5 e RICOVER-60

Idade	≤60 anos				>60 anos					
	Casuística		MInT		Casuística		LNH-98.5		RICOVER-60	
	N=21	%	N=413	%	N=21	%	N=202	%	N=306	%
Sexo masculino	7	33,3	257	62	10	47,6	92	46	168	55
Estado funcional										
0-1	12	57,1	411	99,9	19	90,5	157	78	263	86
≥2	9	42,9	2	<1	2	09,5	45	22	43	14
Estadia clínico										
I/II	8	38,1	300	73	8	38,1	41	20	154	50,3
III/IV	13	61,9	113	27	13	61,9	161	79	152	49,7
IPI										
Baixo	8	38,1	NR	NR	7	33,3	29	14	94	31
Intermediário baixo	3	14,3	NR	NR	6	28,6	64	32	89	29
Intermediário alto	6	28,6	NR	NR	4	19,0	78	39	78	25
Alto	4	19,0	NR	NR	4	19,0	31	15	45	15
IPIai										
Baixo	5	23,8	174	42	7	33,3	20	10	NR	NR
Intermediário baixo	3	14,3	239	58	7	33,3	61	30	NR	NR
Intermediário alto	6	28,6	0	0	5	23,8	87	43	NR	NR
Alto	7	33,3	0	0	2	09,5	34	17	NR	NR
RIPI										
Muito bom	5	23,8	NR	NR	0	00,0	NR	NR	NR	NR
Bom	6	28,6	NR	NR	13	61,9	NR	NR	NR	NR
Ruim	10	47,6	NR	NR	8	38,1	NR	NR	NR	NR
RC										
Total	14	70 ¹	304	86 ²	19	95	152	76	238	78
Se IPIai 0-1	8	100 ¹	304	86 ²	14	100	NR	NR	NR	NR
Mediana de seguimento (meses)	30	-	34	-	28	-	24	-	34,5	-
SG										
Total	-	81	-	93	-	84,2	-	70	-	78,1
Se IPIai 0-1	-	100	-	93	-	100	-	NR	-	NR
SLP										
Total	-	85,5	-	85	-	89,7	-	57	-	73,4
Se IPIai 0-1	-	100	-	85	-	100	-	NR	-	NR

¹A resposta foi avaliada nos 40 pacientes que concluíram o tratamento. ²A Resposta foi avaliada em 355 pacientes. LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B. IPI: Índice Internacional de Prognóstico. IPIai: Índice Internacional de Prognóstico ajustado para idade. RIPI: Índice Internacional de Prognóstico revisado para pacientes tratados com rituximabe. RC: Resposta complete. SG: Sobrevida global. SLP: Sobrevida livre de progressão. NR: Não reportado.

ANEXO E – Características dos pacientes com LDGCB tratados com R-CHOP por idade

Características	≤60 anos (%)	>60 anos (%)	<i>p value</i> ¹
Sexo masculino	33,3	47,6	0,351
Estadio Clínico III/IV	61,9	61,9	1
Sítio extranodal ≥ 2	33,3	23,8	0,499
<i>Bulky</i> ≥ 10cm	33,3	23,8	0,499
Estado funcional ≥ 2	42,9	9,5	0,0152
Sintomas B presentes	57,1	52,4	0,759
DHL sérica > 1 x normal	66,7	38,1	0,067
Albumina sérica < 1x normal	0,0	20	0,0374
β2-microglobulina > 1 x normal	84,6	93,3	0,465
IPI			
Baixo	38,1	33,3	0,893
Intermediário baixo	14,3	28,6	
Intermediário alto	28,6	19,1	
Alto	19,1	19,1	
IPI adaptado			
Baixo	42,4	61,9	0,537
Alto	47,7	38,1	
RIPI			
Muito bom	23,8	0,0	0,496
Bom	28,6	61,9	
Ruim	47,6	38,1	
RC	70,0	95,0	0,039
Cluster-CG	52,6	73,7	0,184
Cluster-NCG	37,4	26,3	
Novo escore genético			
<2,5	75,0	84,2	0,503
≥2,5	25,0	16,8	

¹Teste de *Mantel-Haenszel*. LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B. R-CHOP: rituximabe, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona. DHL: Desidrogenase láctica. IPI: Índice Internacional de Prognóstico. RIPI: Índice Internacional de Prognóstico revisado para pacientes tratados com rituximabe. RC: Resposta completa. CG: Centro germinativo. NCG: Não centro germinativo.