Abrahão Elias Hallack Neto

**Estudo observacional do prognóstico e terapêutica dos
portadores de linfoma difuso de grandes células B de
IPla de risco intermediário alto e alto**

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

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

Orientadora: Dra. Juliana Pereira

São Paulo

2007

Dedicatória

“Uma pessoa só pode ser realmente feliz se enxergar sua própria vida como um serviço, e tiver um objetivo definitivo para além de si mesma e de sua felicidade pessoal”.

Liév Tolstói

Agradecimentos

À Dra. Juliana Pereira pelo incentivo, orientação e, principalmente, pela incansável caminhada ao meu lado, com dedicação, competência e paciência, ensinando-me a percorrer a trilha da ciência, pelo simples prazer de formar e orientar.

À Dra. Sheila cuja participação foi essencial para a realização deste trabalho e para quem não existem palavras que traduzam minha gratidão.

Ao Prof. Dalton de Alencar Fischer Chamone pela oportunidade e incentivo na realização deste trabalho.

Aos médicos assistentes do HC-FMUSP que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta tese, em especial à Dra. Elvira e Dr. Luis Fernando.

Às professoras Maria Luiza e Maria Mercês por toda a atenção e delicadeza.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram nessa longa e importante caminhada.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	
LISTA DE FIGURAS.....	
LISTA DE ABREVIATURAS	
RESUMO	
SUMMARY	
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	8
2.1 – <i>Classificação</i>	8
2.2 – <i>Estratificação de risco clínica</i>	13
2.2.1 – <i>Estratificação Clínica</i>	13
2.2.2 – <i>Valor prognóstico da tomografia por emissão de positron</i>	22
2.3 – <i>Estratificação Biológica</i>	25
2.4 – <i>Tratamento</i>	34
2.4.1 – <i>Quimioterapia</i>	34
2.4.2 – <i>Imunoterapia</i>	38
2.4.3 – <i>Transplante de medula óssea</i>	43
3. OBJETIVOS.....	54
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	55
4.1 – <i>Pacientes</i>	55
4.2 – <i>Diagnóstico anatomopatológico e imuno-histoquímico</i>	57
4.3 – <i>Método imuno-histoquímico</i>	58
4.4 – <i>Exames iniciais e estadiamento</i>	60
4.5 – <i>Avaliação prognóstica</i>	61
4.6 – <i>Protocolos de tratamento</i>	61
4.7 – <i>Avaliação de resposta e acompanhamento seqüencial</i>	65
4.8 – <i>Análise estatística</i>	66
5. RESULTADOS.....	68
5.1 – <i>Características clínico-laboratoriais</i>	68
5.2 – <i>Características imuno-histoquímicas</i>	70
5.3 – <i>Avaliação da terapia de primeira linha</i>	80
5.4 – <i>Avaliação dos fatores de prognóstico</i>	86
5.4.1 – <i>Fatores clínico-laboratoriais</i>	86
5.4.2 – <i>Marcadores Imuno-histoquímicos</i>	106
5.4.3 – <i>Modelo Imuno-histoquímico</i>	120
5.4.4 – <i>Análise multivariada</i>	122
6. DISCUSSÃO.....	124
6.1 – <i>Tratamento</i>	124
6.2 – <i>Avaliação de Prognóstico</i>	129
6.2.1 – <i>Fatores clínico-laboratoriais</i>	129
6.2.2 – <i>Marcadores Imunológicos</i>	132
6.2.3 – <i>Modelo Imuno-histoquímico</i>	138
7. CONCLUSÕES	141
8. ANEXOS	143
9. REFERÊNCIAS.....	145

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos linfomas segundo a WF e OMS	11
Tabela 2 – Estadiamento de linfoma extralinfonodal primário*	15
Tabela 3 – Estado funcional.....	16
Tabela 4 – Fatores de risco de IPI para todas as idades	16
Tabela 5 – Fatores de risco de IPI ajustado para a idade	17
Tabela 6 – Classificação do grupo de risco segundo o IPIa.....	17
Tabela 7 – Subgrupos dos estádios I e II	18
Tabela 8 – Risco segundo IPI revisado para R-Chop.....	21
Tabela 9 – SLD e SG segundo IPI revisado com R-Chop.....	21
Tabela 10 – Biomarcadores de prognóstico	29
Tabela 11 – Classificação imunofenotípica dos LDGCB	58
Tabela 12 – Anticorpos utilizados	59
Tabela 13 – Critérios de toxicidade.....	64
Tabela 14 – Características clínicas dos 82 pacientes avaliados	69
Tabela 15 – Características clínicas dos 53 pacientes em RC após quimioterapia.....	70
Tabela 16 – Marcadores imuno-histoquímicos nos 73 pacientes	71
Tabela 17 – Origem celular.....	77
Tabela 18 – Características clínicas segundo a origem celular.....	78
Tabela 19 – Distribuição dos marcadores dos 47 pacientes em RC após quimioterapia	79
Tabela 20 – Origem celular dos 47 pacientes em RC após quimioterapia	79
Tabela 21 – Principais toxicidades relacionadas ao ATMO.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estadiamento de Ann Arbor	14
Figura 2 – PET-FDG, demonstrando LDGCB com captação acima e abaixo do diafragma.....	22
Figura 3 – Eventos fisiopatológicos em LDGCB - adaptado de Lossos e Morgensztern, 2006.....	26
Figura 4 – Estrutura do folículo secundário.....	27
Figura 5 – Fluxograma de tratamento dos 53 pacientes em RC	63
Figura 6 – Lâmina de IH, demonstrando expressão positiva de CD10 em 10% ou mais células (caso ilustrativo)	72
Figura 7 – Lâmina de IH, demonstrando expressão positiva de CD10 em 50% ou mais células.....	72
Figura 8 – Lâmina de IH, demonstrando expressão positiva de Bcl-6 em 10% ou mais células.....	73
Figura 9 – Lâmina de IH, demonstrando expressão positiva de Bcl-6 em 50% ou mais células.....	73
Figura 10 – Lâmina de IH, demonstrando expressão positiva para MUM-1 em 10% ou mais células.....	74
Figura 11 – Lâmina de IH, demonstrando expressão positiva para MUM-1 em 50% ou mais das células	74
Figura 12 – Lâmina de IH, demonstrando expressão positiva de Bcl-2 em 10% ou mais células.....	75
Figura 13 – Lâmina de IH, demonstrando expressão positiva de Bcl-2 em 50% ou mais células.....	75
Figura 14 – Lâmina de IH, demonstrando expressão positiva de p63 em 10% ou mais células.....	76
Figura 15 – Lâmina de IH, demonstrando expressão positiva de p63 em 50% ou mais células.....	76
Figura 16 – Taxa de remissão completa dos 82 pacientes avaliados.....	80
Figura 17 – Sobrevida global dos 82 pacientes avaliados.....	81
Figura 18 – Sobrevida livre de doença dos 82 pacientes avaliados	82
Figura 19 – Sobrevida global após RC com ou sem ATMO	83
Figura 20 – Sobrevida livre de doença após RC com ou sem ATMO.....	84
Figura 21 – Taxa de recidiva por grupo de tratamento.....	85
Figura 22 – Taxas de remissão completa em relação ao sexo.....	87
Figura 23 – Sobrevida global em relação ao sexo	87
Figura 24 – Sobrevida livre de doença em relação ao sexo	88
Figura 25 – Taxas de remissão completa em relação aos sintomas B.....	89
Figura 26 – Sobrevida global em relação aos sintomas B.....	89
Figura 27 – Sobrevida livre de doença em relação aos sintomas B	90

Figura 28 – Taxas de remissão completa em relação ao estágio clínico.....	91
Figura 29 – Sobrevida global em relação ao estágio clínico.....	91
Figura 30 – Sobrevida livre de doença em relação ao estágio clínico	92
Figura 31 – Taxa de remissão completa em relação à presença de <i>Bulky</i>	93
Figura 32 – Sobrevida global em relação à presença de <i>Bulky</i>	94
Figura 33 – Sobrevida livre de doença em relação à presença de <i>Bulky</i>	94
Figura 34 – Taxas de remissão completa em relação ao acometimento extralinfonodal	95
Figura 35 – Sobrevida global em relação ao acometimento extralinfonodal.....	96
Figura 36 – Sobrevida livre de doença em relação ao acometimento extralinfonodal	96
Figura 37 – Taxas de remissão completa em relação ao acometimento da medula óssea.....	97
Figura 38 – Sobrevida global em relação ao acometimento da medula óssea	98
Figura 39 – Sobrevida livre de doença com relação ao acometimento da medula óssea.....	99
Figura 40 – Taxas de remissão completa em relação à dosagem de DHL.....	100
Figura 41 – Sobrevida global em relação à dosagem de DHL	100
Figura 42 – Sobrevida livre de doença em relação à dosagem de DHL.....	101
Figura 43 – Remissão completa em relação ao IPIa	102
Figura 44 – Sobrevida global em relação ao IPIa.....	102
Figura 45 – Sobrevida livre de doença em relação ao IPIa	103
Figura 46 – Sobrevida global dos 82 pacientes em relação ao ATMO em primeira RC	104
Figura 47 – Sobrevida livre de doença dos 82 pacientes em relação ao ATMO em primeira RC	104
Figura 48 – Sobrevida global em relação à resposta ao primeiro tratamento.....	105
Figura 49 – Taxas de remissão completa em relação à presença de CD10.....	107
Figura 50 – Sobrevida global em relação à presença de CD10	107
Figura 51 – Sobrevida livre de doença em relação à presença de CD10	108
Figura 52 – Taxas de remissão completa em relação à presença de Bcl-6.....	109
Figura 53 – Sobrevida global em relação à presença de Bcl-6	109
Figura 54 – Sobrevida livre de doença em relação à presença de Bcl-6.....	110
Figura 55 – Remissão completa em relação à presença de MUM-1.....	111
Figura 56 – Sobrevida global em relação à presença de MUM-1	111
Figura 57 – Sobrevida livre de doença em relação à presença de MUM-1	112
Figura 58 – Remissão completa em relação à presença de Bcl-2.....	113
Figura 59 – Sobrevida global em relação à presença de Bcl-2	114
Figura 60 – Sobrevida livre de doença em relação à presença de Bcl-2	115
Figura 61 – Remissão completa em relação à presença de p63.....	116
Figura 62 – Sobrevida global em relação à presença de p63.....	117
Figura 63 – Sobrevida livre de doença em relação à presença de p63	118

Figura 64 – Sobrevida global em relação à expressão de p63, utilizando ponto de corte de 50% de células positivas	119
Figura 65 – Sobrevida livre de doença em relação à expressão de p63, utilizando ponto de corte de 50% de células positivas	119
Figura 66 – Taxas de remissão completa para os originados no CG e NCG	120
Figura 67 – Sobrevida global para os originados no CG e NCG	121
Figura 68 – Sobrevida livre de doença para os originados no CG e NCG	122

LISTA DE ABREVIATURA

ABMTR - Registro de Transplante de Medula e Sangue Autoplástico

ACVBP – Doxorrubicina, ciclofosfamida, vindesina, bleomicina e prednisona

AcMo – Anticorpo monoclonal

AloTMO – Transplante de medula óssea alogênico

ATMO – Transplante de Medula Óssea Autoplástico

BEAM – Carmustina, etoposide, ara-C, melfano

CBA – Células B ativadas

CBV – Ciclofosfamida, carmustina e etoposide

CG – Centro germinativo

CCG – Células do centro germinativo

CHOP – Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Vincristina e Prednisona

CHOPE – Ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina, prednisona e etoposide

COP-BLAM IV – Ciclofosfamida, vincristina, prednisona, bleomicina, doxorrubicina, procarbazona

DECH – Doença do enxerto contra o hospedeiro

DICEP – Ciclofosfamida, etoposide e cisplatina

DHAP – Dexametasona, cisplatina e citarabina

DHL – Desidrogenase Láctea

EC – Estádio clínico

EBMT – Grupo Europeu para Transplante de Medula e Sangue

EL – Extralinfonodal

EMA – Antígeno epitelial de membrana

EPOCH – Etoposide, vincristina, doxorrubicina, ciclofosfamida e prednisona

ESHAP – Etoposide, metilprednisolona, citarabina, cisplatina

FDG – Fluorodeoxiglicose

G-CSF – Fator de crescimento de granulócitos

GELA – Grupo de Estudo de Linfoma Agressivo

HC-FMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HIV – Vírus da imunodeficiência humana adquirida

HTLV-I – Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo I

IBMTR – Registro Internacional de Transplante de Medula Óssea

ICE – Ifosfamida, carboplatina e etoposide

IFM – Ifosfamida

IH – Insuficiência hepática

IPI – Índice Internacional de prognóstico

IPIa – Índice Internacional de prognóstico ajustado para a idade

IR – Insuficiência renal

IVACm – IVAC modificado

IVACm – Ifosfamida, alta dose de citarabina e etoposide

LB – Linfoma de Burkitt

LCM – Linfoma de células do manto

LF – Linfomas folicular

LDGCB – Linfoma difuso de grande célula B

LGCBM – Linfoma de células B mediastinal

LH – Linfoma de Hodgkin

LLA – Leucemia linfóide aguda

LLC – Leucemia linfocítica crônica

LNH – Linfoma não-Hodgkin

LNH-84 – Doxorrubicina, ciclofosfamida, vindesina, bleomicina, prednisona e metotrexate

MACOP-B – Metotrexate, doxorrubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona e bleomicina

m-BACOD – Metotrexate, bleomicina, adriamicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona

MO – Medula óssea

Mini-TMO – Transplante não mieloablativo

MIME – Etoposide, metotrexate e ifosfamida

NCG – Origem após centro germinativo

NK – Natural *killer*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PET – Tomografia por emissão de pósitron

PET-FDG – Tomografia por emissão de pósitron com fluorodeoxiglicose

ProMACE-CytaBOM – Prednisona, ciclofosfamida, adriamicina, etoposide, citarabina, bleomicina, vincristina e metotrexate

QAD – Quimioterapia em alta dose

QT – Quimioterapia

REAL – Estudo Europeu/Americano de linfoma

RC – Remissão completa

R-CHOP – Rituximabe, Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Vincristina e Prednisona

RG – Resposta geral

R-ICE – Rituximabe, ifosfamida, carboplatina e etoposide

RP – Remissão parcial

RR – Risco relativo

SG – Sobrevida global

SLD – Sobrevida livre de doença

SLE – Sobrevida livre de evento

SLF – Sobrevida livre de falência

SLP – Sobrevida livre de progressão

SLR – Sobrevida livre de recidiva

SNC – Sistema nervoso central

SP – Sangue periférico

TBI – Irradiação Corporal Total

TC – Tomografia computadorizada

TGI – Trato gastrointestinal

TMO – Transplante de medula óssea

WF – Working Formulation

VP16 – Etoposide

RESUMO

Hallack Neto AE. *Estudo observacional do prognóstico e terapêutica dos portadores de linfoma de grandes células B de IPIa de risco intermediário alto e alto*. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Pacientes com linfoma difuso de grande célula B (LDGCB) do mesmo grupo de risco pelos critérios do Índice de Prognóstico Internacional (IPI), tratados com quimioterapia convencional à base de antraciclina, podem ter resposta terapêutica não esperada para seu grupo de risco. Isso pode ser explicado pelo fato do prognóstico dos LDGCB, que têm origem no centro germinativo (CG), ser superior aos originados após o CG (NCG). No intuito de aprimorar a avaliação de prognóstico e a abordagem terapêutica em LDGCB de IPI ajustado para a idade (IPIa) de risco intermediário alto e alto, elaboramos projeto de pesquisa, para verificar o papel dos marcadores imuno-histoquímicos (IH) e do transplante de medula óssea autólogo (ATMO), em primeira remissão completa (RC), neste grupo de pacientes. Avaliamos o impacto da expressão dos marcadores CD10, Bcl-6, MUM-1, Bcl-2 e p63 na obtenção de RC, sobrevida livre de doença (SLD) e sobrevida global (SG), isoladamente e de acordo com a origem em CG e NCG. Avaliamos 82 pacientes abaixo dos 60 anos, dos quais 16 (19,5%) receberam ATMO em primeira RC, além de serem comparados com os pacientes tratados com quimioterapia convencional e mantidos em observação após RC. A IH foi avaliável em 73 casos, 24 (32,9%) tiveram origem no CG e 49 (67,1%) NCG,

sem diferença de sobrevida entre os grupos. A proteína Bcl-2 foi positiva em 27 (37%) pacientes e foi o único fator preditivo independente para SG à análise multivariada, com tendência de significância para RC. As SG e SLD em cinco anos para os 16 pacientes que receberam ATMO foi de 75% e 85,2%, respectivamente, a taxa de recidiva de 6,5% e diferença estatisticamente significativa para SLD ($p = 0,015$) em comparação aos pacientes apenas observados. Concluimos que o ATMO foi seguro e capaz de melhorar a sobrevida em LDGCB de risco intermediário alto e alto, e que a expressão de Bcl-2 pode ser utilizada na programação terapêutica inicial desses pacientes.

Descritores: 1.Linfoma de células B 2.Marcadores biológicos de tumor 3.Transplante de medula óssea 4.Prognóstico 5-Sobrevida

SUMMARY

Hallack Neto AE. *Observational Study of prognosis and therapeutics of Diffuse Large B Cell Lymphoma patients with high intermediate to high aIPI risk*. [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2007.

Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) patients from the same risk group according to the International Prognostic Index (IPI) treated with conventional anthracycline-based chemotherapy may show an unexpected therapeutic response. This can be explained by the fact that the prognosis of DLBCL originating in germinal center (GC) cells is superior than that originating out of germinal center (NGC). In order to improve the prognostic evaluation and the therapeutic approach to DLBCL patients with high intermediate to high age-adjusted IPI (aIPI), a research project was designed for the analysis of immunohistochemical markers and the role of autologous stem cell transplantation (ASCT) in first complete remission (CR) for this group of patients. The impact of the expression of CD10, Bcl-6, MUM-1, Bcl-2 and p63 markers on complete remission (CR), disease-free survival (DFS) and overall survival (OS), either individually and according to cell origin was evaluated by means of immunohistochemistry. Eighty-two patients aged under 60 years old were assessed, of which 16 (19.5%) underwent ASCT in first CR and were compared to patients receiving conventional chemotherapy and being monitored after CR. Immunohistochemistry was assessable in 73 cases, 24 (32.9%) being classified as GC-type and 49 (67.1%) as NGC-type, with no survival difference between the two groups. Bcl-2 expression was found in

37% (27) of the patients and was the single independent predicting factor of OS prognosis according to multivariate analysis. A significant tendency of expression of this protein was also observed for achieving CR, which was essential for longer survival, as shown by multivariate analysis. OS and DFS within 5 years were of 75% and 85.2% respectively for the group of 16 patients treated with ASCT, which resulted in lower relapse rates (6.5%) with statistically significant difference for DFS ($p=0.015$) when compared to the group of patients who achieved CR and was kept under monitoring. In this study ASCT was found to be a safe procedure for improving survival rates of DLBCL patients with high intermediate to high aPI risk. Also, the expression of Bcl-2 protein was found to be useful as one of the variables to be analysed in the therapeutic approach to these patients.

Descriptors: 1.Lymphoma, B-cell 2.Tumor markers biological 3.Bone marrow transplantation 4.Prognosis 5.Survivorship (Public Health)

1. INTRODUÇÃO

O Linfoma difuso de grande célula B é uma doença clínica e biologicamente heterogênea. Como em outros tipos de câncer, sua patogênese envolve um processo de múltiplas etapas, com acúmulo de várias lesões genéticas e moleculares e seleção de clone maligno. Atualmente, várias dessas etapas são conhecidas, mas outras permanecem desconhecidas.

O linfoma não-Hodgkin (LNH) é a quinta forma mais comum de neoplasia maligna no Brasil, com incidência estimada em 55000 casos/ano e mais de 26000 mortes (Bigni, 2004). No município de São Paulo, a incidência, em 1998, foi de 12,2/100.000 (Mirra et al., 2001). Nos Estados Unidos, a incidência abaixo dos 65 anos de idade é de 8,5 casos/100000 habitantes e de 69 casos/100000 habitantes acima dos 65 anos de idade. A proporção entre homens e mulheres é de 1,8 abaixo dos 65 anos e de 1,3 acima dos 65 anos (Rabkin et al., 1997).

Nos idosos, predomina o subtipo indolente, composto por células imunologicamente maduras; e, nos jovens, o agressivo, de células imaturas (Rabkin et al., 1997). Um dos subtipos de linfoma indolente, o linfoma folicular (LF), incide mais nos países do leste. O LDGCB é o subtipo agressivo mais freqüente, correspondendo a 50% dos LNH, exceto no sudeste asiático, onde os de fenótipo T correspondem a 50% dos casos. O menor número de LF e a maior prevalência do vírus linfotrópico de célula T

humana do tipo I (HTLV-I), nessas regiões, explicam, parcialmente, essa diferença. A incidência geral de LNH é menor nos países asiáticos, no Japão e na China, há 2 a 3,5 casos por 100000 habitantes (Shih, Liang, 1991).

Os LNH podem ter origem linfonodal ou extralinfonodal. O primeiro predomina em adultos, e o segundo na infância, com sítio extralinfonodal mais comum, o trato gastrointestinal (TGI). A manifestação clínica varia com o subtipo, o local de origem e a disseminação. Comumente, há linfadenomegalia localizada ou generalizada, podendo haver derrame cavitário, comprometimento de seio paranasal, testículo, mama, medula óssea (MO), síndrome de má absorção intestinal, presença de nódulo, placa e/ou úlcera em pele, sintoma neurológico por infiltração do sistema nervoso central (SNC) e manifestação auto-imune. A presença ou não de sintoma B (febre, sudorese e emagrecimento acima de 10% do peso corporal em seis meses) é importante no estadiamento e prognóstico (Carbone et al., 1971).

Em 1993, criou-se o IPI que estratificou os LNH em quatro grupos clínicos de prognóstico: risco baixo, intermediário baixo, intermediário alto e alto (The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993).

Na abordagem inicial do paciente com LNH, consideram-se a condição clínica, o grupo de risco de IPI e o subtipo anátomo-patológico. Nos últimos 40 anos, foram utilizadas várias classificações, inicialmente baseadas no tamanho, morfologia e padrão de crescimento da célula neoplásica e, gradativamente, foram adicionados dados de imunologia, clínica e molecular.

Os protocolos de tratamento de LDGCB combinam alquilante, antraciclina, alcalóide da vinca e corticóide. Atualmente, o esquema CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona) é o padrão (McKeelvey et al., 1976). Com o advento da imunoterapia, alguns autores preconizam a associação do anticorpo monoclonal (AcMo), anti-CD20 (Rituximabe), ao CHOP (R-CHOP) como esquema de primeira linha (Coiffier et al., 2002).

Com base na hipótese de Goldie e Coldman (1984), pela qual, aumentando o número e a intensidade de cada droga, haveria melhor resposta, vários pesquisadores propuseram protocolos mais agressivos. Entretanto, os chamados esquemas de segunda e de terceira geração não foram superiores ao CHOP, quando avaliadas as taxas RC, SLD e SG (Fisher et al., 1993 e Montserrat et al., 1996).

Dessa forma, o desafio atual é melhorar os índices de remissão e sobrevida dos pacientes com doença avançada (IPI de alto risco e intermediário alto), nos quais a SG permanece inferior a 30% (Kimby et al., 2001).

Pacientes refratários primários (não responsivos) ou com recidiva após esquemas com adriamicina, quando tratados com combinação de drogas diferentes das utilizadas inicialmente (esquema de resgate), têm 20% a 40% de probabilidade de obterem RC, mas com SG em 5 anos inferior a 10%. Quando os pacientes quimiossensíveis são submetidos à consolidação com quimioterapia em alta dose (QAD) e

restituição com célula tronco autóloga, a SG eleva-se para 46% (Philip et al., 1995).

Em estudo anterior, realizado no serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), observou-se predomínio de LDGCB, principalmente no sexo masculino (58,5%) e estágio precoce (estádio I e II). A sobrevida livre de recidiva (SLR) em dois e cinco anos foi de 72% e 59%, e a SG de 71% e 63%, respectivamente. Esse estudo, porém, não avaliou o protocolo quimioterápico utilizado, nem a QAD com resgate com célula tronco (Vecina, 2002).

Mais recentemente, outro estudo realizado no serviço de Hematologia do HC-FMUSP foi desenhado para avaliar RC, SLD e SG dos pacientes com idade inferior a 60 anos, portadores de LDGCB, comparando os esquemas CHOP e ProMACE-CytaBOM (prednisona, ciclofosfamida, adriamicina, etoposide, citarabina, bleomicina, vincristina e metotrexate). Observou-se que, nos pacientes de IPI ajustado para a idade (IPIa) de risco intermediário alto e alto, a SG foi de 54,8% em 60 meses, e a SLD de 46,6% em 60 meses, inferior à dos pacientes de baixo risco. A característica clínica de maior impacto para SG foi obter RC com o esquema de primeira linha ($p < 0,0001$), sem diferença para RC, SLD e SG entre os dois tratamentos (Hallack Neto, 2004).

Dos 81 pacientes que entraram em RC, 47 (58%) eram de risco baixo e intermediário, denominados de baixo risco adaptado. Apenas nesses, o IPIa e a obtenção de RC foram preditores independentes para SG à análise

multivariada. Como 58% dos refratários ou em recidiva precoce, avaliados quanto à terapia de resgate, eram de IPLa adaptado de alto risco, confirmou-se a necessidade da busca de terapêutica inicial mais eficaz para o grupo de prognóstico desfavorável, para melhorar a taxa de RC e reduzir a recidiva (Hallack Neto, 2004). Como menos de 50% dos pacientes de risco intermediário alto e alto são curados com terapia convencional, a realização de terapêutica experimental é apropriada.

Uma das possíveis formas de melhorar a resposta à terapêutica dos pacientes de risco intermediário alto e alto é o ATMO, que se mostrou eficaz como consolidação em primeira recidiva quimiossensível (Shipp et al., 1999).

O estudo LNH-87 é um dos melhores estudos randomizados, realizados em LNH agressivo de alto risco, utilizando consolidação com ATMO após quimioterapia seqüencial. Em uma população de 236 pacientes, que atingiram RC após indução, a consolidação com ATMO foi superior à quimioterapia seqüencial, com SLD e SG em oito anos de 55% contra 39% ($p=0,02$) e 64% contra 49%, respectivamente. A indução foi realizada com doxorubicina, ciclofosfamida, vinblastina e bleomicina e subsequente randomização para quimioterapia seqüencial (111 pacientes) ou consolidação com ATMO (125 pacientes). O condicionamento foi feito com ciclofosfamida, carmustina e etoposide (CBV), sem óbito por toxicidade em nenhum grupo. Portanto, o ATMO pode beneficiar pacientes de alto risco em RC (Haioun et al., 2000).

Outro estudo demonstrou que pacientes de alto risco, submetidos a ATMO, tiveram como fatores de prognóstico para SG e SLD a presença de

infiltração de MO, acometimento de mais de um sítio extralinfonodal e fenótipo T. Esses fatores devem ser considerados em estudos de terapia de manutenção pós-TMO (Mounier et al., 2004). Em pacientes de risco baixo e intermediário baixo, consolidado com ATMO, os únicos que se beneficiam dessa terapêutica são os que têm DHL elevada ao diagnóstico (Milpied et al., 2004).

Devido à existência de falha de detecção de categoria de risco de prognóstico do IPI, outras variáveis estão sendo estudadas. As mais avaliadas, atualmente, são a tomografia por emissão de positron (PET/CT) com fluorodeoxiglicose e o padrão de assinatura gênica da célula tumoral (Sчена, 1995; Quackenbush, 2001; Juweid, Cheson, 2005).

Após a introdução da técnica de análise de expressão gênica tumoral por *DNA microarray* (Sचना, 1995; Quackenbush, 2001), foram identificados subgrupos moleculares de LDGCB de acordo com o padrão de expressão gênica predominante. Verificou-se que os LDGCB com padrão de expressão gênica do CG são de melhor prognóstico do que aqueles com padrão de célula B ativada (CBA) ou pós CG, independentemente do IPI (Alizadeh et al., 2000; Chang et al., 2004).

Posteriormente, para universalizar o uso do critério de separação dos LDGCB em CG ou NCG, alguns autores tentaram encontrar o menor número de genes capazes de diferenciar os dois grupos. Baseado nesse grupo de genes, foram à procura de um painel mínimo de marcadores protéicos que pudessem ser pesquisados por imuno-histoquímica (IH) e que mantivessem a capacidade de diferenciar a origem dos LDGCB em CG e NCG. Durante a

pesquisa, foram feitas comparações entre as técnicas de DNA *microarray* e de IH. Entretanto, até o momento, não se conseguiu confirmar se os resultados obtidos por IH têm o mesmo significado prognóstico dos obtidos por *DNA microarray* (Chang et al., 2004).

Em resumo, apesar de, atualmente, se preconizar como tratamento de primeira linha para LDGCB a associação de Rituximabe à quimioterapia com antraciclina, não há estudo randomizado, comprovando o benefício do uso de Rituximabe em pacientes com idade inferior a 60 anos e IPIa de risco intermediário alto e alto (Sehn et al., 2007). Por outro lado, a consideração da condição sócio-econômica da população é imprescindível para o tratamento do câncer. Essa observação é essencial, quando constatamos que os estudos de avaliação de ATMO como consolidação foram realizados em países desenvolvidos e após quimioterapia seqüencial em altas doses.

Dessa forma, esse estudo foi formulado, para avaliar se o método de IH é capaz de separar os subgrupos de LDGCB de CG e CBA e o impacto prognóstico dessa subdivisão em pacientes de IPI de risco alto e intermediário alto. Concomitantemente, avaliamos se a consolidação com ATMO de pacientes em RC após CHOP é capaz de incrementar a sobrevida em LDGCB de risco alto e intermediário alto.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Classificação

Para os clínicos e patologistas, que trabalham com doença linfoproliferativa, a classificação dos LNH é uma contínua interrogação, pois, nos últimos 40 anos, várias foram formuladas. Foram utilizados parâmetros histopatológico, imunológico, molecular e clínico de acordo com a evolução tecnológica. Nas classificações iniciais, descreviam-se o linfossarcoma, reticulossarcoma, linfoma folicular gigante e doença de Hodgkin. Atualmente, existem vários subtipos de acordo com a morfologia, marcadores imunológicos e moleculares, genética, comportamento clínico, padrão de disseminação e resposta terapêutica.

Em 1950, Rappaport dividiu os linfomas pelo padrão de infiltração linfonodal nodular ou difuso e morfologia linfocitária (indiferenciado, bem diferenciado, pouco diferenciado ou histiocítico). Essa classificação foi muito utilizada, por ser simples e reprodutível, mas, com o avanço da imunologia, foi substituída por outras que incluíam o fenótipo celular como critérios classificatórios (Lee et al., 1999).

As classificações de Lukes e Collins (1974) e Lennert (1975) foram baseadas em morfologia e imunologia. As duas reconheciam a apresentação folicular como marca histológica da diferenciação do linfócito B e

individualizaram o LF pela morfologia da célula predominante: células do centro germinativo (CCG), grande ou pequena e clivada ou não clivada (Lee et al., 1999). A classificação de Lennert (1975) utilizava os termos centrocito e centroblasto para as CCG clivadas e não clivadas, respectivamente. A combinação de imunofenotipagem e morfologia identificavam a linhagem de origem da célula tumoral e o prognóstico clínico (Bloomfield et al., 1979).

Nos anos 80, para homogeneizar a linguagem mundial, o Instituto Nacional do Câncer Americano propôs a classificação da *Working-Formulation* (WF), que dividiu clinicamente os LNH em baixo, intermediário e alto grau (Tabela 1). Os de baixo grau – linfocítico difuso bem diferenciado, folicular de pequena célula clivada, folicular de pequena e grande célula – foram nomeados de A, B e C, respectivamente. Os de grau intermediário – folicular de grande célula, difuso de pequena célula clivada, difuso de grande e pequena célula e difuso de grande célula – receberam as letras D, E, F e G, respectivamente. Já os de alto grau – difuso de grande célula tipo imunoblástico, linfoblástico e Burkitt, de H, I e J, respectivamente. Essa classificação foi baseada na resposta ao tratamento e não na definição individual de doença (Working Formulation, 1982). A expectativa era que pacientes de baixo grau seriam incuráveis e tratados sem objetivo curativo, e os de grau intermediário e alto teriam potencial de cura e deveriam ser tratados com poliquimioterapia (Grogan et al., 1997).

O acompanhamento dos LNH de histologia favorável (baixo grau) por longo prazo evidenciou grande variabilidade na curva de sobrevida, sem evidência de platô, embora fossem tratados de maneira semelhante. Por

outro lado, alguns classificados como grau intermediário (histologia desfavorável) não curavam. Em até 25% dos casos, não houve concordância na classificação entre favoráveis e não favoráveis. Assim, essa classificação mostrou-se pouco reprodutível do ponto vista histológico e clínico (Grogan et al., 1997).

Nesse contexto, em 1994, o grupo de estudo de linfoma Europeu/Americano revisou todas as classificações e propôs outra denominada REAL, fundamentada na origem da célula neoplásica (B ou T) e no estágio de diferenciação da mesma (Harris et al., 1994). Um teste multiinstitucional do Grupo de Estudo de Linfoma Agressivo (GELA) mostrou que o fenótipo T estava associado a pior prognóstico em relação ao fenótipo B (Coiffier et al., 1990). Isso confirmou a importância clínica da distinção entre linhagem B e T. Os novos subtipos propostos pela REAL também apresentaram relevância terapêutica e de prognóstico, a exemplo do linfoma da zona marginal e de células do manto (LCM), que, antes, não eram diferenciados pela WF e passaram a ser tratados de maneira diferenciada e adequada (Grogan et al., 1997). Portanto, a classificação REAL identificou entidades clínicas distintas e reorganizou a nomenclatura em modelo de prognóstico mais apropriado para o uso clínico.

Pouco tempo depois, após avaliação de 1300 casos de LNH por hematopatologistas, a REAL foi reavaliada e atualizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Harris et al., 2000). Nessa classificação, o linfoma de baixo grau “A” da WF passou a corresponder ao linfoma linfocítico/leucemia linfocítica crônica (LLC), e os LF “B”, “C” e “D”, aos LF

grau 1, 2 e 3, respectivamente. O linfoma difuso de pequena célula clivada (“E”) foi caracterizado como linfoma de célula do manto (LCM), e o “F”, “G” e “H” como LDGCB (Tabela1).

Tabela 1 – Classificação dos linfomas segundo a WF e OMS

WF	OMS
A – Difuso de pequenos linfócitos	LLC/Linfoma linfocítico
B – Folicular com predomínio de pequena célula clivada	LF grau 1
C – Folicular de pequena e grande célula clivada	LF grau 2
D - Folicular de grande célula	LF grau 3
E – Difuso de pequena célula clivada	Linfoma de célula do Manto
F – Difuso de grande e pequena célula	LDGCB rico em célula T/Linfoma T periférico não especificado
G – Difuso de grande célula	LDGCB/Linfoma T periférico não especificado
H - Imunoblástico	LDGCB/Linfoma T periférico não especificado
I – Linfoblástico	Precursor B linfoblástico/ Precursor T linfoblástico
J - Pequena célula não clivada	Linfoma de Burkitt

Na classificação REAL/OMS, resolveram-se algumas questões relevantes. A leucemia linfóide aguda (LLA) e o linfoma linfoblástico foram considerados doenças da mesma célula progenitora, mas de diferente

apresentação. Da mesma forma, o linfoma de Burkitt (LB) e a LLA - L3, a LLC e o linfoma linfocítico. Definiu-se a forma de graduação do LF de acordo com a proporção de células grandes e de áreas difusas. O LB-*like* ficou como variante do LB (Harris et al., 2000).

Na OMS, as linfoproliferações foram divididas em B e T/NK, maduras ou imaturas. Os LNH B maduros e os T/NK foram agrupados, de acordo com a manifestação clínica, em disseminado/leucemizado e primário linfonodal ou extralinfonodal (Harris et al., 2000).

Do ponto de vista imunofenotípico, os LDGCB expressam marcadores pan-B CD19, CD20, CD22, CD79a e, em 50% a 75% dos casos, apresentam imunoglobulina (Ig) de superfície, e a expressão de CD30 ocorre na variante anaplásica. Pequeno número de casos expressa o antígeno T CD5, mas a ausência de ciclina D1 os distingue da forma blástica do LCM. Poucos expressam CD10+, marcador de LF (Abramson e Shipp, 2005).

A variante morfológica LDGCB, rico em células T, caracteriza-se pela elevada quantidade de célula T policlonal e por ter menos de 10% de célula B neoplásica (Abramson e Shipp, 2005).

De acordo com o sítio primário, identificam-se as variantes clínicas B mediastinal (LGCBM), intravascular e de efusão. O LGCBM apresenta-se com massa mediastinal esclerosante e em mulheres jovens. Expressa marcadores pan-B, tem rearranjo clonal de genes de Ig à semelhança do LDGCB e pode expressar CD30, à semelhança do linfoma de Hodgkin (Abramson e Shipp, 2005).

A avaliação da heterogeneidade intraclonal, na região variável do gene da Ig, demonstrou haver dois subgrupos de LDGCB, de acordo com a presença ou ausência desta mutação. Dessa forma, o LDGCB foi dividido em linfoma de células do CG ou pós-centro germinativo (Lossos, 2005). Estudos de DNA *microarray* confirmaram a existência de LDGCB do CG, NCG e de um subtipo com expressão gênica mista de genes do CG e de CBA (Lossos, 2005).

Frequentemente, o LDGCB de célula grande clivada associa-se ao fenótipo do CG (CD10+), IPI de risco baixo e intermediário baixo e idade inferior a 60 anos, enquanto os de morfologia do tipo imunoblástico associam-se ao fenótipo pós CG (MUM-1+) e predominam acima dos 70 anos, confirmando a existência de duas formas clínico-patológicas distintas dentro do LDGCB, como anteriormente descritas na WF (De Paepe et al., 2005).

2.2 – Estratificação de risco clínica

2.2.1 – Estratificação Clínica

O estadiamento do LNH baseia-se nos critérios de Ann Arbor, desenvolvido para LH. O estadiamento determina a extensão da doença, o prognóstico e direciona o tratamento. Nesse sistema, os LNH são divididos

em quatro estádios: (I) uma única cadeia de linfonodo acometida, (II) duas ou mais cadeias do mesmo lado do diafragma, (III) duas ou mais cadeias nos dois lados do diafragma e (IV) infiltração não contígua de órgãos não linfóides (fígado, SNC, pulmão e MO) (Figura 1). A presença de febre, sudorese ou emagrecimento acima de 10% do peso corporal em seis meses, define sintomas B (Carbone et al., 1971).

Figura 1 – Estadiamento de Ann Arbor

Como o LH e LNH são doenças diferentes, o estadiamento de Ann Arbor é menos acurado na estratificação de prognóstico em LNH. Uma das diferenças é a maior frequência de apresentação extralinfonodal no LNH. Em 1997, o Grupo Nórdico de Linfoma propôs um sistema modificado de estadiamento para linfoma extralinfonodal, definindo seis estádios clínicos pelo acometimento de um ou mais sítio ou linfonodo e pela localização de acordo com o diafragma (Tabela 2).

*Tabela 2 – Estadiamento de linfoma extralinfonodal primário**

Estádio	Definição
Pe I	Primário de tecido ou órgão extralinfonodal
Pe Ie	Primário de tecido ou órgão EL invadindo outro tecido ou órgão
Pe II1	Primário EL com disseminação para linfonodo regional
Pe II1e	Primário EL com disseminação para linfonodo regional e outro órgão
Pe II2	EL disseminando para linfonodo não regional do mesmo lado do diafragma
Pe II2e	EL disseminando para linfonodo não regional do mesmo lado do diafragma e invasão de outros tecidos e/ou órgãos

* Adotado do Grupo Nórdico de linfoma, 1997

A presença de sintoma B, o estágio clínico, o volume tumoral, o nível de desidrogenase láctica (DHL), β -2 microglobulina, o número de sítio extralinfonodal, idade e a condição clínica do paciente influenciam o prognóstico. Em 1993, foi proposto o Índice de prognóstico Internacional, dividindo quatro grupos de risco (baixo, intermediário baixo, intermediário alto e alto risco) (The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993).

Esse índice valoriza o estado funcional do paciente (Tabela 3), o estágio clínico, DHL, número de sítio EL envolvido e a idade do paciente (Tabela 4). Pode ser adaptado para menores de 60 anos, considerando-se o estado funcional, DHL e estágio (Tabelas 5 e 6).

Tabela 3 – Estado Funcional

Estado funcional	Escala
Assintomático	0
Sintomático, mas capaz de exercer atividades habituais	1
Sintomático, limitado ao leito menos de 50% do dia	2
Sintomático, limitado ao leito mais de 50% do dia	3
Limitado ao leito, pode ser necessário hospitalização	4
Morte	5

Tabela 4 – Fatores de risco de IPI para todas as idades

Variável	Adversidade	Pontos
Estádio	III e IV	1
Estado funcional	>1	1
DHL	> 1 x valor normal	1
Idade	> 60 anos	1
Extralinfonodal	>1 sítio	1

Tabela 5 – Fatores de risco de IPI ajustado para a idade

Variável	Adversidade	Valor
Estádio Ann Arbor	III e IV	1 ponto
Estado funcional	Maior que 1	1 ponto
DHL	>1 x valor normal	1 ponto

Tabela 6 – Classificação do grupo de risco segundo o IPIa

Risco	Baixo	Intermediário	Intermediário alto	Alto
Pontos	0	1	2	3

Pacientes de risco intermediário alto e alto têm sobrevida em cinco anos inferior a 50% com terapia convencional. Dessa forma, são alvos de terapia experimental como consolidação com ATMO, em função do elevado risco de recaída (The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993).

Pacientes com estágio I e II podem ser divididos em três subgrupos pela evolução clínica (Tabela 7). O primeiro compreende pacientes com doença muito limitada (estádios I e IE) que têm SG em cinco anos de 90%. Podem ser identificados por uma versão modificada do IPI por estágio clínico, utilizando-se das variáveis do IPI, mas considerando-se os estádios II e IIE como avançados.

Tabela 7 – Subgrupos dos estádios I e II

Estádio clínico / Descrição proposta	SG
I e IE / Muito limitada	>90%
II e IIE / Limitada	70%
II e IIE e bulky / Avançada	50%

Outro subgrupo inclui casos com estágio II e *bulky* (massa tumoral maior ou igual a 10 cm ou a 1/3 do diâmetro máximo do tórax). Anteriormente, considerados como doença limitada; atualmente, são reconhecidos como tendo prognóstico similar ao de doença avançada.

Pacientes com estágio II e *bulky*, avaliados durante 30 anos pelo grupo “Southwest Oncology”, apresentaram SG em cinco anos de 49%. Semelhante à dos pacientes com estágio III e IV, com SG de 46%, demonstrando que assim como os estádios III e IV, os II *bulky* devem ser categorizados como doença avançada. Evidência adicional de que pacientes com estágio II *bulky* devam ser tratados como doença avançada foi apresentada pelo GELA, que demonstrou SG de 82% para LDGCB II *bulky*, tratados agressivamente, contra 50% para os tratados com três ciclos de CHOP e radioterapia (Miller, 2004).

Pacientes com estágio II *bulky*, incluídos no estudo ECOG 1484, apresentaram menor RC, assim como, em nosso meio, em que esse grupo apresentou RC de 62,3% contra 86% no grupo sem *bulky* ($p=0,005$), independente do estágio clínico (Miller, 2004; Hallack Neto, 2004).

Em nossa casuística, pacientes de IPLa de risco intermediário alto e alto obtiveram SG de 54,8% e SLD de 46,6% em 60 meses, com diferença estatisticamente significativa em relação aos de baixo risco. A característica clínica de maior impacto na SG foi a obtenção de RC com esquema de primeira linha ($p < 0,0001$). Houve correlação entre IPLa e capacidade de obter RC, visto que dos 81 pacientes que entraram em RC, 47 (58%) eram de baixo risco adaptado. Além disso, apenas esses dois fatores foram preditores independentes para a SG à análise multivariada. Como 58% dos pacientes refratários ou com recidiva precoce, avaliados quanto à terapia de resgate, eram de IPLa de alto risco adaptado, confirmamos a relevância desse índice como preditor de resposta em nossa população (Hallack Neto, 2004).

O IPLa pode ser aplicado também para LDGCB refratário ou recidivado, tratados com quimioterapia de resgate pré ATMO, não havendo diferença entre os mesmos (Moskowitz et al., 2005). A resposta à quimioterapia de resgate e a capacidade de mobilização também influenciam as SG e SLD de pacientes submetidos a ATMO (Moskowitz et al., 2005; Pavone et al., 2006).

No intuito de demonstrar a aplicabilidade do IPLa em LDGCB refratário ou recidivado, submetidos à quimioterapia de resgate pré ATMO, foi proposto combinar as variáveis de risco do IPLa e a resposta à terapia de resgate pelo PET-CT, identificando-se quatro categorias de risco com SLF de 5% a 100% (Schot BW et al., 2006).

Os trabalhos clínicos que avaliaram o esquema R-CHOP demonstraram potencial limitado para utilizar fatores clínicos na avaliação de

prognóstico em LDGCB, tratado com imunoquimioterapia. Não houve benefício uniforme da associação de Rituximabe a todos os subgrupos de IPI. No estudo GELA, a estratificação pelo IPIa demonstrou que pacientes de baixo risco tiveram maior benefício da adição de Rituximabe do que os de alto risco. Análise multivariada dos fatores de prognóstico demonstrou que β -2 microglobulina acima de 3 mg/L e mais de um sítio extralinfonodal associam-se a pior prognóstico para SG (Feugier et al., 2005).

O estudo MinT avaliou o uso de R-CHOP em LDGCB abaixo dos 60 anos. A análise multivariada demonstrou impacto na curva de SLE para presença de *bulky* e de um ou mais fatores de risco do IPIa, mas sem diferença na SG (Pfreundschuh et al., 2006).

O papel do IPI na era da imunoquimioterapia ainda não foi determinado. A análise retrospectiva de 365 portadores de LDGCB, tratados com R-CHOP, com média de idade de 61 anos, evidenciou apenas três grupos de prognóstico (Sehn et al., 2007). A SG dos três grupos de risco desse IPI revisado variou de 55% a 94% (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8 – Risco segundo IPI revisado para R-CHOP

Risco	Muito Bom	Bom	Pobre
Pontos	0	1,2	3,4,5

Tabela 9 – SLD e SG segundo IPI revisado com R-CHOP

Risco	SLP	SG
Muito Bom	94%	94%
Bom	80%	79%
Pobre	53%	55%

Entretanto, no grupo de pior risco, os fatores do IPI não identificaram grupos de pacientes de sobrevida inferior a 50%. Para que esse índice seja utilizado na prática clínica, é necessário que os resultados sejam validados prospectivamente. O mesmo ocorre quando se faz a análise de prognóstico pela divisão do LDGCB em CG e CBA (Nyman et al., 2007).

2.2.2 – Valor prognóstico da tomografia por emissão de positron

A tomografia por emissão de pósitron com fluorodeoxiglicose tem, recentemente, emergido como potente arsenal de investigação por imagem em LNH e LH (Figura 2). Estudos sobre seu impacto no estadiamento, na avaliação de resposta, como preditor de agressividade tumoral e na resolução de discordância entre biópsia e evolução clínica foram conduzidos (Schöder et al., 2005).

Figura 2 – PET-FDG, demonstrando LDGCB com captação acima e abaixo do diafragma

O uso da PET-CT como prognóstico, após o tratamento inicial em LDGCB, está em investigação. De 96 pacientes com LNH agressivo avaliados, 67 apresentavam PET-CT negativo após término da quimioterapia. Desses, 80% permaneceram em RC, em 730 dias de acompanhamento. Dos 29 pacientes com PET-CT positivo, após o término da quimioterapia, todos recaíram em uma média de 105 dias, contra 316 dias para os com PET-FDG negativo (Spaepen et al., 2001). Outro estudo demonstrou valor preditivo positivo de 100% e negativo de 82% (Mikhael et al., 2000).

A persistência de PET-CT positivo, durante o tratamento, está associada a menor SLD, com menor frequência de falso negativo, quando comparado com os realizados ao término do tratamento. Do segundo ao quarto ciclo, a probabilidade de recaída em LDCGB foi de 0% e 16% para os PET negativos, comparada a 87% e 100% para os PET positivos. O PET precoce tem sensibilidade e valor preditivo negativo de 100%, especificidade de 94%, valor preditivo positivo de 90% e acurácia de 96% (Kostakoglu et al., 2002). Esses resultados sugerem a utilidade do uso precoce do PET-CT como fator preditor de prognóstico em LDGCB.

Estudo retrospectivo com 50 casos de LH e LNH, que realizaram PET-FDG, após dois ciclos de quimioterapia de resgate e antes do ATMO, demonstrou SLP de 19 meses para os PET negativos pré-ATMO, contra cinco meses para os positivos. No grupo negativo, paciente com critério de resistência à quimioterapia, à tomografia computadorizada (TC) tem prognóstico comparável ao dos portadores de doença quimiossensível. Isso

indica que a PET-CT pode ser utilizada como preditor de prognóstico do ATMO, após quimioterapia de resgate (Svoboda et al., 2006).

A TC ainda é o exame padrão para estadiamento e acompanhamento em linfoma. Em estudo retrospectivo com 75 portadores de LNH e LH, tratados com quimioterapia convencional com ou sem radioterapia, compararam-se os achados da TC e PET-CT ao término da terapêutica. De cinco pacientes sem alteração à TC e PET positivo, quatro recaíram ou progrediram em três a 12 meses após a avaliação. Dos 41 pacientes com alteração à TC, 11 tinham PET positivo, desses, 10 recaíram. Dos 30 com PET negativo, nenhum recidivou em um período de seis a 15 meses (Zinzani et al., 2004).

Entretanto, a utilidade da imagem funcional permanece obscura, mesmo com alto valor preditivo, pois não há evidência de que tratamento adicional ou mais intensivo, ao término do tratamento, possa melhorar o prognóstico assim como a troca do esquema de primeira linha para respondedores lentos.

A utilização do PET-CT sem evidência de doença clínica, laboratorial ou radiográfica permanece controversa, podendo aumentar os custos sem benefício proporcional. Ademais, até o momento não existem evidências de que a utilização do PET-CT altere o prognóstico em LDGCB, embora sua utilização no acompanhamento e na avaliação de pacientes com recidiva precoce se traduza em benefício terapêutico (Juweid e Cheson, 2005). Um comitê de especialistas, criado para estabelecer consenso sobre o uso do PET-CT na avaliação do tratamento de linfoma, propôs critérios para a sua

utilização. Após a terapêutica, o PET-CT deve ser realizado pelo menos três semanas do término, preferencialmente, seis a oito semanas após a quimioterapia ou quimioimunoterapia e oito a doze semanas da radioterapia. Massas residuais inferiores a 1 cm de diâmetro devem ser consideradas positivas apenas nos casos com atividade no local ao diagnóstico. Não deve ser utilizada para monitorar tratamento, a não ser em estudo clínico prospectivo (Juweid et al., 2007).

2.3 – Estratificação Biológica

Pacientes de mesmo IPI podem apresentar diferente resposta ao tratamento quimioterápico e imunoterápico, embora não sendo isso suficiente para definir o prognóstico em LDGCB. Com a possibilidade de se avaliar a expressão gênica dos tumores (Quackenbush, 2001), identificaram-se formas moleculares distintas de LDGCB, refletindo variações nas taxas de proliferação, diferenciação e resposta (Alizadeh et al., 2000). Estudos de avaliação da expressão gênica com DNA *microarray* evidenciaram que essas conferem diferentes grupos de prognóstico em LDGCB (Figura 3). Aqueles com origem no CG (Figura 4) seriam de melhor prognóstico dos que os originados de células B ativadas, independentemente do IPI (Chang et al., 2004).

Figura 3 – Eventos fisiopatológicos em LDGCB - adaptado de Lossos e Morgensztern, 2006

com CBA, mas o significado clínico desses marcadores em LDGCB ainda é incerto. Por outro lado, a técnica de imuno-histoquímica é mais factível do que a análise da expressão gênica e talvez possua informação prognóstica similar (Chang et al., 2004).

Quando associamos esses marcadores às características morfológicas descritas na classificação WF, observamos que os linfomas do CG apresentam células grandes clivadas (G-WF) e têm melhor RC e SLD do que os do tipo imunoblástico (H-WF), porém sem significância estatística. Entretanto, a análise isolada dos marcadores CD10 e Bcl-6 tem impacto na RC, e a expressão de Bcl-2 influencia as SG e SLD (De Paepe et al., 2005).

Embora a origem da célula neoplásica exerça influência no prognóstico dos LDGCB *de novo*, o mesmo não ocorre com os LDGCB recidivados. Não há diferença em relação à resposta à quimioterapia de resgate ou ao ATMO, quanto à SG e SLD, no que tange à origem celular ou à expressão dos marcadores que diferenciam a origem do linfoma em CG (CD10, Bcl-6) ou NCG (Bcl-2, MUM-1, p53, MUC-1, MDR, MIB-1) (Moskowitz et al., 2005).

A proteína Bcl-2 possui ação anti-apoptótica, importante na diferenciação e desenvolvimento celular. Sua hiperexpressão aumenta o tempo de vida da célula tumoral e resistência à quimioterapia. Associa-se, freqüentemente, à t(14;18)(q32;q21), mas não tem impacto na sobrevida (Iqbal et al., 2004). A expressão de Bcl-2 em LDGCB reduz a SG dos LDGCB de células B ativadas, mas não nos do CG (Iqbal et al., 2006). Embora sem consenso de sua influência na RC e sobrevida, a proteína foi

incluída em modelos gênicos preditores de sobrevida (Lossos e Morgensztern, 2006).

Além do BCL-2, outros marcadores associados à regulação do ciclo celular, apoptose, diferenciação linfóide B e moléculas de adesão são utilizados para avaliar prognóstico em LDGCB (Tabela 10).

Tabela 10 – Biomarcadores de Prognóstico

Marcadores	
Ciclo celular	TP53, p27, ciclina D1, Ki-67
Proteínas apoptóticas	Survivan, BCL2, Caspases,
Diferenciação de células B	BCL6, HGAL, CD10, CD5, FOXP1, PKC- β , CD21
Adesão celular	ICAM-1, CD-44
Angiogênese	Endostatin, fator de crescimento vascular endotelial, MMP-9, MMP-2
Outros	Proteína nm23-H1, IL-10, fator crescimento dos hepatócitos, complexo de histocompatibilidade maior

Todos esses marcadores, em diferente intensidade, podem influenciar a sobrevida. O antígeno nuclear Ki-67 é expresso durante a divisão celular. O percentual expresso na célula reflete a proporção de células tumorais que estão se dividindo. Sua utilização como fator de prognóstico é controversa. Uma possível razão para a incongruência entre os resultados obtidos nos estudos é o uso de diferentes critérios de positividade de Ki-67 e

complexidade da análise entre expressão de Ki-67 e prognóstico. Embora o LDGCB com alto índice de Ki-67 tenha pior prognóstico que os de baixo índice, estes têm maior possibilidade de quimiorresistência, pois a maioria das células está em G0/G1, permitindo o reparo da lesão do DNA induzido pela quimioterapia e, por consequência, a sobrevida celular (Lossos e Morgensztern, 2006).

A ciclina D é uma proteína mediadora da transição da fase G1 para a fase “S”. A alta expressão das ciclinas D3 ou D2 associa-se a pior prognóstico, independentemente do IPI (Lossos e Morgensztern, 2006).

O gene BCL-6 é o mais comumente comprometido no LDGCB e exclusivamente expresso em linfócitos do CG e nos linfomas do CG. Em análise multivariada, mostrou-se como marcador de prognóstico independente do IPI e foi incorporado em modelos gênicos preditores de sobrevida (Lossos e Morgensztern, 2006). Quando utilizado como fator de prognóstico em pacientes tratados com R-CHOP, houve benefício dessa associação apenas para pacientes Bcl-6⁻. Em análise multivariada, no grupo Bcl-6⁺, apenas o IPI foi capaz de prever prognóstico. Ao contrário do já evidenciado em estudos anteriores (Mounier et al., 2003), a presença de Bcl-2 não influenciou o prognóstico dos tratados com R-CHOP (Winter et al., 2006).

Porém, em pacientes submetidos a ATMO em primeira RC, a expressão de Bcl-6 não teve impacto no prognóstico, ao contrário das proteínas Bcl-2 e CD10 (Van Imhoff et al., 2006).

O CD10 é um marcador que aparece, durante a maturação linfocitária, em células pró-B e reaparece durante a maturação no CG, ocorrendo em 20% a 30% dos LDGCB (LeBien e McCormack, 1989). Sua utilização como preditor de prognóstico ainda é conflituosa, apesar de associado a maior SG (Lossos e Morgensztern, 2006).

O CD5 é um antígeno expresso primariamente em células T, aparecendo na maioria dos portadores de LLC e LCM, mas em apenas 10% dos LDGCB. Geralmente ocorre em pacientes de IPI de alto risco, mas com impacto prognóstico incerto (Lossos e Morgensztern, 2006).

O CD21 é um antígeno fortemente expresso em células B da zona marginal, recentemente associado a melhor sobrevida em LDGCB, independente do IPI (Lossos e Morgensztern, 2006).

O MUM-1/IRF4 é um membro da família de genes reguladores de interferon. Análise genética por DNA *microarray* sugere sua participação na fase final da diferenciação do linfócito B. Sua expressão ocorre em estágio de diferenciação pós CG e fenótipo associado a LDGCB de origem em CBA, morfologia do tipo imunoblástico e apresentação linfonodal (Colomo et al., 2003).

O CD138 é um antígeno associado à célula plasmática e imunoblasto. Quando avaliado em pacientes com linfoma associado ao HIV, sua positividade, em combinação com ausência de Bcl-6, correlacionou-se com origem pós-centro germinativo (Linderorth, 2003).

O *p63* é um gene da família *p53* de genes supressores tumorais, com similaridade e diferença do ponto de vista funcional em relação ao *p53*. Há correlação entre o gene *p63*, crescimento e desenvolvimento de tumores epiteliais (Mills et al., 1999; Yang et al., 1999). Sua função no tecido linfóide não é clara, mas a expressão de *p63* parece relacionada com linfomagenese. Embora seu significado clínico-patológico permaneça obscuro, está expressa em células linfóides do CG (Di Como et al., 2002; Nylander et al., 2002).

Quando avaliada em 65 portadores de LDGCB, a proteína *p63* esteve presente em 34% dos casos. Os positivos para tal proteína apresentaram tendência a menor SG, em dois anos, em relação ao grupo negativo, sem relação com a origem em CG ou NCG (Fukushima et al., 2006). Em outro estudo, embora associada com marcadores de alto índice de proliferação como o Ki-67, não houve relação com a SG, sugerindo seu envolvimento com a proliferação dos LDGCB (Hedvat et al., 2005).

Nem todo marcador do CG, avaliado isoladamente, tem significado prognóstico. Existem várias tentativas de validação de modelos imuno-histoquímicos, para melhor identificar riscos de LDGCB. Em virtude da heterogeneidade desse linfoma, estudos realizados até o momento demonstraram resultados conflitantes.

A combinação dos marcadores CD10, *bcl-6* e MUM-1 pode classificar o LDGCB em relação ao tempo de sobrevida. Essa combinação de marcadores tem valor preditivo positivo de 87% e 73% para classificação fidedigna em linfoma do CG e de CBA, respectivamente pela técnica de IH,

tendo a técnica de DNA *microarray* como padrão ouro, com melhor correlação de prognóstico do que o modelo genético (Hans et al., 2004). Esse estudo demonstra que a expressão isolada de CD10 e Bcl-6 está associada a maior SG, assim como a expressão de MUM-1, Bcl-2 e ciclina D2 associam-se a menor SG. A combinação dos marcadores CD10, Bcl-6 e Bcl-2 e IPI melhoram a estratificação de risco em LDGCB (Barrans et al., 2002).

Na era pós-rituximabe, o valor prognóstico da associação de marcadores imuno-histoquímicos ainda é incerta. Estudo, avaliando o papel dos marcadores CD10, BCL-6 e MUM-1 na identificação de linfomas, originados ou não no CG e o valor prognóstico dessa associação em 90 pacientes, tratados com quimioterapia convencional associada a Rituximabe, não demonstrou diferença estatisticamente significativa na SG ou SLF (68% x 63%) entre CG e NCG (77% x 76%) assim como para a SLF, confirmando o benefício da imunoquimioterapia. Porém, houve diferença de prognóstico entre LDGCB do CG e NCG nos 104 casos do grupo controle, tratado sem Rituximabe (Nyman et al., 2007).

Até o momento, a maioria dos biomarcadores estudados demonstrou valor clínico complementar ao IPI na estratificação de risco em LDGCB. A construção de modelos preditores de sobrevida por expressão gênica e protéica baseia-se na análise de pequeno número de proteínas e genes. Portanto, sua introdução na prática clínica ainda requer validação, sendo necessário maior número de estudos para que se tornem realidade (Lossos e Morgensztern, 2006).

2.4 – Tratamento

2.4.1 – Quimioterapia

A quimioterapia cura a maioria dos pacientes com LDGCB e doença localizada (estádio I e II), mas apenas 30% a 40% dos casos avançados (III e IV). Pacientes com idade inferior a 60 anos e IPI de baixo risco têm SG em cinco anos de 84,3%, e os de alto risco de 54,5% (Hallack Neto, 2004).

O tratamento atual utiliza o esquema CHOP ou similar como primeira escolha (McKeelvey et al., 1976). Sua eficácia é semelhante e de menor toxicidade do que protocolos mais agressivos. De acordo com o estágio e a presença de *bulky*, associa-se radioterapia adjuvante.

Cerca de 30% dos pacientes têm doença localizada ao diagnóstico. Sessenta por cento dos pacientes com estágio I podem ser curados com radioterapia (Hudson et al., 1994). Os casos tratados com radioterapia isolada têm recidiva sistêmica 20% superior e SLD 50% inferior aos tratados com quimioterapia associada ou não à radioterapia (Jones et al., 1989). Em estágio precoce sem *bulky*, a resposta ao esquema curto de três ciclos de quimioterapia e radioterapia em campo envolvido pode ser superior a oito ciclos de quimioterapia isolada. Nesses casos, a SG em cinco anos foi superior, e a toxicidade, inferior no grupo tratado com esquema curto (Miller et al., 1998). Entretanto, uma nova reavaliação, após 10 anos de seguimento, demonstrou aumento do número de recaída tardia no grupo que

recebeu tratamento combinado, sem evidência de platô na curva de sobrevida (Friedberg, 2006).

Pacientes com IPI desfavorável, doença avançada (estádio III e IV) ou *bulky* devem ser tratados com pelo menos seis ciclos de CHOP. Desses, 60% obtêm RC, mas 50% recaem e apenas 35% serão curados (Coltman et al., 1986; Miller et al., 1998).

Tendo como precedente a hipótese de Goldie e Coldman (1984), na qual o aumento do número e da intensidade de cada droga, individualmente, refletir-se-ia em melhora da terapêutica, vários pesquisadores utilizaram protocolos mais agressivos. A partir de 1980, surgiram diferentes combinações de quimioterapia, incorporando etoposide, metotrexate, ou aumentando as doses e/ou reduzindo o intervalo entre os ciclos. Na avaliação isolada, os regimes de terceira geração (MACOP-B, ProMACE-CytaBOM, COP-BLAM IV, LNH-84) foram superiores ao CHOP (Fisher et al., 1983 e Montserrat et al., 1996). Entretanto, estudo multicêntrico randomizado, comparando ProMACE-CytaBOM, MACOP-B e m-BACOD com CHOP, não reproduziu os resultados prévios em relação à RC, SG e SLD, além de maior toxicidade nos tratados com esquemas de segunda e terceira geração (Fisher et al., 1993). Posteriormente, estudo comparando CHOP e ProMACE-CytaBOM também não demonstrou benefício deste último (Montserrat et al., 1996; Hallack Neto, 2004). Dessa forma, o esquema CHOP ainda é a primeira opção terapêutica em LDGCB.

Tentou-se também reduzir o intervalo entre os ciclos de CHOP e/ou aumentar a intensidade de dose das drogas que o compõem. A redução do

intervalo de 14 dias (CHOP-14) melhorou a SG e a SLD dos pacientes, tratados com CHOP convencional, independente da idade (Blayney et al., 2003; Pfreundschuh et al., 2004a,b).

Em idosos, a adição de etoposide ao CHOP-14 não mostrou benefício, outrossim maior toxicidade do que o CHOP convencional. Porém, em pacientes abaixo dos 60 anos e DHL normal, a adição de etoposide melhorou a SLE, mas não a SG (Pfreundschuh et al., 2004b).

Na tentativa de reduzir a toxidade cardíaca pela doxorrubicina, realizou-se estudo randomizado, comparando CHOP convencional com o CHOP, substituindo-se a doxorrubicina por 10 mg/m² de idarrubicina. Essa alteração demonstrou que foi inferior ao CHOP convencional, e o estudo foi encerrado precocemente (Burton et al., 2005).

Estudo randomizado, comparando CHOP com ACVBP (doxorrubicina, ciclofosfamida, vindesina, bleomicina e prednisona) em idoso com LNH agressivo, apresentou melhora na SG e SLE com o esquema ACVBP, mas com o dobro de mortalidade relacionada ao tratamento (Pfreundschuh et al., 2004b).

O desafio atual é melhorar a RC e a sobrevida dos pacientes de alto risco, nos quais a SG é inferior a 30% (Kimby et al., 2001). Pacientes refratários primários (não responsivos) ou recidiva precoce (< 1 ano de tratamento), tratados com quimioterapia, têm 20% a 40% de RC com esquema de resgate (Cabanillas et al., 1987 e Wilson et al., 1993) e SG, em cinco anos, inferior a 10% (Velásquez et al., 1994).

O esquema de resgate com etoposide, metotrexate e ifosfamida (MIME) foi utilizado em 208 pacientes com linfoma recorrente (123 agressivos e 85 indolentes). A taxa de RC foi de 24% e de RP, de 36%, com SLD de 15 meses e SG de nove meses (Cabanillas et al., 1987). Em 74 pacientes refratários e recidivados, utilizaram-se etoposide, vincristina, doxorubicina, ciclofosfamida e prednisona (EPOCH) em infusão contínua, obtendo-se RC de 27% e RP de 42%, principalmente nos casos recidivados (Wilson et al., 1993).

O esquema com etoposide, metilprednisolona, Ara-C, cisplatina (ESHAP) foi utilizado em 122 pacientes com LNH refratário ou recidivado, observando-se RC de 37% e RP de 27%, e a duração média da RC foi de 20 meses (Velasquez et al., 1994).

Atualmente, no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da FMUSP, utiliza-se um protocolo para LDGCB refratário ou recidivado após CHOP, denominado IVAC modificado (IVACm). Esse esquema é constituído por ifosfamida (IFM), alta dose de citarabina e etoposide a cada 28 dias. A SG, após três ciclos de IVACm, foi de 66,6%. Dos pacientes testados, 2/3 foram quimiossensíveis, desses, 88% foram submetidos a ATMO, com 57,1% de falha na mobilização. As toxicidades mais freqüentes foram neutropenia, grau III e IV em 85,6% dos pacientes e trombocitopenia em 87,5%. Esse esquema reproduz dados semelhantes aos da literatura, com a vantagem de ser realizado em esquema ambulatorial, constituindo-se como mais uma opção de terapia de resgate, principalmente para locais com pouca disponibilidade de leitos para internação (Pereira et al., 2006).

Em resumo, não há esquema de escolha para resgate de LNH agressivo refratário ou recidivado, mas sempre se deve ter em mente o objetivo de obter RC antes do ATMO. Pacientes submetidos a ATMO em RC têm melhor prognóstico do que aqueles em RP. Tenta-se elevar a RC com resgate mais agressivo, ou com a associação de imunoterapia (Kewalramani et al., 2004).

2.4.2 – Imunoterapia

O anticorpo monoclonal anti-CD20 (Rituximabe) é uma proteína quimérica, reconhecedora do antígeno CD20, localizado na superfície do linfócito B maduro. Sua eficácia foi demonstrada em estudos, fase I e II, em que se evidenciou que 46% dos pacientes com linfoma folicular recidivados obtinham RP com monoterapia, com Rituximabe (Maloney et al., 1997). Posteriormente, estudo de fase II demonstrou 37% de RC ou RP em LDGCB (Coiffier et al., 1998).

Em 2000, o Grupo de Estudos de Linfoma em Adulto (GELA) demonstrou que a taxa de progressão, recaída ou morte dos pacientes com LDGCB, acima dos 60 anos, tratados com Rituximabe e CHOP, era de 43%, contra 61% no grupo que recebeu CHOP sem Rituximabe. A SLD e SG também foram superiores no grupo R-CHOP (Coiffier et al., 2002). Com cinco anos de acompanhamento, a SLE foi de 50% no grupo R-CHOP e

28% nos tratados apenas com CHOP. A SLE, SLP, SLD e SG permaneceram favoráveis ao R-CHOP, com p de 0,00002, <0,00001, 0,00031 e 0,0073 respectivamente. O benefício do R-CHOP foi observado para todos os grupos de risco de IPI e sem toxicidade adicional (Feugier et al., 2005).

O esquema R-CHOP também foi melhor para pacientes com LDGCB avançado e idade entre 19 a 86 anos em relação ao CHOP isolado, principalmente para indivíduos acima de 60 anos de idade (Sehn et al., 2005).

Em outro estudo, foram randomizados 824 pacientes de 18 a 60 anos de idade, de IPIa de risco baixo e intermediário baixo, para receber seis ciclos de R-CHOP ou seis ciclos de CHOP. A SLE e a SG, em três anos, com R-CHOP foram de 79% e 93% contra 59% e 84% no grupo CHOP respectivamente (Pfreundschuh et al., 2006).

Em outro estudo, avaliou-se o impacto da expressão da proteína Bcl-6 em 199 pacientes, tratados com R-CHOP ou CHOP. Os casos Bcl-6– tratados com R-CHOP tiveram maior SLF em relação aos tratados com CHOP (76% versus 9% em 2 anos, $p < 0,001$). A SG também foi favorável ao R-CHOP (79% versus 17% em 2 anos, $p < 0,001$). A adição de Rituximabe ao CHOP não elevou a sobrevida dos casos Bcl-6+, mas a adição do rituximabe foi o único fator de impacto nas SLF e SG dos pacientes Bcl-6– à análise multivariada (Winter et al., 2006).

Nesse estudo, a resposta ao R-CHOP para os casos Bcl-2+ não foi diferente dos tratados com CHOP (Winter et al., 2006). Entretanto, o GELA demonstrou maior sobrevida nos pacientes Bcl-2+, tratados com R-CHOP, em relação aos tratados com CHOP (SG em 2 anos de 67% versus 48%, $p=0,004$) e ausência de impacto favorável quando se usou Rituximabe nos casos Bcl-2- (Mounier et al., 2003).

A utilização de quimioterapia infusional EPOCH em dose ajustada, associada a Rituximabe (R-EPOCH) como terapia primária para LDGCB, mostrou SLP de 83% em 2 anos, com SG semelhante (Sweetenham, 2005). Em 33 pacientes com LDGCB de IPIa de risco intermediário alto e alto, tratados com R-EPOCH em primeira linha, a RC foi de 83,8% e a SLE e SG, em 2 anos, foram de 68% e 75%, respectivamente. As principais toxicidades foram neutropenia, grau 3 e 4 em 52% dos ciclos e neutropenia febril em 14% dos ciclos (Garcia-Suarez et al., 2007).

Para os pacientes recidivados ou refratários, a adição de Rituximabe ao ICE (ifosfamida, carboplatina e etoposide) aumentou a RC de 27% para 53%, quando comparado com os tratados com ICE isoladamente. A SLD foi discretamente favorável para o grupo R-ICE, mas sem diferença na SG (Kewalramani et al., 2004).

A eficácia da adição de Rituximabe à terapia de segunda linha para pacientes previamente tratados com essa droga não é clara. Alguns estudos, como o NCI Canada LY 12 e o CORAL na Europa, avaliaram a adição de Rituximabe a pacientes que o haviam ou não recebido previamente. O primeiro avaliou LDGCB recidivado, randomizando entre R-

GDP (gencitabina, dexametasona e cisplatina) ou R-DHAP (dexametasona, cisplatina e citarabina) pré ATMO, e o segundo avaliou grupo similar de pacientes, comparando R-ICE ou R-DHAP. Esses estudos não esclareceram o benefício da imunoterapia, associada à quimioterapia de segunda linha, para pacientes previamente expostos ao Rituximabe, nem o esquema ideal de quimioterapia de segunda linha (Sweetenham, 2005).

O benefício do Rituximabe como adjuvante à quimioterapia de alta dose (QAD), seguida de ATMO, foi investigado em portadores de LDGCB de alto risco com idade inferior a 60 anos. Após quatro ciclos de QAD seguida de ATMO, foi utilizado rituximabe por quatro semanas em 24 pacientes, com SG de $86\% \pm 14\%$ e SLE de $82\% \pm 15\%$. Esses resultados demonstram que a utilização de rituximabe após QAD, seguida de ATMO, é possível e, quando comparados com a sobrevida de outros pacientes de mau prognóstico que não utilizaram rituximabe, observam-se melhores resultados (Coso et al., 2006). Embora cause redução na dosagem de imunoglobulina por 12 a 24 meses, isso não elevou o risco de infecção atípica ou tardia (Shortt e Spencer, 2006).

Resultados preliminares com anticorpo monoclonal (AcMo), ligado a radiofármaco, demonstraram atividade em LNH indolente, resistente aos AcMo, não conjugados a radiofármaco (Kaminski et al., 2000). Tanto o I tositumomab (Bexxar) e o Y-ibritumomab foram aprovados para linfoma indolente, mas a experiência em LDGCB é limitada. Estudo multicêntrico europeu, de fase 2, de 104 pacientes com LDGCB refratário ou recidivado, sem condições para ATMO, tratados com Y-ibritumomab, apresentou

resposta global (RG) de 44%, principalmente nos que não receberam rituximabe previamente (Sweetenham, 2005).

A adição dos AcMo, ligados a radiofármaco no condicionamento para ATMO, não aumentou a toxicidade, nem prolongou o tempo de enxertia. A associação de I tositumomab ao esquema BEAM em 23 LNH B refratários, ou após várias recaídas, revelou RG de 65%, SG de 55% e SLP de 39% em 38 meses (Sweetenham, 2005).

AcMo anti-CD20 mais potentes têm sido desenvolvidos e estão sendo estudados em LNH resistente a Rituximabe (Teeling et al., 2004). A associação de Rituximabe a outros AcMo como anti-CD22, anti-HLA-DR e anti-CD80 estão em fase de estudo (Blum e Bartlett, 2003; Leonard et al., 2004).

A toxicidade e a eficácia da associação do epratuzumab-Rituximabe foram avaliadas em 65 casos de LNH refratário ou recorrente, dos quais 15 tinham LDGCB. O epratuzumab foi administrado na dose de 360 mg/m², seguido de 375 mg/m² rituximabe semanalmente, por quatro semanas consecutivas, sem aumento da toxicidade. A resposta objetiva foi de 47%, principalmente nos LF e LDGCB. Os portadores de LDGCB obtiveram 33% de RC, mais frequentemente nos de IPI de baixo risco, sendo aprovada a tolerância da associação (Strauss et al., 2006).

2.4.3 – Transplante de medula óssea

Os pacientes com LNH agressivo em primeira recidiva precoce têm prognóstico desfavorável. Atualmente, preconiza-se consolidar esses pacientes com ATMO, desde que sensíveis ao esquema quimioterápico de resgate (Shipp et al., 1999). O ATMO está indicado para pacientes em recidiva quimiossensível, não havendo evidência suficiente para recomendá-lo aos recidivados quimiorresistentes. Em contraste, pode haver benefício para pacientes com doença refratária primária (Shipp et al., 1999).

O estudo PARMA avaliou 215 pacientes entre 18 e 60 anos, sendo 188 em primeira e 27 em segunda recidiva, após esquema com doxorubicina, e que foram submetidos a dois ciclos de resgate com DHAP. Cento e vinte e cinco responderam ao resgate, dos quais 55 foram randomizados para ATMO, e 54 para receberem mais quatro ciclos de DHAP. Os pacientes submetidos a ATMO receberam condicionamento com ou sem radioterapia em campo envolvido. Dos que receberam ATMO, três faleceram por toxicidade do tratamento. Em cinco anos, a SG foi de 53% no grupo de ATMO e 32% no grupo sem transplante ($p=0,038$), com SLD de 46% no grupo de ATMO e 12% com terapia convencional ($p=0,001$). Não houve diferença significativa na proporção de recaída, em relação ao emprego de radioterapia (Philip et al., 1995). Embora esse seja o estudo clássico para determinar a indicação de ATMO, foi muito criticado por não ter levado em conta a intenção de tratar.

Em outro estudo com 184 pacientes resistentes primários, 176 foram submetidos a resgate, com 60% de quimiossensibilidade e 26% de RC após o transplante. A probabilidade de sobrevida, em três anos, foi de 68% para o grupo que atingiu RC e 11% para os que atingiram apenas RP ou não responderam ($p < 0,0001$). As SLD e SG, em cinco anos, foram, respectivamente, de 31% e 37% (Vose et al., 2001).

Embora o consenso da última conferência internacional sobre quimioterapia em altas doses e transplante de células tronco em linfoma agressivo tenha considerado os dados da literatura insuficientes, para indicar ATMO nos não respondedores à quimioterapia de indução (Shipp et al., 1999), o estudo acima é o maior com esse tipo de paciente e mostra que, em alguns casos, pode-se prolongar a SLD com essa terapêutica (Vose et al., 2001).

Em estudo multicêntrico com “respondedores lentos”, caracterizados por RP após três ciclos de CHOP, randomizados para continuar com CHOP até completar oito ciclos, ou receber mais um ciclo de CHOP, seguido de ATMO, não se demonstrou diferença na SG, SLD e SLE entre os dois grupos. A mortalidade relacionada ao procedimento foi similar nos dois grupos, concluindo-se que o tempo para obter remissão não interfere no prognóstico, mas, sim, o fato de obter ou não RC ao término do tratamento. Portanto, o ATMO precoce nesses pacientes não está indicado (Verdonck et al., 1995).

O emprego de ATMO como consolidação para pacientes abaixo dos 60 anos em RC, após tratamento convencional, ainda é obscuro (Shipp et al.,

1999). O estudo LNH-87 é um dos maiores estudos randomizados com LNH agressivo de alto risco, submetido à consolidação com ATMO. Em uma população de 236 pacientes, que atingiram RC após a fase de indução, observou-se que a consolidação com ATMO foi superior à quimioterapia seqüencial, com SLD e SG, em oito anos, de 55% versus 39% ($p=0,02$) e 64% versus 49% ($p=0,04$), respectivamente. Com base nesse estudo, supõe-se que o ATMO possa beneficiar pacientes de alto risco em RC após indução (Haioun et al., 2000).

Em 98 pacientes com LNH agressivo, comparou-se terapia seqüencial com MACOP-B (metotrexate, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona e bleomicina), seguida de ATMO. Cinquenta pacientes foram randomizados para receber MACOP, e 48 para a terapia seqüencial, seguida de ATMO. Dos 48 pacientes, 46 (96%) tiveram RC versus 35 (70%) dos 50 pacientes que receberam MACOP-B ($p=0,001$). Em sete anos, a SLD foi de 76% para os tratados com quimioterapia seqüencial em altas doses versus 49% para os tratados com MACOP-B ($p=0,004$). A SG, em sete anos, foi de 81% para o grupo tratado com altas doses de quimioterapia e 55% para os que receberam MACOP-B ($p=0,09$). Efeitos tóxicos fatais foram semelhantes nos dois grupos (8% x 6%) (Gianni et al., 1997).

Em estudo randomizado com 320 pacientes com LNH agressivo, inferior a 60 anos e de mau prognóstico, compararam-se cinco ciclos de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona e etoposide (CHOPE) (braço A) com dois ciclos de CHOPE, seguido de ATMO (braço B) – ambos receberam radioterapia, em campo envolvido, ao término do tratamento

(Kaiser et al., 2002). Dos 320 pacientes, 158 foram randomizados para o braço B, dos quais 103 receberam ATMO. As taxas de RC foram semelhantes, com 62,9% no braço A e 69,9% no braço B. As SG e SLD em três anos foram, respectivamente, de 63% para o braço A e 62% para o braço B ($p=0,68$); 49% de SLD no braço A e 59% para o B ($p=0,22$). As recaídas, após ATMO, ocorreram mais precocemente e estavam relacionadas a pior prognóstico. Esse estudo não autoriza o uso de ATMO precoce após quimioterapia breve (Kaiser et al., 2002).

A utilização de quatro ciclos de CHOP, associado à etoposide em doses crescentes e escalonada (MegaCHOPE), seguida de ATMO, foi investigada em 110 LNH agressivo entre 18 e 60 anos e DHL elevada. Desses, 25% apresentaram IPI de risco intermediário alto e alto. Foram avaliados dois grupos terapêuticos com escalonamento da dose de ciclofosfamida de 1500 mg/m² a 6000 mg/m² e de 450 mg/m² a 1000 mg/m² de etoposide no primeiro grupo (grupo 1) e, no segundo, a dose de etoposide foi escalonada de 600 mg/m² a 1480 mg/m² dos ciclos 1 a 4. Cerca de 81,8% dos pacientes completaram o tratamento, com SG de 67,2% e 4,5% de mortalidade, associada ao tratamento. O tempo para falência do tratamento foi superior para o grupo 2. Esse estudo demonstra que CHOP associado a etoposide em dose escalonada (MegaCHOPE), seguida de ATMO, é factível e segura, representando uma nova opção de tratamento para LNH agressivo de alto risco (Glass et al., 2005).

Um estudo clínico de um único centro avaliou a utilização de dois ciclos de quimioterapia de indução em alta dose, seguida de ATMO em LNH

agressivo com IPLa de risco intermediário alto e alto. Foram elegíveis 55 pacientes, para receber um ciclo de CHOP, seguido de 5,25 g/m² de ciclofosfamida, 1,05 g/m² de etoposide e 105 g/m² de cisplatina (DICEP) e condicionamento com BEAM. A SG e SLE, em quatro anos, foram, respectivamente, 72% e 79%, mostrando tratar-se de esquema factível sem toxicidade grave (Stewart et al., 2006).

O estudo do grupo Holandês e Belga HOVON-27 mostrou resultados decepcionantes quanto ao uso de terapia quimioterápica seqüencial de curta duração, seguida de ATMO, quando comparado ao CHOP tradicional em LNH agressivo de alto risco. A associação seqüencial de dose intensiva de quimioterapia a cada duas semanas, após três ciclos de CHOP (HOVON-40), melhorou a RC pré ATMO, que se refletiu em aumento da SLD em 4 anos de 34% do HOVON-27 para 74% no HOVON-40. O estudo HOVON-40 sugere que a utilização do ATMO, como primeira linha em pacientes de alto risco, pode ser benéfica para os pacientes que obtêm RC com terapia de indução (Van Imhoff et al., 2005).

Entretanto, um em cada quatro pacientes tinha doença refratária primária, o que não foi alterado pela elevação da dose ou pela redução do intervalo entre os ciclos de indução. O uso de anti-CD20 em combinação com CHOP reduziu o risco de falência do tratamento em LDGCB, implicando a necessidade de avaliar essa medicação na quimioterapia de indução de LDGCB de alto risco, candidatos a ATMO em primeira linha (Van Imhoff et al., 2005).

Avaliou-se, retrospectivamente, a resposta de 117 LDGCB que fizeram parte dos estudos HOVON-27/40 em relação a marcadores do CG e NCG. As taxas de RC foram superiores em pacientes CD10+ em relação aos negativos (58% x 30%, $p = 0,03$) assim como nos CD21+ (71% x 31%, $p = 0,01$). Os pacientes com fenótipo associado ao CG apresentaram SG superior ($p = 0,04$). As proteínas bcl-2 e MUM1 também apresentaram impacto prognóstico, o que não ocorreu para a proteína bcl-6 (Van Imhoff et al., 2006).

Há evidências de que, quando se utilizam células tronco periférica (CTP), há maior rapidez na recuperação hematopoética e menor incidência de pneumonite intersticial e infecção fúngica do que quando se utilizam células tronco de medula óssea (MO) (Shipp et al., 1999).

Estudo com 58 portadores de doença linfoproliferativa, que receberam MO ou CTP, mostra que o tempo de recuperação de plaquetas e neutrófilos foi significativamente reduzido nos pacientes que receberam CTP, com 23 e 14 dias ($p = 0,02$) para MO, e 16 e 11 dias ($p = 0,005$) para CTP para plaquetas e neutrófilos, respectivamente (Shipp et al., 1999).

Em estudo de fase III com 89 pacientes com LNH agressivo de alto risco randomizados, para receber MO ou CTP, observou-se mediana de recuperação de neutrófilos de 16 dias para MO e 10 dias para CTP, $p = 0,0013$. A mobilização das CTP foi realizada com quimioterapia e citocina (Shipp et al., 1999).

Em análise retrospectiva de 262 portadores de LNH, foram acompanhadas 665 coletas. Dessas, 17,9% foram consideradas pobres ($<2 \times 10^6$ CD34+cels/kg) e 10% muito pobres ($\leq 1 \times 10^6$ CD34+cels/kg). Doença refratária e número de ciclos de quimioterapia prévios foram associados a pior mobilização e evolução. Os pacientes com boa mobilização apresentaram SG e SLD em três anos de 71% e 58%, respectivamente. Nos pacientes com mobilização pobre, as SG e SLD foram de 33% ($p = 0,002$) e 23% ($p = 0,04$), respectivamente (Pavone et al., 2006).

Os estudos acima consideraram como objetivo principal a “enxertia”, sem avaliar a contaminação tumoral e o prognóstico da doença.

Em outro estudo, realizado com 105 pacientes com LNH de alto risco recidivado ou refratário e 93 avaliáveis, 46 receberam células de MO e 47 de SP. Todos foram mobilizados com G-CSF ($10 \mu\text{g/Kg/d}$), condicionados com carmustina, etoposide, citarabina e ciclofosfamida e mantidos com G-CSF até a “enxertia” após infusão da célula tronco. A média para recuperação de neutrófilos foi de 10 dias para os pacientes que receberam CTP e, de 13 dias, para os que receberam MO ($p < 0,001$). A média de recuperação plaquetária foi de 11 dias para o grupo que recebeu CTP, versus 15 dias para os que receberam MO ($p = 0,023$). A mortalidade, nos primeiros 100 dias, foi igual nos dois grupos, a SG estimada para quatro anos foi de 61% para os que receberam CTP contra 43% dos que receberam MO ($p = 0,037$) e, sem diferença estatística, para SLE e RC. Os pacientes submetidos a ATMO com MO e sem doença residual mínima (DRM) tiveram SLE superior aos com DRM por reação em cadeia de polimerase (PCR)

($p = 0,019$), o que não foi observado para o grupo que recebeu CTP ($p = 0,45$) (Vose et al., 2002).

Esse estudo demonstrou benefício do ATMO com CTP quanto ao tempo de “enxertia”, mas sem impacto na SLD. Com base nesses resultados, o ATMO com CTP e menor massa tumoral permanece como sendo a melhor forma de TMO (Vose et al., 2002), em relação ao uso de MO tratada “in vitro” (Bierman et al., 2003).

Apesar da toxicidade da mieloablação, da alta taxa de mortalidade relacionada ao TMO e da falta de evidência na literatura para o transplante de medula óssea alogênico (alo-TMO) em LNH (Shipp et al., 1999), esse procedimento está sendo realizado mais freqüentemente em pacientes que recidivam após o ATMO. Devido à ausência de evidência, demonstrando superioridade do alo-TMO em relação ao ATMO (Bierman et al., 2003), o mesmo deve ser restrito a pacientes submetidos a protocolos de pesquisa.

Recente estudo com 114 LNH que recidivaram após ATMO e receberam alo-TMO resultou em mortalidade relacionada ao tratamento de 22%, com 33% de SG e 25% de SLP em três anos. Após cinco anos de acompanhamento, a SG e SLP foram inferiores a 24% e 5%, respectivamente. A RC, no momento do alo-TMO, e a utilização de irradiação corporal total (TBI) no condicionamento estão relacionadas com melhor SG (Freytes et al., 2004).

Em um estudo com 44 pacientes com LNH agressivo refratário ou recidivado, submetidos a alo-TMO, 42 foram condicionados com TBI. A SLE

e a SG, em cinco anos, foram de 43% e 48%, respectivamente. A mortalidade relacionada ao tratamento, em um ano, foi de 25%. A doença do enxerto versus hospedeiro (DECH) aguda, grau III-IV influenciou negativamente a SG e a SLE, mas o mesmo não ocorreu para a DECH crônica. A chance de recaída foi maior para pacientes com recidiva inferior a um ano, mas o risco de recaída não foi maior para os pacientes com doença refratária à quimioterapia. Dessa forma, o Alo-TMO é uma opção para doença quimiorrefratária (Doocey et al., 2005).

Estudo japonês avaliou, retrospectivamente, 233 pacientes com LNH, submetidos a alo-TMO, 111 como agressivos, sendo 44 LDGCB. A DECH aguda ocorreu em 67% dos pacientes, classificada como grave em mais de 50% dos casos. Dos 165 sobreviventes aos primeiros 100 dias, 29% evoluíram com DECH crônica extensa. Noventa e oito (42%) pacientes faleceram por causas relacionadas ao tratamento. Oitenta e nove atingiram RC, mas a maioria encontrava-se nessa situação no momento do transplante. As SG e SLP, em dois anos, foram respectivamente de 40% e 45%. A SG, em dois anos, foi de 57% nos linfomas indolentes e 42% nos agressivos, com diferença significativa entre os dois grupos. A presença de resistência à quimioterapia, ATMO ou radioterapia prévia foram fatores de mau prognóstico. Portanto o alo-TMO pode ser curativo para determinados subtipos de LNH, mas com alta taxa de toxicidade e mortalidade (Kim et al., 2006).

Diante desses aspectos e, para tentar utilizar os linfócitos do doador contra o linfoma do receptor, sem expor o receptor à toxicidade do

condicionamento mieloablativo, criou-se o transplante com intensidade de condicionamento reduzido ou transplante não mieloablativo (mini-TMO). Esse procedimento é uma opção para pacientes que não são candidatos ao alo-TMO, devido à idade avançada ou grave comorbidade.

Os resultados para LNH agressivo com mini-TMO não são uniformes. Em estudo com 188 pacientes com LNH, sendo 62 agressivos, a SG, em dois anos, foi de 50%, e a toxicidade relacionada ao transplante, de 34,3% (Robinson et al., 2002).

Em outro estudo com 20 pacientes com LNH agressivo refratário à quimioterapia, submetidos a mini-TMO, condicionado com ciclofosfamida e timoglobulina, ou com anticorpo anti-CD20 e irradiação tímica, a SLD, em um ano, foi de 25% (Spitzer et al., 2001). Estudo com 44 pacientes, condicionados com fludarabina, melfalan e campath-1H, mostrou ser possível reduzir a DECH com campath ou outras medidas específicas (Kottaridis et al., 2000). Em pequeno estudo com 15 pacientes, condicionados com fludarabina, citarabina e cisplatina, utilizando FK-506 e metotrexate para profilaxia da DECH, a SLD foi de 61% e a SG, em dois anos, de 71% (Khoury et al., 2001).

O efeito do enxerto contra linfoma pode ser comprovado pelos bons resultados obtidos com infusão de linfócitos em pacientes submetidos ao mini-TMO que apresentaram progressão de doença após 100 dias, embora não tenha sido demonstrado platô na curva de sobrevida desses pacientes (Escalon et al., 2004).

Porém, quando analisamos os dados do IBMTR, ABMTR e EBMT quanto à presença do efeito do enxerto contra linfoma, comparando-se TMO singênico e alo-TMO, não é possível confirmar sua existência para LNH agressivo, levando-se ao questionamento sobre a validade do mini-TMO para LDGCB (Bierman et al., 2003).

Portanto, os resultados com mini-TMO em LNH agressivo ainda são questionáveis e de alta toxicidade, são necessários estudos prospectivos, com maior número de pacientes e maior tempo de seguimento, para melhor entendimento e avaliação do efeito do enxerto contra o linfoma assim como dos resultados dessa modalidade de transplante em linfoma agressivo.

3. OBJETIVOS

- 1) Avaliar toxicidade, sobrevida global e sobrevida livre de doença dos pacientes com LDGCB de IPIa de risco intermediário alto e alto, tratados no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da FMUSP com quimioterapia convencional (CHOP) e subsequente consolidação com ATMO, em primeira remissão completa.
- 2) Comparar os resultados obtidos com ATMO com o controle histórico, composto por portadores de LDGCB e IPIa de risco intermediário alto e alto, tratados com quimioterapia convencional e mantidos em observação após RC, no Serviço de Hematologia do HC-FMUSP.
- 3) Avaliar fatores de prognóstico clínicos e laboratorial de pacientes com LDGCB de IPIa de risco intermediário e alto.
- 4) Avaliar o impacto prognóstico dos marcadores imuno-histoquímicos de células B do centro germinativo (CD10 e Bcl-6) e B ativadas (MUM1/IRF4 e CD138) na definição de subgrupos de risco de LDGCB de mesmo IPIa (intermediário alto e alto).
- 5) Avaliar o valor prognóstico da expressão das proteínas Bcl-2 e p63 em portadores de LDGCB de IPIa de risco intermediário alto e alto.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 – Pacientes

Após aprovação da comissão de ética do HC-FMUSP, realizamos estudo de coorte prospectivo com portadores de LDGCB, tratados no Serviço de Hematologia do HC-FMUSP. Foram avaliados pacientes virgens de tratamento, idade inferior a 60 anos e IPIa de risco intermediário alto e alto.

Foram avaliados 95 pacientes com sorologia negativa para o vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV). Treze foram excluídos por falta de informações no prontuário ou tratamento inadequado (falecidos durante o primeiro mês de terapêutica sem relação com o tratamento, abandono antes do término, insuficiência cardíaca congestiva (ICC), insuficiência renal (IR) e insuficiência hepática (IH)).

Assim foi possível realizar a coleta de dados do prontuário médico de 82 pacientes, enfatizando-se sexo, idade, data do óbito ou da última avaliação, local primário de doença, estágio de Ann Arbor, terapêutica efetuada, data do diagnóstico (data da biópsia) e o IPIa calculado para todos os pacientes (Tabelas 5 e 6). O estado funcional (EF) dos pacientes não descritos no prontuário médico foi calculado por estimativa, de acordo com as anotações à época do diagnóstico. Tumores de dimensão igual ou

superior a 10 cm no maior diâmetro ou maior que um terço do diâmetro cárdio-torácico foram considerados *bulky*. Quando as medidas eram inadequadas, considerou-se como *bulky* massa de maior diâmetro, próximo a 10 cm e que deslocava ou obstruía estruturas anatômicas adjacentes, comprometendo o estado funcional do paciente.

Avaliamos os pacientes submetidos à consolidação com ATMO em primeira RC, após quimioterapia convencional com antraciclina, e os que receberam quimioterapia convencional com antraciclina e foram mantidos em observação. Para avaliar a terapêutica utilizada, foram consideradas as intervenções terapêuticas, efetuadas de janeiro de 1992 a dezembro de 2005, sendo a última avaliação em dezembro de 2006.

Aos pacientes tratados a partir de janeiro de 2000, foi proposta a realização de ATMO aos que atingissem RC após 6 a 8 ciclos de CHOP.

Assim, de acordo com a terapêutica utilizada, foram individualizados dois grupos. No grupo 1, foram incluídos pacientes que receberam quimioterapia convencional, atingiram RC e foram mantidos em observação e, no grupo 2, pacientes que receberam consolidação com ATMO em primeira RC.

4.2 – Diagnóstico anatomopatológico e imuno-histoquímico

Todas as 82 amostras de biópsia foram submetidas à revisão centralizada por um único hematopatologista da Divisão de Anatomia Patológica do HC-FMUSP. Todas as amostras foram submetidas à coloração de hematoxilina-eosina e imuno-histoquímica (IH) com anticorpos para antígenos linfóides B (CD 20) e T (CD3).

Nos casos de dúvida na análise histopatológica inicial, realizava-se IH complementar com anticorpos CD10, CD15, CD30, Ki-67 e EMA (antígeno epitelial de membrana). Os linfomas foram classificados como LDGCB, segundo critérios da OMS (Harris et al, 2000), excluindo-se os do tipo plasmablastico.

Para os 82 pacientes que entraram no estudo, foi possível realizar a pesquisa dos antígenos CD10, Bcl-6, CD138, MUM1/IRF4, Bcl-2 e p63 em 73 (89%) casos. Realizou-se análise semi-quantitativa de 500 células tumorais, considerando-se como células positivas apenas aquelas com forte intensidade de expressão dos marcadores. Foram testados dois níveis de corte de 10% e 50%. Os casos com expressão dos marcadores, em pelo menos 10% das células neoplásicas, foram considerados positivos, e aqueles com expressão igual ou superior a 50% como positivos forte.

De acordo com a expressão dos antígenos e com os critérios de Hans et al. (2004), os LDGCB foram subdivididos quanto à origem em CG e NCG. O grupo originado no CG incluía os pacientes CD10+ com ou sem Bcl-6. Se

esses dois marcadores fossem negativos, os pacientes eram considerados como de origem NCG. Nos casos Bcl-6+ e CD10– a expressão de MUM1 determinava o grupo, os MUM1– eram considerados do CG, e os positivos do NCG (Tabela 11).

Tabela 11 – Classificação Imunofenotípica dos LDGCB

Grupo	CG	NCG
Antígenos	CD10+ e/ou Bcl-6 + ou CD10–/Bcl-6+/MUM1–	Bcl-6–/CD10– ou CD10–/MUM1 +

4.3 – Método imuno-histoquímico

A partir dos blocos de parafina, novos cortes histológicos de 4 µm de espessura foram feitos e sobrepostos em lâminas de vidro, previamente tratadas com 3-aminopropil-trietoxisilano. Em seguida, foram aquecidos a 60° C durante uma noite, desparafinados com xilol e reidratados com concentrações decrescentes de etanol até água destilada.

A peroxidase endógena foi bloqueada em solução de peróxido de hidrogênio a 20 volumes, com 4 imersões de 5 minutos cada. Para recuperar os antígenos, os cortes foram imersos em tampão citrato 0,01 mol/L pH 6,0 e

aquecidos em panela de pressão por 3 minutos, exceto para bcl-6 para o qual foi usado o tampão TRIS/EDTA pH 9,0 e 5 minutos na panela de pressão. A seguir, foram lavados em solução de tampão fosfato (PBS).

Tabela 12 – Anticorpos utilizados

Marcador	Clone	Marca	Diluição
CD10	56C6	Novocastra	1:250
CD138	MI15	Dako	1:700
Bcl-2	124	Dako	1:200
MUM-1	MUMIP	Dako	1:500
Bcl-6	P1F6	Novocastra	1:40
p63	4A4	Dako	1:200

A reatividade foi detectada pela incubação com anticorpo secundário de coelho anti-camundongo e complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (DUET, Dako), exceto para o Bcl-6 em que foi usado polímero-peroxidase (Novolink, Novocastra).

Para revelar a reação, empregou-se o cromógeno 3,3 diaminobenzidina e contra coloração com hematoxilina de Harris.

4.4 – Exames iniciais e estadiamento

Os pacientes foram avaliados com anamnese e exame físico completo, incluindo medida dos linfonodos e massas em seu maior diâmetro. Foram submetidos à biópsia incisional ou excisional ao diagnóstico e exames laboratoriais: hemograma completo com contagem de reticulócitos; testes de triagem hepática e renal; dosagem de desidrogenase láctica (DHL); β -2 microglobulina; eletroforese de proteína, sorologias (hepatite B, C, HIV, HTLV I e II, sífilis e chagas); eletrocardiograma; ecocardiograma; radiografia de tórax; tomografia computadorizada (TC) de região cervical, torácica, abdominal e pélvica; biópsia de medula óssea (BMO) bilateral, líquido e cintilografia de corpo inteiro com gálio. A avaliação da MO foi realizada por HE e IH, caso necessário. Pacientes com envolvimento do anel de Waldeyer e/ou acometimento gástrico foram avaliados com endoscopia digestiva alta e exame otorrinolaringológico. Pacientes com LNH primário de seios da face realizaram TC de crânio e seios da face. Para estadiamento, utilizamos os critérios de Ann Arbor (Carbone et al., 1971).

4.5 – Avaliação prognóstica

Na análise univariada, avaliaram-se as variáveis: sexo, DHL, estágio clínico (EC), presença de sintomas B, *bulky*, acometimento EL, MO e resposta à terapêutica primária. Realizou-se análise multivariada para as variáveis que apresentaram impacto na análise univariada.

Foram calculadas curvas de sobrevida, de acordo com a expressão dos marcadores Bcl-6, CD10 e MUM1/IRF4, isoladamente ou agrupados em CG e NCG assim como para Bcl-2 e p63.

Os pacientes submetidos a ATMO foram avaliados quanto ao número de células infundidas, tempo de enxertia, situação no momento do transplante, toxicidade e mortalidade relacionada ao procedimento.

4.6 – Protocolos de tratamento

Os pacientes foram tratados com 6 a 8 ciclos de CHOP ou ProMACE-CytaBOM, de acordo com o estágio clínico. Após obterem RC, foram mantidos em observação ou submetidos a ATMO (Figura 5). Os pacientes que não alcançaram RC receberam resgate com o protocolo IVAC, adotado atualmente pelo serviço ou outro esquema utilizado à época do tratamento.

Os pacientes com *bulky* foram consolidados com radioterapia adjuvante em campo envolvido, quatro semanas após o último ciclo de quimioterapia, ou após o ATMO. A radioterapia adjuvante foi empregada também para LNH primários de seios da face, testículo, osso e anel de Waldeyer. Realizou-se quimioterapia intra-tecal profilática nos casos de LNH primário de testículo, ovário, seios da face ou massa paravertebral, durante o primeiro ciclo de quimioterapia.

A avaliação da terapêutica foi realizada, comparando-se o grupo de 37 pacientes que atingiram RC após quimioterapia convencional e foram mantidos em observação (grupo 1) com os 16 submetidos a ATMO em primeira RC (grupo 2). O ATMO em primeira RC foi proposto a 18 pacientes com diagnóstico, a partir de janeiro de 2000, mas foi realizado em 16, alocando-se os 2 pacientes que não aceitaram realizar o procedimento no grupo 1.

Figura 5 – Fluxograma de tratamento dos 53 pacientes em RC

Os pacientes submetidos a ATMO após RC com CHOP receberam quimioterapia de mobilização com 60 mg/kgdia de ciclofosfamida por dois

dias consecutivos. Com exceção de dois pacientes, os demais foram condicionados com BEAM (Carmustina, Etoposide, Citarabina, Melfano).

A toxicidade dos pacientes, submetidos a ATMO, foi classificada de acordo com os critérios do Instituto Nacional do Câncer (NCI) Norte Americano (Tabela 13). As alterações do trato gastrointestinal foram consideradas como positivas na presença de vômito e/ou diarreia, e a síndrome de oclusão sinusoidal (SOS) hepática, caso houvesse sinais de colestase sem causa obstrutiva aparente.

Tabela 13 – Critérios de Toxicidade

Toxicidade	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
Necessidade transfusional	Ausente	Leve, sem transfusão	1-2 transfusões	3-4 transfusões	>4 transfusões
Infecção	Ausente	Leve	Moderada	Grave	Risco de morte
Hematúria	Ausente	Microscópica	Macroscópica s/ coágulos	Macroscópica c/ coágulos	Necessidade transfusional
Mucosite	Ausente	Leve	Moderada	Grave	I respiratória

4.7 – Avaliação de resposta e acompanhamento sequencial

Para avaliar a resposta à terapêutica inicial, realizou-se análise clínica, laboratorial, BMO e TC de todos os pacientes. Como poucos pacientes realizaram PET-FDG antes do tratamento, o mesmo não foi considerado critério de remissão, conforme atualmente orientado (Cheson et al., 2007).

A RC confirmada foi definida pela ausência de todos os sinais e sintomas relacionados ao linfoma por no mínimo 4 semanas, após término do tratamento. As medidas dos linfonodos e conglomerados linfonodais à TC deveriam ser inferiores a 1,5 cm no maior diâmetro transverso para massas maiores que 1,5 cm e inferior a 1 cm para linfonodos entre 1,1 e 1,5 cm ao diagnóstico. Se houvesse hepatoesplenomegalia ao diagnóstico, a TC de reavaliação deveria demonstrar ausência de ambos. Consideraram-se Remissão Parcial (RP), a redução igual ou superior a 50% da soma dos produtos das duas maiores dimensões perpendiculares das lesões mensuráveis por no mínimo 4 semanas, a ausência de crescimento de lesões pré-existentes, ou o aparecimento de novas lesões ou deterioração das condições clínicas. A redução completa de todos os locais inicialmente comprometidos, porém com persistência de envolvimento de MO, foi considerada RP. Qualquer resposta inferior à parcial foi considerada refratariedade ou ausência de resposta. Progressão de doença ou recidiva foi sinalizada pelo reaparecimento de lesão prévia, aparecimento de novas lesões, ou crescimento igual ou superior a 25% das lesões residuais

(Cheson et al., 1999, 2007). Para essa análise, todos os pacientes foram submetidos à avaliação clínica, laboratorial e radiográfica, incluindo TC, após o quarto ciclo de quimioterapia e ao término do tratamento. A seguir, a mesma avaliação foi realizada como monitoramento a cada 3 meses, nos primeiros 2 anos; a cada 6 meses, nos primeiros 5 anos e, a seguir, anualmente.

4.8 – Análise estatística

As SG e SLD foram analisadas pelo método de Kaplan–Meier. Para cálculo da SG, considerou-se o período entre o início do tratamento e a data do óbito, ou perda de seguimento (última avaliação). Foi considerada a última avaliação, realizada no ano de 2006.

Para os pacientes que não foram avaliados no ano de 2006, efetuaram-se busca ativa e convocação por telegrama ou telefone na ausência de informação de óbito no prontuário médico.

A SLD compreende o período entre a data da remissão e a evidência da primeira progressão, recidiva ou óbito por qualquer causa registrada no prontuário. Os pacientes foram censurados na data da última avaliação ou abandono de tratamento.

Para análise univariada das distintas variáveis de sobrevida, utilizamos o método de log-rank. Na análise multivariada, foram incluídas apenas as variáveis com nível de significância inferior a 0,05; à análise univariada de log-rank, foram utilizados o modelo de regressão de Cox para a SG e regressão logística para SLD. Utilizou-se o modelo de análise retrógrado e, incluídas variáveis com significância mínima de 0,10. Para o cálculo estatístico, foi utilizado o programa SPSS versão 13.0 para Windows.

5. RESULTADOS

5.1 – Características clínico-laboratoriais

Dos 82 pacientes analisados, 53 (64,6%) foram tratados com CHOP, 13 (15,8%) com ProMACE-CytaBOM e 16 (19,5%) com CHOP, seguido de ATMO. A média de idade foi de 38,3 anos (16-60 anos), com distribuição homogênea entre os sexos.

Ao diagnóstico, dos 82 pacientes avaliados, 68 (82,9%) apresentavam sintomas B, e 35 (42,7%) acometimento extralinfonodal (EL) (Tabela 14). A infiltração de medula óssea (MO) ocorreu em 17 (20,7%) casos. A presença de massa tumoral superior ou igual a 10 cm ou volumosas não mensuradas, mas capazes de comprometer o estado funcional do paciente, consideradas como *bulky*, ocorreu em 43 (54,4%) pacientes (Tabela 14).

Houve predomínio de pacientes com dosagem da enzima DHL elevada (90,2%) e estágio clínico avançado (80,48%) (Tabela 14).

Embora tenhamos estudado apenas pacientes de risco intermediário alto e alto, e sabendo-se que não há diferença de sobrevida entre esses dois grupos (Gordon et al., 1995), o IPIa calculado foi intermediário alto em 51 (62,2%) pacientes e alto em 31 (37,8%) (Tabela 14).

Tabela 14 – Características clínicas dos 82 pacientes avaliados

	TOTAL	
	n	%
F	36	43,9
M	46	56,1
Sintomas B	68	82,9
EL	35	42,7
MO	17	20,7
<i>Bulky</i>	43	52,4
DHL elevada	74	90,2
EC III e IV	66	80,5
IPIa alto risco	31	37,8
TOTAL	82	100

A comparação das características clínicas do grupo de pacientes que alcançou RC, após poliquimioterapia à base de antraciclina, e que foi mantido em observação (Grupo 1) com aqueles que realizaram ATMO após RC com CHOP (Grupo 2), demonstrou distribuição homogênea entre os dois grupos, exceto o EC avançado, observado em 100% dos submetidos a ATMO em primeira RC e em 72,97% dos mantidos em observação ($p = 0,018$) (Tabela 15).

Tabela 15 – Características clínicas dos 53 pacientes em RC após quimioterapia.

	CHOP ou		CHOP + TMO		TOTAL		P
	ProMACE-	CytaBOM					
	n	%	n	%	n	%	
F	14	37,8	9	56,2	23	43,4	0,174
M	23	62,2	7	43,8	30	56,5	-
Idade (Anos)	37,16	-	40,06	-	-	-	0,432
Sintomas B	30	81,1	14	87,5	44	83	0,446
EL	17	45,9	6	37,5	23	43,4	0,397
MO	7	18,9	6	37,5	13	24,5	0,137
<i>Bulky</i>	15	40,5	7	43,8	22	41,5	0,531
DHL elevada	34	91,9	15	93,8	49	92,5	0,650
EC III e IV	27	72,97	16	100	43	81,13	0,018
IPIa alto risco	13	35,13	9	56,25	22	41,5	0,130
TOTAL	37	100	16	100	53	100	-

5.2 – Características imuno-histoquímicas

Os marcadores imuno-histoquímicos foram pesquisados em 73 (89%) pacientes dos 82 estudados (Tabela 16). Os casos com expressão superior ou igual a 10% das células neoplásicas foram considerados positivos, e aqueles com expressão superior ou igual a 50% como positivo forte.

Tabela 16 – Marcadores imuno-histoquímicos nos 73 pacientes

	Positivo		Positivo Forte		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%
CD 10	-	-	14	100	14	19,2
Bcl-6	20	55,6	16	44,4	36	49,3
MUM-1	22	56,4	17	43,6	39	53,4
Bcl-2	10	37	17	63	27	37
p63	26	84,9	11	15,1	37	50,7
TOTAL	-	-	-	-	73	100

A expressão do antígeno CD138 não foi observada em nenhum paciente, não sendo possível sua utilização para cálculo de sobrevida. O antígeno CD10 foi positivo em 14 (19,2%) pacientes, desses, 100% o expressavam em 50% ou mais das células neoplásicas (Figuras 6 e 7).

O antígeno Bcl-6 foi positivo em 36 (49,3%) pacientes, com expressão forte em 16 (44,4%) casos (Figuras 8 e 9). O antígeno MUM-1 foi positivo em 39 (53,4%) pacientes, desses, 17 (43,6%) apresentavam marcação fortemente positiva (Figuras 10 e 11).

O antígeno Bcl-2 foi positivo em 37% (27) dos casos, sendo que 17 (63%) pacientes a expressavam fortemente (Figuras 12 e 13). Dos 73 pacientes avaliados, 37 (50,7%) expressaram a proteína p63, as quais foram positivas forte em 11 (15,1%) casos (Figuras 14 e 15).

Figura 6 – Lâmina de IH, demonstrando expressão positiva de CD10 em 10% ou mais células (caso ilustrativo)

Figura 7 – Lâmina de IH, demonstrando expressão positiva de CD10 em 50% ou mais células

Figura 8 – Lâmina de IH, demonstrando expressão positiva de Bcl-6 em 10% ou mais células

Figura 9 – Lâmina de IH, demonstrando expressão positiva de Bcl-6 em 50% ou mais células

Figura 10 – Lâmina de IH, demonstrando expressão positiva para MUM-1 em 10% ou mais células

Figura 11 – Lâmina de IH, demonstrando expressão positiva para MUM-1 em 50% ou mais das células

Figura 12 – Lâmina de IH, demonstrando expressão positiva de Bcl-2 em 10% ou mais células

Figura 13 – Lâmina de IH, demonstrando expressão positiva de Bcl-2 em 50% ou mais células

Figura 14 – Lâmina de IH, demonstrando expressão positiva de p63 em 10% ou mais células

Figura 15 – Lâmina de IH, demonstrando expressão positiva de p63 em 50% ou mais células

Quanto à origem celular, consideramos que os casos com positividade isolada para CD10 ou com expressão concomitante de Bcl-6 e CD10, e os casos MUM1– e Bcl-6+ deveriam ser classificados como tendo origem em células do CG, perfazendo um total de 24 (32,9%) pacientes. O segundo grupo composto por 49 (67,1%) pacientes que foram categorizados como tendo origem em células pós-centro germinativo (NCG). Nesse grupo, incluíram-se pacientes CD10 e Bcl-6 negativos e/ou Bcl-6+/CD10–/MUM1+ (Tabela 17).

Tabela 17 – Origem celular

Origem	Total	
	n	%
C Germinativo	24	32,9
NC Germinativo	49	67,1
Total	73	100

A distribuição das características clínicas entre os dois grupos definidos pela expressão antigênica foi homogênea (Tabela 18).

Tabela 18 – Características clínicas segundo a origem celular

	CG		NCG		TOTAL		P
	n	%	n	%	n	%	
F	10	41,7	21	42,9	31	42,5	0,563
M	14	58,3	28	57,1	42	57,7	-
Sintomas B	21	87,5	42	85,7	63	86,3	0,573
EL	7	29,2	25	51	32	43,8	0,064
MO	4	16,7	12	24,5	16	21,9	0,33
<i>Bulky</i>	12	50	24	49	36	49,3	0,566
DHL elevada	22	91,7	44	89,8	66	90,4	0,582
EC III e IV	19	79,2	39	79,6	58	79,5	0,597
IPla Alto risco	7	29,2	19	38,8	26	35,6	0,295
TOTAL	24	100	49	100	73	100	-

Quando comparamos os marcadores IH entre o grupo de pacientes que atingiu RC após quimioterapia e que foram mantidos em observação (Grupo 1) com os que realizaram ATMO após RC (Grupo 2), encontramos distribuição homogênea. Com exceção da expressão de Bcl-6, positiva, em 78,6% dos casos submetidos a ATMO, em primeira RC e em 45,5% dos mantidos em observação ($p = 0,037$) (Tabela 19).

Tabela 19 – Distribuição dos marcadores dos 47 pacientes em RC após quimioterapia

	CHOP ou ProMACE- CytaBOM		CHOP + TMO		TOTAL		P
	n	%	n	%	n	%	
CD 10	4	12,1	4	28,6	8	17	0,17
Bcl-6	15	45,5	11	78,6	26	55,3	0,037
MUM-1	15	45,5	10	71,4	25	53,1	0,094
Bcl-2	9	27,3	5	35,7	14	29,7	0,402
p63	18	54,5	8	57,1	26	55,3	0,564
TOTAL	33	100	14	100	47	100	-

Onze (33,3%) dos pacientes que atingiram RC e foram mantidos em observação tiveram origem no CG, e 22 (66,7%) NCG. Dos pacientes submetidos a ATMO em RC (Grupo 2), a maioria foi classificada como NCG (Tabela 20).

Tabela 20 – Origem celular dos 47 pacientes em RC após quimioterapia

Origem	CHOP ou ProMACE- CytaBOM		CHOP + TMO		Total	
	n	%	n	%	n	%
C Germinativo	11	33,3	6	42,9	17	36,1
NC Germinativo	22	66,7	8	57,1	30	63,9
Total	33	100	14	100	47	100

p = 0,38

5.3 – Avaliação da terapia de primeira linha

As taxas de RC, SG e SLD foram calculadas para os 82 pacientes incluídos no estudo, avaliando-se o impacto das variáveis clínicas, laboratoriais e dos marcadores imunofenotípicos, isoladamente e agrupados.

Calculamos a SLD e a SG dos pacientes que atingiram RC com quimioterapia à base de antraciclina, os quais foram mantidos em observação (Grupo 1), comparando-os com os submetidos a ATMO após RC com quimioterapia (Grupo 2). Dos 82 pacientes, 53 (64,63%) obtiveram RC (IC (95%) = 63,45; 65,74) (Figura 16).

Figura 16 – Taxa de Remissão Completa dos 82 pacientes avaliados

Com mediana de acompanhamento dos 82 pacientes de 19,4 meses e de 51 meses dos 37 vivos, a SG em 60 meses foi de 42,8%, com tempo médio de 74,9 meses (IC(95%) = 56,5; 93,2) (Figura 17).

Figura 17 – Sobrevida Global dos 82 pacientes avaliados

Em 60 meses, a SLD foi de 56,5%, com tempo médio de 87 meses (IC(95%) = 63,71; 110,29) (Figura 18).

Figura 18 – Sobrevida Livre de Doença dos 82 pacientes avaliados

A mediana de acompanhamento dos pacientes que alcançaram RC foi de 34 meses. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,11$) quanto à SG entre os pacientes submetidos a ATMO após RC com CHOP (Grupo 2), e os que atingiram RC e não foram submetidos a ATMO (Grupo 1). Embora com tendência favorável para o grupo submetido a ATMO, a SG foi de 53,3% em 60 meses, no grupo 1, com tempo médio de 91,7 meses (IC(95%) = 67,2; 116,2) e de 75% em 60 meses, com tempo médio de 59,93 meses (IC(95%) = 48,57; 71,3), no grupo 2 (Figura 19).

$p = 0,11$

Figura 19 – Sobrevida Global após RC com ou sem ATMO

A SLD foi calculada apenas para os pacientes que atingiram RC, apresentando diferença estatisticamente significativa ($p = 0,015$) para os pacientes submetidos a ATMO em RC após CHOP (Grupo 2), em relação aos que foram mantidos em observação (Grupo 1). Em 60 meses, a SLD do grupo 1 foi de 45,9%, com tempo médio de 71,72 meses (IC(95%) = 46,72; 96,72); e de 85,2% no grupo 2, com tempo médio de 56,85 meses (IC(95%) = 45,94; 67,76) (Figura 20).

$p = 0,015$

Figura 20 – Sobrevida Livre de Doença após RC com ou sem ATMO

Entre os pacientes submetidos a ATMO em RC, observamos um único óbito, no qual foi secundária a síndrome de oclusão sinusoidal (SOS). Com mediana de acompanhamento de 28 meses, apenas um (6,3%) caso do grupo submetido à ATMO (Grupo 2) apresentou recaída da doença, a qual ocorreu seis meses após o ATMO. No grupo que alcançou RC e foi mantido em observação (Grupo 1), a taxa de recidiva foi de 56,8%, com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo submetido a ATMO ($p < 0,0001$) (Figura 21).

$p < 0,0001$

Figura 21 – Taxa de recidiva por grupo de tratamento

Todos os pacientes que fizeram quimioterapia de mobilização receberam dois dias consecutivos de 60 mg/kg/dia de ciclofosfamida e fator estimulador de colônia de granulócitos. Apenas um paciente não recebeu quimioterapia de mobilização, e 14 dos 16 foram condicionados com o protocolo BEAM. A mediana de células CD34 coletadas e infundidas foi de $3,01 \times 10^6$ CD34+cels/kg, sendo 15 coletas de células tronco periférica e uma de MO. A mediana de enxertia, após infusão das células tronco, foi de 11 dias.

As principais toxidades relacionadas ao ATMO foram hematológicas e infecciosas (Tabela 21).

Tabela 21 – Principais toxicidades relacionadas ao ATMO

	n	%
Transfusão	16	100
Infecção	13	81,25
TGI	11	68,67
Mucosite	11	68,67
SOS	1	6,25
Hematúria	1	6,25
TOTAL	16	100

5.4 – Avaliação dos fatores de prognóstico

5.4.1 – Fatores clínico-laboratoriais

Não houve diferença, estatisticamente significativa, quanto à RC ($p = 0,542$), SLD ($p = 0,217$) e SG ($p = 0,465$), em relação ao sexo nos 82 pacientes avaliados (Figuras 22, 23 e 24).

$p = 0,542$

Figura 22 – Taxas de Remissão Completa em relação ao sexo

$p = 0,465$

Figura 23 – Sobrevida Global em relação ao sexo

$p = 0,217$

Figura 24 – Sobrevida Livre de Doença em relação ao sexo

Nos 82 pacientes avaliados, a presença de sintomas B não teve impacto nas taxas de RC ($p = 0,601$), SG ($p = 0,41$) e SLD ($p = 0,937$) (Figuras 25, 26 e 27).

$p = 0,601$

Figura 25 – Taxas de Remissão Completa em relação aos Sintomas B

$p = 0,41$

Figura 26 – Sobrevida Global em relação aos Sintomas B

$p = 0,973$

Figura 27 – Sobrevida Livre de Doença em relação aos Sintomas B

A taxa de RC para os pacientes em estágio avançado foi semelhante à dos estádios precoces ($p = 0,53$). Dos 82 pacientes, 66 (80,5%) apresentavam EC avançado (III e IV), com SG de 41,6%, em 60 meses. Os pacientes com EC precoce (I e II) apresentaram SG de 48,1% ($p = 0,602$). A SLD para os pacientes com EC precoce também não foi superior aos avançados ($p = 0,282$) (Figuras 28, 29 e 30).

$p = 0,53$

Figura 28 – Taxas de Remissão Completa em relação ao estágio clínico

$p = 0,602$

Figura 29 – Sobrevida Global em relação ao estágio clínico

$p = 0,282$

Figura 30 – Sobrevida Livre de Doença em relação ao estágio clínico

Os pacientes com *bulky* apresentaram menor tendência para aquisição de RC ($p = 0,07$). Dos 43 pacientes com *bulky*, 51,1% atingiram RC (IC(95%) = 48,92; 53,47) contra 79,5% dos sem *bulky* (IC(95%) = 77,47; 81,52) (Figura 31).

A SG foi de 33,7% em 60 meses, com tempo médio de 59,3 meses (IC(95%) = 35,4; 83,1), para pacientes com *bulky* e de 53,4% para os sem *bulky*, com tempo médio de 88,6 meses (IC(95%) = 63,2; 114) ($p = 0,03$). O mesmo não foi observado para a SLD no grupo dos 82 pacientes. Os

pacientes sem *bulky* apresentaram SLD, em 60 meses, de 59,1%, sem diferença estatisticamente significativa para os com *bulky* ($p = 0,841$) (Figuras 32 e 33).

$p = 0,07$

Figura 31 – Taxa de Remissão Completa em relação à presença de Bulky

$p = 0,03$

Figura 32 – Sobrevida Global em relação à presença de Bulky

$p = 0,841$

Figura 33 – Sobrevida Livre de Doença em relação à presença de Bulky

Não houve diferença significativa entre pacientes com doença extralinfonodal ou linfonodal, restrita para os 82 pacientes em relação à RC ($p = 0,524$), SG ($p = 0,97$) e SLD ($p = 0,611$) (Figuras 34, 35 e 36).

$p = 0,524$

Figura 34 – Taxas de Remissão Completa em relação ao acometimento extralinfonodal

$p = 0,97$

Figura 35 – Sobrevida Global em relação ao acometimento extralinfofodal

$p = 0,611$

Figura 36 – Sobrevida Livre de Doença em relação ao acometimento extralinfofodal

A infiltração de MO não foi fator de significância estatística ($p = 0,196$) para RC, SG ($p = 0,301$) ou SLD ($p = 0,972$) nos 82 pacientes (Figuras 37, 38 e 39).

$p = 0,196$

Figura 37 – Taxas de Remissão Completa em relação ao acometimento da Medula Óssea

$p = 0,30$

Figura 38 – Sobrevida Global em relação ao acometimento da Medula Óssea

$p = 0,972$

Figura 39 – Sobrevida Livre de Doença com relação ao acometimento da Medula Óssea

A dosagem de DHL elevada não influenciou as taxas de RC ($p = 0,294$), SG ($p = 0,68$) ou SLD ($p = 0,974$) (Figuras 40, 41 e 42).

$p = 0,294$

Figura 40 – Taxas de Remissão Completa em relação à dosagem de DHL

$p = 0,685$

Figura 41 – Sobrevida Global em relação à dosagem de DHL

$p = 0,974$

Figura 42 – Sobrevida Livre de Doença em relação à dosagem de DHL

Conforme se esperava, não houve diferença de RC ($p = 0,244$), SG ($p = 0,768$) ou SLD ($p = 0,636$) entre pacientes de IPI de risco intermediário alto ou alto (Figuras 43, 44 e 45).

$p = 0,244$

Figura 43 – Remissão Completa em relação ao IPIa

$p = 0,768$

Figura 44 – Sobrevida Global em relação ao IPIa

$p = 0,636$

Figura 45 – Sobrevida Livre de Doença em relação ao IPIa

Os 16 pacientes submetidos a ATMO em RC, após a quimioterapia de indução com CHOP, apresentaram SG de 75% em 60 meses, com tempo médio de 59,93 meses (IC(95%) = 48,57; 71,3) e SLD de 85,2% em 60 meses, com tempo médio de 56,85 meses (IC(95%) = 45,94; 67,76). Os 66 que não foram submetidos a ATMO apresentaram SG de 35,2% em 60 meses, com tempo médio de 63,6 meses (IC(95%) = 45,3; 81,9) e SLD de 45,9% em 60 meses, com tempo médio de 71,72 meses (IC(95%) = 46,72; 96,72), com p de 0,004 e 0,015, respectivamente (Figura 46 e 47).

$p = 0,004$

Figura 46 – Sobrevida Global dos 82 pacientes em relação ao ATMO em primeira RC

$p = 0,015$

Figura 47 – Sobrevida Livre de Doença dos 82 pacientes em relação ao ATMO em primeira RC

Os pacientes, que entraram em RC com tratamento de primeira linha, alcançaram SG de 59,4% em 60 meses, com tempo médio de 100,2 meses (IC(95%) = 77,5; 123,04); valor superior ao dos que não atingiram RC ($p < 0,0001$) (Figura 48).

$p < 0,0001$

Figura 48 – Sobrevida Global em relação à resposta ao primeiro tratamento

5.4.2 – Marcadores Imuno-histoquímicos

Os marcadores imuno-histoquímicos foram avaliáveis em 73 pacientes. Foram considerados como positivos os casos em que 10% ou mais das células foram coradas pelo respectivo anticorpo, e positivos fortes aqueles nos quais pelo menos 50% das células foram coradas pelo respectivo anticorpo.

Foram feitas análises das taxas de RC e curvas de SG e SLD para todos os 73 pacientes. Não foi possível avaliar o impacto prognóstico da expressão de CD138, pois todos os casos foram negativos.

Dos 73 pacientes, 14 (19,2%) foram CD10+; desses, 8 (57,4%) (IC(95%) = 50,17; 54,02) atingiram RC. No grupo CD10–, 39 (66,1%) (IC(95%) = 64,52; 67,67) obtiveram RC ($p = 0,369$). A SG, em 60 meses para os CD10+, foi de 49%, sem diferença estatisticamente significativa em relação aos negativos ($p = 0,646$). A SLD também não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,342$) (Figuras 49, 50 e 51).

$p = 0,369$

Figura 49 – Taxas de Remissão Completa em relação à presença de CD10

$p = 0,646$

Figura 50 – Sobrevida Global em relação à presença de CD10

$p = 0,342$

Figura 51 – Sobrevida Livre de Doença em relação à presença de CD10

Nos 73 pacientes avaliados por IH, a proteína Bcl-6 foi positiva em 36 (49,3%) casos, desses, 26 (72,2%) (IC(95%) = 69,76; 74,63) atingiram RC. Dos casos Bcl-6–, 21 (56,7%) (IC(95%) = 54,17; 59,42) obtiveram RC ($p = 0,128$). Os 36 casos Bcl-6+ apresentaram SG de 43% em 60 meses, sem diferença estatisticamente significativa em relação aos negativos ($p = 0,85$). A SLD também não foi influenciada pela expressão de Bcl-6 ($p = 0,816$) (Figuras 52, 53 e 54).

$p = 0,128$

Figura 52 – Taxas de Remissão Completa em relação à presença de Bcl-6

$p = 0,85$

Figura 53 – Sobrevida Global em relação à presença de Bcl-6

$p = 0,816$

Figura 54 – Sobrevida Livre de Doença em relação à presença de Bcl-6

Embora o marcador MUM-1 esteja relacionado com origem em células B ativadas e pior prognóstico, os pacientes MUM-1+ não apresentaram diferença significativa quanto à RC (64,1%) (IC(95%) = 61,68; 66,51), quando comparados aos MUM-1 negativos (64,7%) (IC(95%) = 61,94; 67,45) ($p = 0,576$) (Figura 55). Dos 73 pacientes, os 39 (53,4%) com MUM-1+ apresentaram SG em 60 meses de 46,8%, sem diferença estatisticamente significativa em relação aos negativos ($p = 0,95$). A SLD

também não foi influenciada pela expressão de MUM-1 ($p = 0,795$) (Figuras 56 e 57).

$p = 0,576$

Figura 55 – Remissão Completa em relação à presença de MUM-1

$p = 0,95$

Figura 56 – Sobrevida Global em relação à presença de MUM-1

$p = 0,795$

Figura 57 – Sobrevida Livre de Doença em relação à presença de MUM-1

Dos 73 pacientes, 27 (37%) foram Bcl-2+. Desses, 14 (51,8%) (IC(95%) = 48,27; 55,52) atingiram RC contra 33 (72%) (IC(95%) = 69,78; 73,61) do grupo Bcl-2-, com tendência favorável para o grupo Bcl-2- ($p = 0,07$) (Figura 58).

$p = 0,07$

Figura 58 – Remissão Completa em relação à presença de Bcl-2

O marcador Bcl-2 foi o único com significância estatística ($p = 0,004$) para SG. Nos 73 pacientes avaliados, os casos Bcl-2+ tiveram SG em 60 meses de 16,4%, com tempo médio de 34,38 meses (IC(95%) = 17,3; 51,4), enquanto os Bcl-2- tiveram SG em 60 meses de 58,1%, com tempo médio de 95,4 meses (IC(95%) = 71,2; 119,6) (Figura 59).

$p = 0,004$

Figura 59 – Sobrevida Global em relação à presença de Bcl-2

Embora sem significância estatística ($p = 0,12$), pacientes Bcl-2+ apresentaram tendência a menor SLD, 34% em 60 meses; em relação ao grupo negativo, 65,6% em 60 meses (Figura 60).

$p = 0,12$

Figura 60 – Sobrevida Livre de Doença em relação à presença de Bcl-2

Dos 73 pacientes avaliados, 37 (50,7%) apresentaram expressão de p63. Desses, 26 (70,3%) (IC(95%) = 55,6; 85) atingiram RC contra 21 (58,3%) (IC(95%) = 42,2; 74,4) do grupo p63– ($p = 0,21$) (Figura 61).

$p = 0,21$

Figura 61 – Remissão Completa em relação à presença de p63

Nos 73 pacientes avaliados, os casos p63– tiveram SG em 60 meses de 32,2%, com tempo médio de 64,95 meses (IC(95%) = 40,11; 89,79), enquanto os p63+ tiveram SG em 60 meses de 50,5%, com tempo médio de 71 meses (IC(95%) = 46,36; 95,68) ($p = 0,176$) (Figura 62).

$p = 0,176$

Figura 62 – Sobrevida Global em relação à presença de p63

A SLD em 60 meses para os casos p63– foi de 41,9%, com tempo médio de 70,84 meses (IC(95%) = 37,87; 103,82), enquanto os p63+ tiveram SLD em 60 meses de 70,1%, com tempo médio de 100,67 meses (IC(95%) = 69,07; 132,28) ($p = 0,062$) (Figura 63).

$p = 0,062$

Figura 63 – Sobrevida Livre de Doença em relação à presença de p63

Quando consideramos como positivos apenas os pacientes que expressavam os marcadores em pelo menos 50% das células (fortemente positivos), somente a proteína p63 apresentou diferença em relação aos resultados obtidos, quando se consideraram como positivos os casos com valores iguais ou superiores a 10%. A SG em 60 meses, nos casos p63 fortemente positivo, foi de 69,3% com tempo médio de 123,65 meses (IC(95%) = 76,71; 170,6), sem diferença estatisticamente significativa em relação aos casos com expressão ($p = 0,109$). A SLD em 60 meses dos p63+ em menos de 50% das células foi de 49,6% e de 100% para os oito pacientes com expressão maior ou igual a 50% das células, com diferença estatisticamente significativa ($p = 0,016$) (Figuras 64 e 65).

$p = 0,109$

Figura 64 – Sobrevida Global em relação à expressão de p63, utilizando ponto de corte de 50% de células positivas

$p = 0,016$

Figura 65 – Sobrevida Livre de Doença em relação à expressão de p63, utilizando ponto de corte de 50% de células positivas

5.4.3 – Modelo Imuno-histoquímico

A associação dos marcadores IH, segundo o modelo definido, (Tabela 11) possibilitou dividir os 73 pacientes em dois grupos, segundo a origem celular. Vinte e quatro (32,9%) foram classificados como de origem no CG e 49 (61,7%) como NCG. A taxa de RC para os pacientes com fenótipo de CG foi de 70,8% (IC(95%) = 67,08; 74,51), e os NCG de 61,2% (IC(95%) = 59,25; 63,14) ($p = 0,29$) (Figura 66).

$p = 0,29$

Figura 66 – Taxas de Remissão Completa para os originados CG e NCG

A SG não foi influenciada pelo modelo imuno-histoquímico adotado. Nos 73 pacientes avaliados, os de origem no CG apresentaram SG em 60 meses de 46,8%, com tempo médio de 84,38 meses (IC(95%) = 52,28;

116,48), enquanto os NCG tiveram SG em 60 meses de 43,3%, com tempo médio de 73,26 meses (IC(95%) = 50,8; 95,6) ($p = 0,885$). A SLD em 60 meses para os pacientes do CG foi de 60,8% e, para os NCG, de 55,3% ($p = 0,365$) (Figuras 67 e 68).

$p = 0,885$

Figura 67 – Sobrevida Global para os originados no CG e NCG

$p = 0,365$

Figura 68 – Sobrevida Livre de Doença para os originados no CG e NCG

5.4.4 – Análise multivariada

Quando realizada análise multivariada com os quatro fatores que influenciaram a SG para os 82 pacientes, permaneceram, como fator preditor independente, o marcador Bcl-2 ($p = 0,07$) com risco relativo (RR) de 2,55 (IC(95%) = 1,29; 5,04) e a resposta à terapêutica primária ($p < 0,0001$) com RR de 5,93 (IC(95%) = 2,79; 12,59).

Para realizar a análise multivariada para a SLD com os dois fatores que tiveram impacto em análise univariada, foi necessária a utilização do método de regressão logística, pois não houve eventos (recidiva ou óbito) no grupo p63 fortemente positivo, o que impossibilitou utilizar a regressão de cox. Assim, por esse método, o único que permaneceu como fator preditor independente para SLD foi a realização de ATMO em primeira RC com p de 0,02 e RR de 0,13 (IC(95%) = 0,02; 0,74).

Não foi possível realizar análise multivariada para RC, pois nenhum fator clínico, laboratorial ou IH a influenciou na análise univariada.

6. DISCUSSÃO

6.1 – Tratamento

A partir do melhor conhecimento das características biológicas da célula tumoral, novas possibilidades terapêuticas têm surgido. As expectativas dos clínicos em melhorar a sobrevida dos pacientes não raramente os levam a adotar novas modalidades terapêuticas em detrimento às já consagradas e validadas, terminando, por vezes, por aumentar a toxicidade e o custo, sem proporcional ganho em eficácia.

Atualmente, a associação do anticorpo monoclonal anti-CD20 (Rituximabe) à quimioterapia é considerada padrão para pacientes com LDGCB. Entretanto, os estudos randomizados realizados até o momento, para avaliar essa associação em LDGCB, selecionaram pacientes acima dos 60 anos de idade (Coiffier et al., 2002; Feugier et al., 2005), ou jovens de IPIa de risco intermediário baixo e baixo (Pfreundschuh et al., 2006), ou não foram desenhados com intenção de avaliar o impacto do IPI na resposta a R-CHOP (Sehn et al., 2005). Portanto não há estudos randomizados, envolvendo pacientes de alto risco, demonstrando melhora na sobrevida desses, quando se inclui o Rituximabe à quimioterapia convencional, sendo exatamente esses pacientes que ainda permanecem com alto índice de doença incurável. Por outro lado, em decorrência de seu alto custo, o Rituximabe não está disponível na maior parte da rede pública de saúde dos

países em desenvolvimento. Neste sentido, uma outra opção factível para os pacientes de alto risco é o emprego de esquemas de primeira linha mais agressivos, objetivando elevar a taxa de sobrevida. Estima-se que, no Brasil, o custo médio do ATMO seja de 11500 dólares (Ministério da Saúde, 2000), enquanto, nos Estados Unidos da América, o custo médio de seis ciclos de R-CHOP é de 17225 dólares (Hournberger et al., 2005).

De acordo com a hipótese de Goldie e Coldman (1984), ao incremento do número e/ou da intensidade de dose de drogas deveria haver correspondente melhora na sobrevida. Nesse sentido, vários protocolos com a adição de novas drogas como etoposide e metotrexate, ou intensificação de dose das drogas previamente utilizadas, ou a redução no intervalo entre os ciclos de quimioterapia foram avaliados com resultados desapontadores. Os esquemas de terceira geração como MACOP-B, ProMACE-CytaBOM, COP-BLAM IV e LNH-84 não mudaram a sobrevida dos pacientes (Fisher et al., 1983; Hallack Neto et al., 2004).

Posteriormente a esses estudos, foram empreendidos outros, utilizando ATMO após quimioterapia seqüencial. Os resultados, porém, foram imprecisos, e nenhum deles utilizou o ATMO como consolidação após RC, obtida com quimioterapia convencional, contendo antraciclina ou semelhante ao CHOP. Recentemente, uma metanálise de 15 estudos randomizados de avaliação do impacto do ATMO em LNH agressivo não apresentou nenhum estudo em que essa terapia tenha sido empregada, após 8 ciclos de CHOP. Conclui-se, porém, que o ATMO não deve ser indicado em pacientes com IPLa de risco intermediário baixo e baixo em primeira RC. Não há, pois,

evidências suficientes para definição da indicação, ou não do ATMO em pacientes com LDGCB de risco intermediário alto e alto (Greb et al., 2007). Por outro lado, conforme estudos prévios realizados em nossa instituição, esse é o grupo de maior risco de falha com a terapêutica convencional (Vecina et al., 2002; Hallack Neto et al., 2004).

Portanto a utilização de ATMO como consolidação para LDGCB em RC, após terapia convencional, permanece obscura (Shipp et al., 1999). Enquanto alguns estudos demonstram superioridade da poliquimioterapia sobre poliquimioterapia, seguida de consolidação com ATMO (Gisselbrecht et al., 2002), outros encorajam essa modalidade terapêutica (Haioun et al., 2000), principalmente devido à pequena taxa de cura com terapia convencional, inferior a 50%, sendo o LNH-87 um dos mais importantes estudos randomizados com LDGCB de alto risco e consolidação com ATMO (Haioun et al., 2000).

O presente estudo avaliou apenas pacientes com IPLa de risco intermediário alto e alto, enfatizando o ATMO como consolidação após RC com quimioterapia convencional (CHOP/ProMACE-CytaBOM). Observamos resultados semelhantes aos da literatura com RC de 64,3%, SG de 42,8% e SLD de 56,7% (The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993).

A distribuição das variáveis clínicas e imunológicas avaliadas foram homogêneas entre os dois grupos de tratamento utilizado, exceto o estágio clínico avançado e a expressão de Bcl-6 mais freqüentes no grupo que

recebeu ATMO em 1ª RC. Entretanto, a análise individual dessas variáveis não influenciou a RC, SG ou a SLD.

À análise univariada dos 82 pacientes avaliados, o ATMO teve impacto na SG, com superioridade para os pacientes submetidos ao ATMO, em relação aos que receberam quimioterapia convencional e foram mantidos em observação, ou que não obtiveram RC com o primeiro esquema de tratamento – 75% e 31,7% ($p=0,004$), respectivamente. Mas, na análise multivariada, o ATMO não permaneceu como fator de prognóstico independente para a SG.

A análise comparativa da SG entre o grupo de pacientes que obteve RC e foi submetido a ATMO, e o grupo que atingiu RC e foi mantido em observação, demonstrou tendência a maior sobrevida para o primeiro grupo, 75% e 53,3%, respectivamente, embora sem diferença estatisticamente significativa ($p = 0,11$). Isso poderia ter sido confirmado, caso tivéssemos analisado maior número de pacientes, pois nossos resultados são semelhantes aos obtidos em estudos que evidenciaram melhora da sobrevida com ATMO (Haoun et al., 2000; Milpied et al., 2004). É possível que o fato de termos avaliado somente pacientes em RC, uma das variáveis mais relevantes de SG em LDGCB em nossa instituição, tenha influenciado nossos resultados (Hallack et al., 2004).

A mediana de tempo entre o início do tratamento do LNH e o ATMO e entre o término da quimioterapia e o ATMO foi de 9,5 meses e de 4 meses, respectivamente, o que geralmente não influencia a SG (Greb et al., 2007).

Em contraposição à literatura (Greb et al., 2007), a SLD de 85,2% dos pacientes submetidos a ATMO foi superior, na análise univariada, à dos mantidos em observação após os oito ciclos de quimioterapia (45,9%) ($p = 0,015$), permanecendo também, na análise multivariada, como único fator de prognóstico independente para SLD. Esse resultado traduziu-se em baixa taxa de recidiva (6,5%) no grupo do ATMO, em comparação à alta taxa de recidiva dos pacientes em RC e apenas observados (56,75%), com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).

A única recidiva no grupo do ATMO ocorreu apenas seis meses após o transplante. De forma oposta, as recidivas dos pacientes mantidos em observação que ocorreram mais tardiamente, mediana de 17 meses, após o término do tratamento. Dessa forma é possível inferir que a recidiva, após ATMO, ocorreu em paciente portador de doença com características muito agressivas e que, talvez, as recidivas, que ocorreram no grupo mantido em observação após RC, poderiam ter sido evitadas, se os mesmos tivessem sido consolidados com ATMO, em primeira RC.

Além dos bons resultados obtidos com ATMO em primeira RC, a mortalidade decorrente do tratamento foi muito baixa. Ocorreu em um único paciente que foi para o ATMO com estado funcional ruim. A taxa de mortalidade, observada em nosso estudo, ficou próxima à de outros estudos, utilizando quimioterapia em altas doses, seguida de ATMO (5,7%) (Greb et al., 2007).

Uma das consequências indesejadas do ATMO é o desenvolvimento de síndrome mielodisplásica (SMD) secundária ou leucemia mielóide aguda

(LMA) secundária. Em 10 anos, o risco de desenvolvimento de LMA ou SMD secundária, após ATMO, para LH ou LNH é de 6,8% (Kalaycio et al., 2006). Embora com período curto de acompanhamento, mediana de 28 meses, não observamos nenhum caso de SMD/LMA, após ATMO, em nossa casuística.

6.2 – Avaliação de Prognóstico

6.2.1 – Fatores clínico-laboratoriais

O IPI é o índice de prognóstico mais utilizado na abordagem de pacientes com LDGCB (Shipp et al., 1993). Em nossa instituição, esse índice foi reproduzido, confirmando que pacientes com IPI de risco intermediário alto e alto têm sobrevida inferior aos de baixo risco (Vecina et al., 2002; Hallack Neto et al., 2004).

Entretanto, pacientes com LDGCB alocados, em um mesmo grupo de risco, segundo o IPI, podem apresentar desfechos clínicos distintos, não esperados, apesar de submetidos ao mesmo tratamento. Dessa forma, se faz necessário entender a causa desses comportamentos inesperados.

Após revisão centralizada, avaliamos 82 pacientes com LDGCB, com o objetivo de identificar fatores clínicos e imunológicos, capazes de individualizar subgrupos de risco dentro do grupo de pacientes de IPIa de risco intermediário alto e alto.

Assim como na literatura, houve predomínio do sexo masculino, mas sem impacto na sobrevida (Shipp et al., 1997). As características hormonais e imunológicas de homens e mulheres e o grau de exposição a agentes externos como solventes e pesticidas podem explicar a maior incidência de LNH no sexo masculino (Rabkin et al., 1997).

Como esperado para pacientes com IPI de alto risco, houve predomínio de estágio clínico avançado (80,2%) e DHL elevada (90,4%) em nossa casuística. De forma oposta ao observado para pacientes com LDGCB e IPI de baixo e alto risco (Hallack Neto et al., 2004), essas duas variáveis não apresentaram impacto na sobrevida dos pacientes de mais alto risco. Não houve diferença na RC, SLD ou SG entre pacientes de IPIa de risco intermediário alto e de alto risco, que se distribuíram homoganeamente entre os pacientes estudados.

De forma distinta à observada em nossa casuística de pacientes de IPIa adaptado de baixo e alto risco, quando tínhamos impacto apenas na taxa de RC (Hallack Neto et al., 2004), a presença de *bulky* foi o único fator clínico capaz, em análise univariada, de influenciar a SG, mas sem impacto na SLD. É possível que a presença de *bulky* seja capaz de influenciar indiretamente a SG, por apresentar valores próximos da significância estatística para obtenção de RC ($p = 0,07$). Essa hipótese pode ser corroborada pelo fato de a SLD, que é calculada apenas para os casos em RC, não ter sido influenciada pela presença de *bulky*. Assim como pelo fato de, à análise multivariada, a presença de *bulky* não ter sido confirmada

como fator preditor independente para SG, reforça a relação entre *bulky* e obtenção de RC.

De acordo com a literatura, pacientes com estágio II e *bulky*, avaliados durante 30 anos pelo grupo “Southwest Oncology”, apresentaram sobrevida em cinco anos de 49%. Semelhante à dos estádios III e IV (46%), sugerindo que pacientes com EC II e *bulky* devam ser abordados como portadores de doença avançada. Corroborando essa afirmativa, estudo conduzido pelo grupo GELA demonstrou que pacientes com estágio II e *bulky*, tratados com três ciclos de CHOP e radioterapia, apresentaram sobrevida de 50% contra 82%, quando tratados mais agressivamente (Miller, 2004).

Estudo com casuística semelhante à nossa, interessando pacientes com IPI de risco intermediário alto e alto, que obtiveram RC e RP com poliquimioterapia em doses altas, seguida de ATMO, evidenciou como fatores de prognóstico para SG e SLD, a infiltração de MO, o acometimento de mais de um sítio extralinfonodal e o fenótipo T (Mounier et al., 2004). Nesse estudo, pacientes com massa tumoral superior a 10 cm de diâmetro apresentaram SG de $74\% \pm 7\%$, enquanto, em nosso estudo, a SG dos 82 pacientes, em relação à presença de *bulky*, foi de apenas 33,7% em 60 meses, com tempo médio de acompanhamento de 59,3 meses (IC(95 %) = 35,4; 83,1) (Mounier et al., 2004). Entretanto, a SLD, em 60 meses, foi de 59,1%, próxima à de $65\% \pm 7\%$, obtida por Mounier et al. (2004).

Provavelmente, a discrepância entre a SG, observada na literatura e a de nossa casuística, deve-se ao fato de que o estudo de Mounier et al. (2004) avaliou somente pacientes que obtiveram RC ou RP. Porém, quando

se avalia a SLD, calculada apenas para pacientes que atingiram RC, nossos resultados igualam-se aos de Mounier et al. (2004).

Dessa forma, para melhorar a sobrevida dos pacientes com LDGCB, é necessário investir no tratamento de primeira linha e, por conseguinte, na elevação da taxa de RC. Embora o ATMO tenha tido impacto na SG apenas em análise univariada, atingir RC foi essencial para elevar a SG nas análises univariada e multivariada ($p < 0,0001$).

A manutenção das variáveis de risco do IPI, na era da imunoterapia, ainda não foi validada. Para grupos de mau prognóstico, o IPI foi incapaz de estratificar pacientes com sobrevida inferior a 50% (Nyman et al, 2007).

As semelhanças dos nossos resultados com os da literatura confirmam o IPIa como preditor de sobrevida em LDGCB e reforçam a necessidade de encontrarmos outros fatores capazes de estratificar o risco de pacientes com IPIa de risco mais elevado, com o objetivo de melhor indicar a utilização de tratamentos mais intensivos e/ou de Rituximabe.

6.2.2 – Marcadores Imunológicos

Como referido anteriormente, pacientes de mesmo IPI podem apresentar diferentes respostas ao tratamento quimioterápico e imunoterápico, tornando-o insuficiente para categorizar grupos de risco em LDGCB.

Estudos de avaliação de expressão gênica tumoral identificaram marcadores moleculares de proliferação ou diferenciação, capazes de distinguir subgrupos de LDGCB (Alizadeh et al., 2000; Quackenbush, 2001). Estudos com a técnica de “DNA microarray” evidenciaram dois diferentes grupos de prognóstico de LDGCB. O grupo com origem em células do centro germinativo, de melhor prognóstico, e o de células B ativadas, de mau prognóstico, independente do IPI (Chang et al., 2004).

A aplicação prática da técnica de microarray é pouco factível na maior parte dos serviços, principalmente em países em desenvolvimento. Sua transposição para técnica de imuno-histoquímica possibilita a democratização do uso da assinatura gênica na prática clínica. Entretanto, essa transposição ainda não está bem estabelecida assim como se o significado prognóstico equivale ao obtido com a técnica de “DNA microarray”.

A expressão dos antígenos CD10 e Bcl-6 estão associados com a origem em células do CG, e os antígenos MUM-1/IRF4 e CD138 com origem em células B ativadas, porém o significado clínico desses marcadores em LDGCB ainda é incerto. Estudo recente demonstrou que esses marcadores são fatores de prognóstico independentes do IPI em LDGCB (Chang et al., 2004).

Nesse estudo avaliamos o significado prognóstico de marcadores imunológicos, associados à origem em CG ou pós CG em LDGCB de IPIa de risco intermediário alto e alto. Em adição, realizamos a pesquisa da proteína anti-apoptótica Bcl-2, associada a pior prognóstico em LDGCB em

vários estudos (Colomo et al., 2003) e avaliamos o papel da proteína p63 no LDGCB.

O antígeno CD138 não se mostrou bom marcador em virtude de ter sido negativo em todos os casos avaliados, em concordância com outras séries da literatura que, como nós, excluía portadores do vírus HIV (Colomo et al., 2003).

Em concordância com a maioria dos estudos, os pacientes CD10+ não apresentaram aumento de RC, SLD ou SG em relação aos casos negativos, ao contrário de alguns estudos que demonstram relação com melhor prognóstico (Lossos e Morgensztern, 2006).

O antígeno Bcl-6 foi o único marcador com distribuição desigual entre os dois grupos terapêuticos, ocorreu em 78,6% dos casos submetidos a ATMO em primeira RC e em 45,5% dos que permaneceram em observação ($p = 0,037$). Tradicionalmente, está associado a bom prognóstico em pacientes tratados apenas com quimioterapia, característica perdida quando se usa R-CHOP (Winter et al., 2006).

Estudo apenas com pacientes de alto risco, submetidos à quimioterapia seqüencial, seguida de ATMO, não demonstrou diferença de sobrevida de acordo com a presença ou não de Bcl-6 (Van Imhoff et al., 2006). Esse resultado, semelhante ao nosso, reforça o baixo valor de prognóstico desse marcador na população de alto risco.

O antígeno MUM-1 ocorre em LDGCB com origem em células em estágio de diferenciação pós CG ou B ativada, com morfologia do tipo imunoblasto e apresentação linfonodal (Hans et al., 2004).

Em nosso estudo, 53,4% dos pacientes foram MUM-1+, semelhante ao observado em estudos prévios que demonstraram positividade em 51% a 75% dos casos (Colomo et al., 2003). Houve distribuição percentual desigual entre os dois grupos terapêuticos, com MUM1+ em 71,4% dos casos, submetidos a ATMO em primeira RC e em 45,5% dos pacientes em RC, mantidos em observação. Embora sem significância estatística, é possível que a maior incidência de MUM-1+, no grupo de pacientes do ATMO, possa ter influenciado a capacidade desse marcador em prever prognóstico.

Estudo, envolvendo pacientes de alto risco, submetidos à quimioterapia sequencial seguida de ATMO, demonstrou que o valor de corte inferior a 70% de células positivas para esse marcador não teve impacto na SG. Porém, quando se considerou o ponto de corte superior a 70%, houve diferença para SG em favor dos casos MUM1 negativos (Van Imhoff et al., 2006). Em nossa casuística, 57% dos casos expressaram MUM1 entre 10% e 50% das células, o que também pode explicar a ausência de valor prognóstico para tal marcador em nosso estudo.

Geralmente a proteína Bcl-2 está relacionada com IPI de mais alto risco (Barrans et al., 2002). Em nossa casuística, ocorreu em 37% dos casos, com expressão forte em 63% dos casos positivos e em 100% dos

positivos, submetidos a ATMO em RC, mas sem diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos terapêuticos.

A utilização de Bcl-2 como marcador de prognóstico em LDGCB é controversa (Barrans et al., 2002; Hans et al., 2004; Iqbal et al., 2006). Em nossa população de LDGCB, de risco intermediário alto e alto, não influenciou a RC, embora o valor de p tenha ficado próximo da significância ($p = 0,07$). Porém em concordância com a literatura para grupo semelhante de pacientes, teve impacto na SG (Van Imhoff et al., 2006). Em 60 meses, a SG para os pacientes Bcl-2+ foi de 16,4%, com tempo médio de 34,38 meses (IC(95%) = 17,3; 51,4), enquanto para os negativos, foi de 58,1%, com tempo médio de 95,4 meses (IC(95%) = 71,2; 119,6) ($p = 0,004$). Os resultados obtidos em análise univariada foram confirmados na multivariada. O marcador Bcl-2 foi o único fator mantido como preditor independente, quando considerada a resposta à quimioterapia inicial, com p de 0,07 e risco relativo (RR) de 2,55 (IC(95%) = 1,29; 5,04).

Portanto, tanto em análise univariada como multivariada, a expressão de Bcl-2 foi o único marcador que influenciou a SG e o único preditor independente, quando considerada a resposta à quimioterapia inicial. Tal fato nos faz supor que, em nossa população, esses são os pacientes que se beneficiam, desde o início do tratamento, de protocolo quimioterápico diferenciado e agressivo e/ou da associação de Rituximabe ao CHOP (Coiffier et al., 2002; Mounier et al., 2003).

Por outro lado, os estudos que avaliam o papel da proteína p63 nos LDGCB são incipientes. Em nosso estudo, encontramos 50,7% dos casos

positivos para p63, percentual superior ao encontrado por Fukushima et al. (2006), que considerou valor de corte de 20% e semelhante ao de Park et al. (2005), cujo limite superior foi de 5%. Em nossa avaliação, utilizamos o valor de corte de 10%, o que pode justificar uma frequência mais elevada de casos positivos.

Fukushima et al. (2006) encontrou relação entre a presença das proteínas p63 e Bcl-6. Houve associação de expressão de p63 com pior prognóstico e progressão tumoral, principalmente nos LDGCB de origem NCG. Em nossa casuística, não houve relação entre p63 e qualquer marcador de origem celular e, de maneira antagônica ao descrito por Park et al. (2005) e Fukushima et al. (2006), a presença de p63 não teve impacto desfavorável na sobrevida. Embora sem diferença estatisticamente significativa, a expressão de p63 apresentou efeito protetor para portadores de LDGCB. Esse efeito ocorreu principalmente para a SLD, ficando mais evidente, quando consideramos como positivos apenas aqueles casos com expressão de p63 em pelo menos 50% das células, cuja SLD foi de 100%, com diferença estatisticamente significativa em relação aos que a expressavam em menos de 50% das células ($p = 0,016$), embora sem impacto em análise multivariada. Isso nos sugere que o valor de corte para a proteína p63 deve ser superior ao definido em estudos anteriores (Park et al., 2005; Fukushima et al., 2006).

Esses resultados controversos em relação aos de Park et al. (2005) e Fukushima et al. (2006) vão ao encontro dos resultados obtidos para outros tumores como de bexiga, em que a ausência de p63 foi associada à

progressão tumoral (Urist et al., 2002). Ressaltamos que este é o primeiro trabalho que avaliou exclusivamente pacientes de alto risco, o que pode ter contribuído para a obtenção de resultados conflitantes em relação aos estudos anteriores, que envolveram pequeno número de pacientes com essas características.

6.2.3 – Modelo Imuno-histoquímico

A separação dos LDGCB em grupos de risco, de acordo com a combinação dos antígenos CD10, Bcl-6 e MUM-1, demonstrou impacto prognóstico em LDGCB (Hans et al., 2004). Um desses estudos apresentava pequeno número de pacientes com IPI de alto risco (Barrans et al., 2002), ao contrário do nosso estudo composto apenas por pacientes de risco intermediário alto e alto, que não confirmou esse impacto prognóstico.

Na era pós-rituximabe, o valor dos marcadores imuno-histoquímicos ainda não foi validado. Estudo, que avaliou a associação dos marcadores CD10, BCL-6 e MUM-1, para identificar linfomas do CG e NCG como prognóstico em 90 pacientes tratados com quimioterápico e rituximabe, não evidenciou diferença estatisticamente significativa na SG entre os dois grupos (77% x 76%), confirmando o benefício da imuno-quimioterapia. Entretanto, entre os 104 pacientes do grupo controle, tratados sem rituximabe, houve diferença no prognóstico entre os linfomas do CG e NCG,

com SG de 70% e 47% e SLD de 59% e 30%, respectivamente (Nyman et al., 2007).

Em nossa casuística, a SG foi semelhante para pacientes com fenótipo de CG e NCG, mas inferior à literatura para os diferentes grupos de risco de IPI. Por outro lado, o grupo de LDGCB NCG apresentou SG próxima à da literatura, 43,3% x 47%, respectivamente (Nyman et al., 2007).

Quando comparamos nossos resultados com pacientes de alto risco, submetidos a ATMO em primeira RC (Van Imhoff et al., 2006), o grupo do CG apresentou SG próxima à da literatura (46,8% x 45%, respectivamente), embora, no referido estudo, tenha havido diferença de SG entre os CG e NCG, o que não ocorreu em nossa casuística.

Acreditamos haver duas hipóteses, para explicar a diferença dos nossos resultados em relação à SG, quando avaliamos o modelo imuno-histoquímico em nossa população. A primeira é que, como avaliamos apenas pacientes de risco intermediário e alto, embora sem diferença na distribuição entre as diversas variáveis clínicas testadas, mesmo os casos originados em células do CG poderiam apresentar características desfavoráveis, independentes da origem celular. A segunda é que esses resultados podem ser explicados pelo fato de que a maioria dos pacientes, submetidos a ATMO em primeira RC, tinham origem NCG. O ATMO pode ter sido capaz de eliminar o impacto negativo da origem celular sobre o prognóstico, igualando-os aos do CG como referido, em estudos anteriores, com pacientes submetidos a ATMO (Moskowitz et al., 2005).

Também não houve diferença com relação à SLD entre os grupos do CG e NCG. Nesse caso, o resultado foi próximo aos valores do CG da literatura (60,8% x 59%). Como a SLD é calculada apenas para os pacientes que atingiram RC, esse achado reforça mais uma vez a relação entre obtenção de RC e sobrevida.

Julgamos importante continuarmos esse estudo, pois, com uma casuística maior, poderemos ter mais condições de entender a utilidade da determinação da origem celular, por meio da pesquisa de marcadores imuno-histoquímicos, em pacientes com IPI de mais alto risco. Melhorando a estratificação de risco desse grupo de pacientes, poderão ser aplicados tratamentos de primeira linha ainda controversos, como o ATMO.

7. CONCLUSÕES

1. A consolidação com ATMO mostrou-se um procedimento seguro, com resultado de sobrevida semelhante à literatura.
2. Na análise univariada, a SG dos pacientes de IPLa de risco intermediário alto e alto, consolidados com ATMO, foi superior à dos pacientes tratados sem ATMO.
3. A taxa de recidiva dos pacientes submetidos a ATMO foi pequena, refletindo-se em maior SLD, comparativamente aos pacientes em RC mantidos em observação.
4. Obter RC foi fundamental para a maior SG, independentemente do protocolo de tratamento utilizado.
5. Na análise univariada, o único fator clínico de impacto na SG foi à presença de *bulky*.
6. A expressão da proteína Bcl-2 foi o único marcador imunológico de impacto na SG à análise univariada.
7. A expressão da proteína p63 ocorreu em mais da metade dos casos e, em análise univariada, associou-se a maior SLD nos fortemente positivos.
8. A origem do linfoma em células do CG ou NCG não teve impacto na sobrevida dos pacientes com LDGCB e IPLa de risco intermediário alto e alto.

9. A expressão da proteína Bcl-2 e a obtenção de RC foram fatores de prognóstico independentes à análise multivariada.
10. A realização de ATMO em primeira RC foi o único fator preditor, independente para SLD à análise multivariada.

8. ANEXOS

A – Protocolos de primeira linha

CHOP ciclofosfamida 750 mg/m² D1, doxorubicina 50 mg/m² D1, vincristina 1,4 mg/m² D1, prednisona 60 mg/m² D1 a D5.

ProMACE-CytaBOM prednisona 60 mg/m² D1-14, Doxorubicina 25mg/m² D1, ciclofosfamida 650mg/m² D1, etoposide 120mg/m² D1, citarabina 300mg/m² D8, bleomicina 5U/m² D8, vincristina 1,4mg/m² D8, metotrexate 120mg/m² D8 com ácido folínico 25mg/m² 24 horas após o metotrexate.

Quimioterapia intra-tecal metotrexate 12 mg e dexametasona 2 mg.

B – Protocolos de segunda linha ou resgate

IVAC ifosfamida 1500 mg/m² D1 a D5, mesna 20% dose de ifosfamida D1 a D5, etoposide 60 mg/m² D1 a D5, citarabina 4000 mg/m² D1 e D2.

IMVP16 ifosfamida 1000 mg/m² D1 a D5, mesna 20% dose de ifosfamida D1 a D5, metotrexate 30 mg/m², etoposide 100 mg/m².

ESHAP etoposide 40 mg/m² D1 a D4, metilprednisolona 500 mg/m² D1 a D5, citarabina 2000 mg/m² D5, cisplastina 25 mg/m² D1 a D4.

CHOP vide acima.

MOPP vincristina 1,4 mg/m² D1 e D8, procarbazina 100 mg/m² D1 a D14, prednisona 60 mg/m² D1 a D14.

ProMACE-CytaBOM vide acima.

C – Protocolos de condicionamento para transplante de medula óssea

BEAM Carmustina 300 mg/m² D-5, etoposide 200 mg/m² D-5 a D-2, citarabina 200 mg/m² D-5 a D-2, melfalono 140 mg/m² D-1.

Bussulfano 4 mg/kg/d D-5 a D-2 e melfalano D-1.

Fludarabina 25 mg/m² D-6 a D-2 e melfalano 150 mg no D-3 e D-2.

CBV ciclofosfamida 1,8 g/m² D-5 a D-2, carmustina 100 mg/m² D-8 a D-6, etoposide 800 mg/m² D-8 a D-6.

Irradiação corporal total D-6 a D-4 com ciclofosfamida no D-1 ou melfano 140 mg/m² no D-3.

9. REFERÊNCIAS

1. Abramson JS, Shipp MA. Advances in the biology and therapy of diffuse large B-cell lymphoma: moving toward a molecularly targeted approach. *Blood*. 2005; 106: 1164-74.
2. Alizadeh A A, Eisen M B, Davis R E, Ma C, Lossos I S, Rosenwald A, Boldrick J C, Sabet H, Yu X, Tran T, 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, Weinsenburger 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 profile. *Nature*. 2000; 3: 503-11.
3. Barrans SL, Carter I, Owen RG, et al. Germinal center phenotype and bcl-2 expression combined with the International Prognostic Index improves patient risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2002; 99:1136-43.
4. Barrans SL, O'Connor SJ, Evans PA, Davies FE, Owen RG, Haynes AP, Morgan GJ, Jack AS. Rearrangement of the BCL6 locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2002; 117: 322-32.
5. Bigni R. Inst. Nac. Câncer [on-line]. Linfoma não Hodgkin [citado em: 29 junho 2004]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>.
6. Bierman PJ, Sweetenham JW, Loberiza Jr, FR, Taghipour G, Lazarus HM, Rizzo JD, Schimitz N, Van Beisien K, Vose J M, Horowitz M, Goldstone A. Syngenic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation for Non-Hodgkin's Lymphoma: A Comparison With Allogeneic and Autologous Transplantation – The Lymphoma Working Committee of the Internacional Bone Marrow Transplant Registry and the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 3744 -53.
7. Blayney DW, Leblanc ML, Grogan T, Gaynor ER, Chapman RA, Spiridonidis CH, Taylor SA, Bearman SI, Miller TP, Fisher RI. Dose-

- Intense Chemotherapy Every 2 Weeks With Dose-Intense Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone May Improve Survival in Intermediate- and High-Grade Lymphoma: A Phase II Study of the Southwest Oncology Group (SWOG 9349). *J Clin Oncol.* 1979; 21: 2466-73.
8. Bloomfield CD, Gajl-Peczalska KJ, Frizzera G, Kersey JH, Goldman AI. Clinical utility of lymphocyte surface markers combined with the Lukes-Collins histologic classification in adult lymphoma. *N Engl J Med.* 1979; 301: 512-18.
 9. Blum KA, Bartlett NL. Antibodies for the treatment of diffuse large cell lymphoma. *Semin Oncol.* 2003; 30: 448-56.
 10. Burton C, Smith P, Vaughan-Hudson G, Qian W, Hoskin P, Cunningham D, Hancock B, Linch D. Comparison of CHOP versus CIOp in good prognosis younger patients with histologically aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol.* 2005;130(4):536-41.
 11. Cabanillas F, Hagemeister F, McLaughlin P, Velasquez WS, Riggs S, Fuller L, Smith T. Results of MIME salvage regimen for recurrent or refractory lymphoma. *J Clin Oncol.* 1987; 5: 407-12.
 12. Carbone PP, Kaplan HS, Musshof K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res.* 1971; 31: 1860-1.
 13. Chang CC, McClintock S, Cleveland RP, Trzpue T, Vesole DH, Logan B, Kajdacsy-Balla A, Perkins SL. Immunohistochemical Expression Patterns of Germinal Center and Activation B-cell Markers Correlate with Prognosis in Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2004; 28: 464-70.
 14. Cheson B D, Horning S J, Coiffier B, Shipp M, Fisher R I, Connors J M, Lister T A, Vose J, Grillo-López A, Hagenbeek A, Cabanillas F, Klippensten D, Hiddeman W, Castellino R, Harris N L, Armitage J O, Carter W, Hoppe P, Canellos G P. Report of an International

- Workshop to standardize response criteria for Non-Hodgkin's Lymphomas. *J Clin Oncol*. 1999, 17: 1244-53.
15. Cheson B D, Pfistner B, Juweid ME, Gascoyne RD, Specht L, Horning SJ, Coiffier B, Fisher RI, Hagenbeek A, Zucca E, Rosen ST, Stroobants S, Lister TA, Hoppe P, Dreyling M, Tobinai K, Connors JM, Vose JM, Federico M, Diehl V. Revised Response Criteria for Malignant Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2007, 25: 579-86.
 16. Coiffier B, Brousse N, Peuchmaur M, Berger F, Gisselbrecht C, Bryon PA, Diebold J. For the GELA: Peripheral T-cell lymphomas have a worse prognosis than B-cell lymphomas: A prospective study of 361 immunophenotyped patients treated with the LNH-84 regimen. *Ann Oncol*. 1990; 1: 45-50.
 17. Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, Morel P, Nesterov E, Salles G, Gaulard P, Reyes F, Gisselbrecht C. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002; 346: 235-42.
 18. Coiffier B, Haioun C, Ketterer N, Engert A, Tilly H, Ma D, Johnson P, Lister A, Feuring-Buske M, Radford JA, Capdeville R, Diehl V, Reyes F. Rituximab for treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study. *Blood*. 1998; 92: 1927-32.
 19. 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*. 2003; 101: 78-84.
 20. Coltman CA, Dahlborg S, Jones SE. CHOP is curative in thirty% of patients with large cell lymphoma: a twelve-year Southwest Oncology Group follow-up. In: Skarin, AT, editor. *Adv. Cancer Chemotherapy*. New York: Park Row; 1986. p.71-8.
 21. Coso D, Sebban C, Boulat O, Biron P, Rey J, Aurran T, Chabannon C, Xerri L, Chetaille B, Esterni B, Ivanov V, Stoppa AM, Schiano de

- Collela JM, Gastaut JA, Maraninchi D, Bouabdallah R. A phase II trial of rituximab as adjuvant to intensive sequential chemotherapy in patients under 60 years with untreated poor-prognosis diffuse large B-cell lymphoma. *Bone Marrow Transplant.* 2006; 38: 217-22.
22. 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. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 7060-68.
23. Di Como CJ, Urist MJ, Babayan I, Drobnjak M, Hedvat CV, Teruya-Feldstein J, Pohar K, Hoos A, Cordon-Cardo C. p63 Expression Profiles in Human Normal and Tumor Tissues. *Clin Cancer Res.* 2002; 8: 494-501.
24. Doocey RT, Toze CL, Connors JM, Nevill TJ, Gascoyne RD, Barnett MJ, Forrest DL, Hogge DE, Lavoie JC, Nantel SH, Shepherd JD, Sutherland HJ, Voss NJ, Smith CA, Song KW. Allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation for relapsed and refractory aggressive histology non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol.* 2005; 131(2): 223-30.
25. Escalon MP, Champlin RE, Saliba RM, Saliba RM, Acholonu SA, Hosing C, Fayad L, Giralt S, Ueno NT, Maadani F, Pro B, Donato M, McLaughlin P, Khouri IF. Nonmyeloablative allogeneic hematopoietic transplantation: a promising salvage therapy for patients with non-Hodgkin's lymphoma whose disease has failed a prior autologous transplantation. *J Clin Oncol.* 2004; 22: 2419-23.
26. Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, Solal-Celigny P, Bouabdallah R, Fermé C, Christian B, Lepage E, Tilly H, Morschhauser F, Gaulard P, Salles G, Bosly A, Gisselbrecht C, Reyes F, Coiffier B. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 4117-26.

27. Fisher RI, De Vita JRV, Hubbard SM, Longo DL, Wesley R, Chabner BA, Young RC. Diffuse aggressive lymphomas: Increased survival after alternating flexible sequences of ProMACE and CHOP chemotherapy. *Ann Intern Med.* 1983; 98: 304-9.
28. Fisher RI, Gaynor ER, Dahlborg S, Oken MM, Grogan TM, Mize EM, Glick JH, Coltman Jr CA, Miller TP. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med.* 1993; 328: 1002-6.
29. Freytes CO, Loberiza FR, Rizzo JD, Bashey A, Bredeson CN, Cairo MS, Galé RP, Horowitz MM, Klumpp TR, Martino R, McCarthy PL, Molina A, Pavlovsky S, Pecora AL, Serna DS, Tsai T, Zhang MJ, Vose JM, Lazarus HM, Van Besien K. Myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients who experience relapse after autologous stem cell transplantation for lymphoma: a report of the International Bone Marrow Transplant Registry. *Blood.* 2004; 104: 3797-03.
30. Friedberg JW. Rituximab for early-stage diffuse large-B-cell lymphoma. *Lancet Oncol.* 2006; 7(5): 357-9.
31. Fukushima N, Satoh T, Sueoka N, Sato A, Ide M, Hisatomi T, Kuwahara N, Tomimasu R, Tsuneyoshi N, Funai N, Sano M, Tokunaga O, Sueoka E. Clinico-pathological characteristics of p63 expression in B-cell lymphoma. *Cancer Sci.* 2006; 97(10): 1050-5.
32. Garcia-Suarez J, Banas H, Arribas I, De Miguel D, Pascual T, Burgaleta C. Dose-adjusted EPOCH plus rituximab is an effective regimen in patients with poor-prognostic untreated diffuse large B-cell lymphoma: results from a prospective observational study. *Br J Haematol.* 2007; 136(2): 276-85.
33. Gianni AM, Bregni M, Siena S, Brambilla CDI, Nicola M, Lombardi F, Gandola L, Tarella C, Pileri A, Ravagnani F, Valagussa P, Bonadonna G, Stern AC, Magni M, Caracciolo D. High-Dose Chemotherapy and Autologous Bone Marrow Transplantation Compared with MACOP-B in Aggressive B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 1997; 336: 1290-7.

34. Gisselbrecht C, Lepage E, Molina T, Quesnel B, Fillet G, Lederlin P, Coiffier B, Tilly H, Gabarre J, Guilmin F, Hermine O, Reyes F. Shortened First-Line High-Dose Chemotherapy for Patients With Poor-Prognosis Aggressive Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2002; 20: 2472-79.
35. Glass B, Kloess M, Bentz M, Schlimok G, Berdel WE, Feller A, Trümper L, Loeffler M, Pfreundschuh M, Schmitz. Dose-escalated CHOP plus etoposide (MegaCHOEP) followed by repeated stem cell transplantation for primary treatment of aggressive high-risk non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006; 107: 3058-64.
36. Goldie JH, Coldman AJ. The genetic origem of drug resistance in neoplasma implication for systemic therapy. *Cancer Res*. 1984; 44: 3643-53.
37. Gordon LI, Andersen J, Colgan J, Glick J, Resnick GD, O'Connell M, Cassileth PA. Advanced diffuse non-HodgKin`s lymphoma: Analysis of prognostic factors by the International Index and by lactic dehydrogenase in an intergroup study. *Cancer*. 1995; 75: 865-73.
38. Greb A, Bohlius J, Trelle S, Schiefer D, De Souza CA, Gisselbrecht C, Intratumorachai T, Kaiser U, Kluin-Nelemans HC, Martelli M, Milpied NJ, Santini G, Verdonck LF, Vitolo U, Schwarzer G, Engert A. High-dose chemotherapy with autologous stem cell support in first-line treatment of aggressive non-Hodgkin lymphoma – Results of a comprehensive meta-analysis. *Cancer Treat Rev*. 2007; 33(4): 338-46.
39. Grogan TM, Miller TP, Fisher RL. A Southwest Oncology Group Perspective on the Revised European – American Lymphoma Classification. *Hematology/Oncology Clins of N América*. 1997; 11: 819-46.
40. 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. *J Clin Oncol*. 2000; 18: 3025-30.
41. Hallack Neto AE. Tratamento do linfoma difuso de grandes células B: experiência do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. 2004.
 42. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Muller-Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES, Pan Z, Farinha P, Smith LM, Falini B, Banham AH, Rosenwald A, Staudt LM, Connors JM, Armitage JO, Chan WC. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004; 103: 275-82.
 43. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J. Lymphoma classification – from controversy to consensus: The REAL and WHO classifications of lymphoid neoplasms. *Ann Oncol*. 2000; 11(suppl1): 3-10.
 44. Harris LH, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Cleary ML, Delsol G, Wolf-Peeters C, Brunangelo F, Gatter KC, Grogan TM, Isaacson PG, Knowles DM, Mason DY, Muller-Hermelink H, Pileri SA, Piris MA, Ralfkiaer E, Warnke RA. A revised European-American classification of neoplasms: A proposal from the international lymphoma study group. *Blood*. 1994; 84: 1361-92.
 45. Hedvat CV, Teruya-Feldstein J, Puig P, Capodieci P, Dudas M, Pica N, Qin J, Cordon-Cardo C, Di Como CJ. Expression of p63 in diffuse large B-cell lymphoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2005; 13(3): 237-42.
 46. Hornberger JC, Best JH. Cost Utility in United States of Rituximab plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone for the Treatment for Elderly Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Cancer*. 2005; 103(8): 1644-51.

47. Hsi ED, Yegappan S. Lymphoma Immunophenotyping: A new Era in Paraffin-Section Immunohistochemistry. *Adv Anat Pathol*. 2001; 8(4): 218-39.
48. Hudson BV, Hudson GV, MacLennan KA, Anderson L, Linch DC. Clinical stage I non-Hodgkin's lymphoma: long-term follow-up of patients treated by the British National Lymphoma Investigation with radiotherapy alone as initial therapy. *Br J Cancer*. 1994; 69: 1088-93.
49. Iqbal J, Sanger WG, Horsman DE, Rosenwald A, Pickering DL, Dave B, Dave S, Xiao L, Cao K, Zhu Q, Sherman S, Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Ott G, Müller-Hermelink HK, Delabie J, Braziel RM, Jaffe ES, Campo E, Lynch JC, Connors JM, Vose JM, Armitage JO, Grogan TM, Staudt LM, Chan WC. BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol*. 2004; 165: 159-66.
50. Iqbal J, Neppalli VT, Wright G, Dave BJ, Horsman DE, Rosenwald A, Lynch J, Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Campo E, Ott G, Müller-Hermelink HK, Delabie J, Jaffe ES, Grogan TM, Connors JM, Vose JM, Armitage JO, Staudt LM, Chan WC. BCL2 Expression Is a Prognostic Marker for the Activated B-Cell-Like Type of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006; 24: 961-8.
51. Juweid ME, Cheson BD. Role of Positron Emission Tomography in Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 4577-80.
52. Juweid ME, Stroobants S, Hoekstra OS, Mottaghy FM, Dietlein M, Guermazi A, Wiseman GA, Kostakoglu L, Scheidhauer K, Buck A, Naumann R, Spaepen K, Hicks RJ, Weber WA, Reske SN, Schwaiger M, Schwartz LH, Zijlstra JM, Siegel BA, Cheson BD. Use of Positron Emission Tomography for Response Assessment of Lymphoma: Consensus of the Imaging Subcommittee of International Harmonization Project in Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2007; 25: 571-8.
53. Jones SE, Miller T, Connors JM. Long-term follow-up and analysis for prognostic factors for patients with limited-stage diffuse large-cell

- lymphoma treated with initial chemotherapy with or without adjuvant radiotherapy. *J Clin Oncol*. 1989; 7: 1186-91.
54. Kaiser U, Uebelacker I, Abel U, Birkmann J, Trumper L, Schmalenberg H, Karacas T, Metzner B, Hossfeld DK, Bischoff H G, Franke A, Reiser M, Muller P, Mantovani L, Grundeis M, Rothmann F, Von Seydewitz CU, Mesters RM, Steinhauer EU, Krah I, Schumacher K, Kneba M, Baudis M, Schmitz N, Pfab R, Koppler H, Parwaresch R, Pfreundschuh M, Havemann K. Randomized Study to Evaluate the Use of High-Dose Therapy as Part of Primary Treatment for "Aggressive" Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2002; 22: 4413-19.
 55. Kalaycio M, Rybicki L, Pohlman B, Sobecks R, Andresen S, Kuczkowski E, Bolwell B. Risk Factors Before Autologous Stem-Cell Transplantation for Lymphoma Predict for Secondary Myelodysplasia and Acute Myelogenous Leukemia. *J Clin Oncol*. 2006; 24: 3604-10.
 56. Kaminski MS, Estes J, Zasadny KR, Francis IR, Ross CW, Tuck M, Regan D, Fisher S, Gutierrez J, Kroll S, Stagg R, Tidmarsh G, Wahl RL. Radioimmunotherapy with iodine (131) I tositumomab for relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma updated results and long-term follow-up of University of Michigan experience. *Blood*. 2000; 96: 1259-66.
 57. Kewalramani T, Zelenetz AD, Nimer SD, Portlock C, Straus D, Noy A, O'Connor O, Filippa DA, Feldstein JT, Gencatelli QJ, Waxman A, Yahalom J, Moskowitz CH. Rituximab and ICE (RICE) as second-line therapy prior to autologous stem cell transplantation for relapsed or primary refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2004; 15: 3684-88.
 58. Kim SW, Tanimoto TE, Hirabayashi N, Goto S, Kami M, Yoshioka S, Uchida T, Kishi K, Tanaka Y, Kohno A, Kasai M, Higuchi M, Kasai M, Mori S, Fukuda T, Izutsu K, Sao H, Ishikawa T, Ichinohe T, Takeuchi K, Tajima K, Tanosaki R, Harada M, Taniguchi S, Tobinai K, Hotta T, Takaue Y. Myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell

- transplantation for non-Hodgkin lymphoma: a nationwide survey in Japan. *Blood*. 2006; 108: 382-9.
59. Kimby E, Brandt L, Nygren P, Glimelius BA. Systematic Overview of Chemotherapy Effects in Aggressive non-Hodgkin's Lymphoma. *Acta Oncol*. 2001; 40: 198-212.
 60. Kostakoglu L, Coleman M, Leonard JP, Kuji I, Zoe H, Goldsmith SJ. PET predicts prognosis after one cycle of chemotherapy in aggressive lymphoma and Hodgkin's disease. *J Nuc Med*. 2002; 43: 1018-27.
 61. Kottaridis PD, Milligan DW, Chopra R, Chakraverty RK, Chakrabarti S, Robinson S, Peggs K, Verfuerth S, Pettengell R, Marsh JCW, Schey S, Mahendra P, Morgan GJ, Hale G, Waldmann H, Elvira MCR, Williams CD, Devereux S, Linch DC, Goldstone AH, Mackinnon S. In vivo CAMPATH-1H prevents graft-versus-host disease following nonmyeloablative stem cell transplantation. *Blood*. 2000; 96: 2419-25.
 62. Kouri IF, Saliba RM, Giralt S, Okoroji GJ, Younes A, Fayad L, Korbiling M, Rodriguez MA, Couriel D, Bibawi S, Hosing C, Mcmannis J, Cabanillas F, Champlin RE. Long term remission and low mortality achieved with cisplatin, fludarabine, cytarabine nonablative preparative regimen and allogeneic stem transplantation (AST) for histologically aggressive non-Hodgkin's lymphoma (NHL). *Blood*. 2001; 98: 190a.
 63. LeBien TW, McCormack RT. The common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD10): Emancipation from a functional enigma. *Blood*. 1989; 73: 625-35.
 64. Lee GR, Macon WR, Mccurley TL. Non-Hodgkin Lymphoma. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM, editores. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10.ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1999. p.2447-537.
 65. Lennert K, Mohri N, Stein H. The histopathology of malignant lymphomas. *Br J Haematol*. 1975; 31 (Suppl): 193-203.
 66. Leonard JP, Coleman M, Ketas JC, Chadburn A, Furman R, Schuster MW, Feldman EJ, Ashe M, Schuster SJ, Wegener WA, Hansen HJ,

- Ziccardi H, Eschenberg M, Gayko U, Fields SZ, Cesano A, Goldenberg DM. Epratuzumab, a humanized anti-CD22 antibody, in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: phase I/II clinical trial results. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 5327-34.
67. Linderöth J, Jerkeman M, Cavallin-Ståhl E, Kvaløy S, Torlakovic E. Immunohistochemical Expression of CD23 and CD40 May Identify Prognostically Favorable Subgroups of Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 722-8.
68. Lossos IS. Molecular Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 6351-57.
69. Lossos IS, Czerwinski DK, Alizadeh AA, Wechser MA, Tibshirani R, Botstein D, Levy R. Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N Engl J Med.* 2004; 350: 1828-37.
70. Lossos IS, Morgensztern D. Prognostic Biomarkers in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 995-1007.
71. Lukes RJ, Collins RD. Immunological characterization of human malignant lymphomas. *Cancer.* 1974; 34: 1488-503.
72. Maloney DG, Grillo-López AJ, White CA, Bodkin D, Schilder RJ, Neidhart JA, Janakiraman N, Foon KA, Lilas TM, Dallaire BK, Wey K, Royston I, Davis T, Levy R. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood.* 1997; 90: 2188-95.
73. Mckelvey EM, Gottlieb JA, Wilson HE, Haut A, Talley RW, Jones SE, Grozea PN, Gutterman J, Coltman C, Moon TE. Hydroxydaunomycin (Adriamycin) combination chemotherapy in malignant lymphoma. *Cancer.* 1976; 38: 1484-93.
74. Miller TP. The Limits of Limited Stage Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2004; 22: 2982-84.
75. Miller TP, Dahlberg S, Cassady JR, Adelstein DJ, Spier SM, Grogan TM, Leblanc M, Carlin S, Chase E, Fisher RI. Chemotherapy alone compared with chemotherapy plus radiotherapy for localized

- intermediate and high grade non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 1998; 339: 21-6.
76. Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*. 1999, 398: 708-13.
 77. Milpied N, Deconinck E, Gaillard F, Delwail V, Foussard C, Berthou C, Gressin R, Lucas V, Colombat P, Harousseau JL. Initial Treatment of Aggressive Lymphoma with High-Dose Chemotherapy and Autologous Stem-Cell Support. *New Engl J Med*. 2004; 350: 1287-95.
 78. Mikhaeel NG, Timothy AR, Hain SF, O'Doherty MJ. 18-FDG-PET for the assessment of residual masses on CT following treatment of lymphomas. *Ann Oncol*. 2000; 11(suppl 1):147-150.
 79. Ministério da Saúde. Brasil [on-line]. Portarias alteram área de transplante de medula óssea no SUS [citado em: 29 novembro 2000]. Disponível em: <http://www.portal.saude.gov.br>.
 80. Mirra AP, Latorre MRDO, Veneziano DR, eds. Incidência de câncer no município de São Paulo, Brasil: 1997-1998. Mortalidade de câncer no município de São Paulo, Brasil, tendência no período 1969-1998. [Ministério da Saúde]. São Paulo; 2001.
 81. Montserrat E, Garcia-Conde J, Vinolas N, Lopez-Guillermo A, Hernandez-Nieto L, Zubizarreta A, Maldonado J, Alcalá A, Faura MV, Llorente A, Blade J, Fontanillas M, Estape J. CHOP vs. ProMACE-CytaBOM in the treatment of aggressive non-Hodgkin's lymphomas: long-term results of a multicenter randomized trial (PETHEMA: Spanish Cooperative Group for the Study of Hematological Malignancies Treatment, Spanish Society of Hematology). *Eur J Haematol*. 1996; 57(5):377-83.
 82. Moskowitz CH, Zelenetz AD, Kewalramani T, Hamlin P, Lessac-Chenen S, Houldsworth J, Olshen A, Chaganti R, Nimer S, Teruya-Feldstein J. Cell of origin, germinal center versus nongerminal center, determined by immunohistochemistry on tissue microarray, does not

- correlate with outcome in patients with relapsed and refractory DLBCL. *Blood*. 2005; 106: 3383-5.
83. Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, Emile JF, 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 (DL-BCL). *Blood*. 2003; 101: 4279-84.
 84. Mounier N, Gisselbrecht C, Brière J, Haioun C, Feugier P, Offner F, Recher C, Stamatoullas A, Morschhauser F, Macro M, Thieblemont C, Sonet A, Fabiani B, Reyes F. Prognostic Factors in Patients With Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma Treated by Front-Line Autotransplantation After Complete Remission: A Cohort Study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol*. 2004; 22: 2826-34.
 85. Nylander K, Vojtesek B, Nenutil R, Lindgren B, Roos G, Zhanxiang W, Sjöström B, Dahlqvist A, Coates PJ. Differential expression of p63 isoforms in normal tissues and neoplastic cells. *J Pathol*. 2002; 198: 417-27.
 86. Nyman H, Adde M, Karjalainen-Lindsberg ML, Taskinen M, Berglund M, Amini RM, Blomqvist C, Enblad G, Leppä S. Prognostic Impact of Immunohistochemically-Defined Germinal Centre Phenotype in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Patients Treated with Immunochemotherapy. *Blood*. 2007; 109: 4930-5.
 87. Park CK, O YH. Expression of p63 in Reactive Hyperplasias and Malignant Lymphomas. *J Korean Med Sci*. 2005; 20: 752-8.
 88. Pavone V, Gaudio F, Console G, Vitolo U, Lacopino P, Guarini A, Liso V, Perrone T, Liso A. Poor mobilization is an independent prognostic factor in patients with malignant lymphomas treated by peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2006; 37: 719-24.
 89. Pereira J, Bellesso M, Pracchia LF, Hallack Neto AE, Beitler B, Dias LC, Dorlhiac-Llacer PE, Dulley FL, Chamone D. Modified Magrath

- IVAC regimen as second-line therapy for relapsed or refractory aggressive non-Hodgkin's lymphoma in developing countries: the experience of a single center in Brazil. *Leuk Res.* 2006; 30(6):681-5.
90. Pfreundschuh M, Trumper L, Kloess M, Schmits R, Feller AC, Rbe C, Rudolph C, Reiser M, Hossfeld DK, Eimermacher H, Hasenclever D, Schmitz N, Loeffler M. 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.* 2004a; 104: 634-41.
 91. Pfreundschuh M, Trumper L, Kloess M, Schmits R, Feller AC, Rudolph C, Reiser M, Hossfeld DK, Metzner B, Hasenclever D, Schmitz N, Glass B, Rbe C, Loeffler M. 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.* 2004b; 104: 626-33.
 92. Pfreundschuh M, Trumper L, Osterborg A, Pettengell R, Trneny M, Imrie K, Ma D, Gill D, Walewski J, Zinzani PL, Stahel R, Kvaloy S, Shpilberg O, Jaeger U, Hansen M, Lehtinen, Lpez-Guillermo, Carrado C, Scheliga A, Milpied N, Mendila M, Rashford M, Kuhnt E, Loeffler M. 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 MabThera International Trial (MinT) Group. *Lancet Oncol.* 2006; 7: 379-91.
 93. Philip T, Guglielmi C, Hagenbeek A, Somers R, Hans VDL, Bron D, Sonneveld P, Gilsselbrecht C, Cahn JY, Harousseau JL, 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. *N Engl J Med.* 1995; 333: 1540-5.
 94. Quackenbush J. Computational analysis of microarray data. *Nat Rev Genet.* 2001; 2: 418-27.

95. Rabkin CS, Ward MH, Manns A, Blattner WA. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphomas. In: Magrath IT. *The Non-Hodgkin's Lymphomas*. London: Arnold; 1997. p.171-86.
96. Robinson SP, Goldstone AH, Mackinnon S, Carella A, Nigel R, Elvira CR, Taghipour G, Schmitz N. Chemoresistant or aggressive lymphoma predicts for a poor outcome following reduced-intensity allogeneic progenitor cell transplantation: an analysis from the Lymphoma Working Party of European Group for Blood and Bone Marrow Transplantation. *Blood*. 2002; 100: 4310-16.
97. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995; 270: 467-70.
98. Schöder H, Noy A, Gonen M, Weng L, Green D, Erdi YE, Larson SM, Yeung HWD. Intensity of ¹⁸Fluorodeoxyglucose uptake in PET distinguishes between indolent and aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 4643-51.
99. Schot BW, Zijlstra JM, Sluiter WJ, Van Imhoff GW, Pruim J, Vaalburg W, Vellenga E. Early FDG-PET assessment in combination with clinical risk scores determines prognosis in recurring lymphoma. *Blood*. 2007; 109: 486-91.
100. Sehn LH, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P, Klasa R, Savage KJ, Shenkier T, Sutherland J, Gascoyne RD, Connors JM. 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*. 2007; 109: 1857-61.
101. Sehn LH, Donaldson J, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Klasa R, MacPherson N, O'Reilly S, Spinelli JJ, Sutherland J, Wilson KS, Gascoyne RD, Connors JM. Introduction of Combined CHOP Plus Rituximab Therapy Dramatically Improved Outcome of Diffuse Large B-Cell Lymphoma in British Columbia. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 5027-33.

102. Shih LY, Liang DC. Non-Hodgkin's Lymphomas in Asia. *Hematol Oncol Clins N America*. 1991; 5: 983-1001.
103. Shipp MA, Mauch PM, Harris NL. Non-Hodgkin's Lymphomas. In: De VITA Jr VT, Hellmans SE, Rosenberg SA, eds. *Cancer principles and practice of oncology*. 5.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997.
104. Shipp MA, Abeloff MD, Antman KH, Carrol G, Hagenbeek A, Loeffler M, Montserrat E, Radford JA, Salles G, Schimitz N, Symann M, Armitage JO, Philip T, Coiffier B. International Consensus Conference on High Therapy With Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Aggressive Non-Hodgkin's Lymphomas: Report of the Jury. *J Clin Oncol*. 1999; 17: 423-9.
105. Shortt J, Spencer A. Adjuvant rituximab causes prolonged hypogammaglobulinaemia following autologous stem cell transplant for non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant*. 2006; 38: 433-6.
106. 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 18-fluorodeoxyglucose ([¹⁸F]FDG) after first line chemotherapy in non-Hodgkin's lymphoma: is [¹⁸F]FDG PET a valid alternative to conventional diagnostic methods? *J Clin Oncol*. 2001; 19: 414-19.
107. Spitzer IF, McAfee SL, Dey BR, Sackstein R, Colby C, Sachs DH, Sykes M. Durable progression free survival (PFS) following non-myeloablative bone marrow transplantation (BMT) for chemorefractory diffuse large B cell lymphoma (B-LCL). *Blood*. 2001; 98: 672a.
108. Stewart DA, Bahlis N, Valentine K, Balogh A, Savoie L, Morris DG, Jones A, Brown C, Russell JA. Upfront double high-dose chemotherapy with DICEP followed by BEAM and autologous stem cell transplantation for poor-prognosis aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006; 107: 4623-27.

109. Strauss SJ, Morschhauser F, Rech J, Repp R, Solal-Celigny P, Zinzani PL, Engert A, Coiffier B, Hoelzer DF, Wegener WA, Teoh NKW, Goldenberg DM, Lister TA. Multicenter Phase II Trial of Immunotherapy With the Humanized Anti-CD22 Antibody, Epratuzumab, in Combination With Rituximab, in Refractory or Recurrent Non-Hodgkin's Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006; 3880-6.
110. Sweetenham JW. Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Risk Stratification and Management of Relapsed Disease. *Hematology: ASH Education Program Book*. 2005; 252-9.
111. Svoboda J, Andreadis C, Elstrom R, Chong EA, Downs LH, Berkowitz A, Luger SM, Porter DL, Nasta S, Tsai D, Loren AW, Siegel DL, Glatstein E, Alavi A, Stadtmayer EA, Schuster SJ. Prognostic value of FDG-PET scan imaging in lymphoma patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2006; 38: 211-16.
112. Teeling JL, French RR, Cragg MS, Van den Brakel J, Pluyter M, Huang H, Chan C, Parren PWHI, Hack CE, Dechant M, Valerius T, Van de Winkel JGJ, Glennie MJ. Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 2004; 104: 1793-800.
113. The International non-Hodgkin's lymphoma prognostic factors project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *New Engl J Med*. 1993; 329: 987-94.
114. Wilson WH, Bryant G, Bates S, Fojo A, Wittes RE, Steinberg SM, Kohler DR, Jaffe ES, Herdt J, Cheson BD. EPOCH chemotherapy: Toxicity and efficacy in relapsed and refractory non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 1993; 11: 1573-82.
115. Winter JN, Weller EA, Horning SJ, Krajewska M, Variakojis D, Habermann TM, Fisher RI, Kurtin PJ, Macon WR, Chhanabhai M, Felgar RE, Hsi ED, Medeiros LJ, Weick JK, Reed JC, Gascoyne RD. Prognostic significance of Bcl-6 protein expression in DLBCL treated with CHOP or R-CHOP: a prospective correlative study. *Blood*. 2006; 107: 4207-13.

116. Working Formulation. The non-hodgkin's lymphoma pathologic classification project: national cancer institute sponsored study of classification of non-hodgkin's lymphoma: summary and description of working formulation for clinical use. *Cancer*. 1982; 49: 2112-35.
117. Urist MJ, Di Como CJ, Lu ML, Charytonowics E, Verbel D, Crum CP, Ince TA, Mckeon FD, Cordon-Cardo C. Loss of p63 expression is associated with a tumor progression in bladder cancer. *Am J Pathol*. 2002; 161: 1199-206.
118. Van Imhoff GW, Boerma EG, Holt BVD, Schuuring E, Verdonck LF, Kluin-Nelemans HC, Kluin PM. Prognostic Impact of Germinal Center–Associated Proteins and Chromosomal Breakpoints in Poor-Risk Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006; 24: 4135-42.
119. Van Imhoff GW, Holt BVD, MacKenzie MA, Veer MBV, Wijermans PW, Ossenkoppele GJ, Schouten HC, Sonneveld P, Steijaert MMC, Kluin PM, Kluin-Nelemans HC, Verdonck LF. Impact of Three Courses of Intensified CHOP Prior to High-Dose Sequential Therapy Followed by Autologous Stem-Cell Transplantation As First-Line Treatment in Poor-Risk, Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma: Comparative Analysis of Dutch-Belgian Hemato-Oncology Cooperative Group Studies 27 and 40. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 3793-801.
120. Vecina AFC. Características clínicas, sobrevida e aplicação do índice prognóstico internacional nos pacientes com linfoma não–Hodgkin agressivo tratados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2002.
121. Velasques WS, Mc Laughlin P, Tucker S, Hagemeister FB, Swan F, Rodriguez MA, Romaguera J, Rubenstein E, Cabanillas F. ESHAP-An effective chemotherapy regimen in refractory and relapsed lymphoma: A 4-year follow-up study. *J Clin Oncol*. 1992; 12: 1169-76.
122. Verdonck LF, Van Putten WLJ, Hagenbeek A, Schouten H C, Sonneveld P, Van Imhoff GW, Kluin-Nelemans HC, Raemaekers JMM, Van Oers RHJ, Haak HL, Schots R, Dekker A, De Gast GC,

- Lowenberg B. Comparison of CHOP chemotherapy with autologous bone marrow transplantation for slowly responding patients with aggressive non-Hodgkin's Lymphoma. *N Eng J Med.* 1995, 332: 1045-51.
123. Vose JM, Zhang MJ, Rowlings PA, Lazarus HM, Bolwell BJ, Freytes CO, Pavlovsky S, Keating A, Yanes B, Besien K, Armitage J. O.; Horowitz, M. M. Autologous Transplantation for Diffuse aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma in Patients Never Achieving Remission: A Report from the Autologous Blood and Marrow Transplant Registry. *J Clin Oncol.* 2001; 19: 406-13.
 124. Vose JM, Sharp G, Chan WC, Nichols C, Loh K, Inwards D, Rifkin R, Bierman PJ, Lynch JC, Weisenburger DD, Kessinger A, Armitage J. Autologous transplantation for aggressive non-Hodgkin's lymphoma: results of a randomized trial evaluating graft source and minimal residual disease. *J Clin Oncol.* 2002; 20: 2344-52.
 125. Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, Tabin C, Sharpe A, Caput D, Crum C, McKeon F. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial, and epithelial development. *Nature.* 1999, 398: 714-8.
 126. Zinzani PL, Fanti S, Battista G, Tani M, Castellucci P, Stefoni V, Alinari L, Farsad M, Musuraca G, Gabriele A, Marchi E, Nanni C, Canini R, Monetti N, Baccarani M. Predictive role of positron emission tomography (PET) in the outcome of lymphoma patients. *Br J Cancer.* 2004; 91(5): 850-4.