



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**BIOMARCADORES PROGNÓSTICOS E PESQUISA DA
INFECÇÃO PELO EBV NOS LINFOMAS DIFUSOS DE
GRANDES CÉLULAS B DAS TONSILAS PALATINAS E
DOS LINFONODOS**

MARINHO MARQUES DA SILVA NETO

**Salvador – Bahia – Brasil
2009**



004461

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**BIOMARCADORES PROGNÓSTICOS E
PESQUISA DA INFECÇÃO PELO EBV NOS
LINFOMAS DIFUSOS DE GRANDES CÉLULAS B
DAS TONSILAS PALATINAS E DOS LINFONODOS**

MARINHO MARQUES DA SILVA NETO

Orientadora: Iguaracyra Barreto de Oliveira Araújo

Tese apresentada para a obtenção do
grau de Doutor em Patologia Humana

Salvador – Bahia



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

S586b Silva Neto, Marinho Marques
Biomarcadores prognósticos e pesquisa da infecção pelo EBV nos
linfomas difusos de grandes células B das tonsilas palatinas e dos linfonodos
[manuscrito] / Marinho Marques Silva Neto. - 2009.
97 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Centro de Pesquisas Gonçalo
Moniz, 2009.

Orientadora: Profa. Dra. Iguaracyra Barreto de Oliveira Araújo. Departamento
de Anatomia Patológica e Medicina Legal da UFBA.

1. Linfoma Difuso de Grandes Células B 2. Neoplasias das Tonsilas. 3. Vírus
Epstein_Barr. 4. Prognóstico. I.Título.

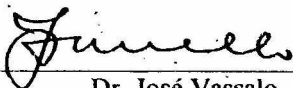
CDU 616-006.44

"Biomarcadores prognósticos e pesquisa da infecção pelo EBV nos linfomas difusos de grandes células B das tonsilas palatinas"

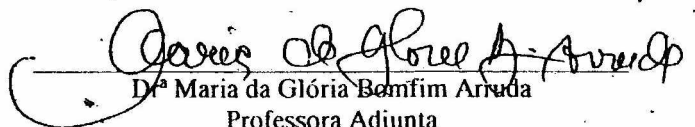
MARINHO MARQUES DA SILVA NETO

FOLHA DE APROVAÇÃO

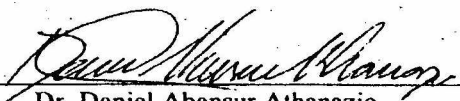
COMISSÃO EXAMINADORA



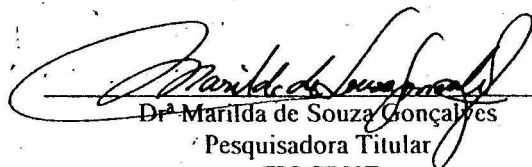
Dr. José Vassalo
Professor Titular
UNICAMP-SP



Dr.ª Maria da Glória Bonfim Arruda
Professora Adjunta
UFBA



Dr. Daniel Abensur Athanazio
Professor Adjunto
UFBA



Dr.ª Marilda de Souza Gonçalves
Pesquisadora Titular
FIOCRUZ



Dr.ª Iguaracyra Barreto de Oliveira Araújo
Professora Adjunta
UFBA

Dedicatória

À minha esposa Estela e
meus filhos Fernanda e Eduardo,
pelos momentos maravilhosos que passamos juntos.

Amo vocês!

“O que torna belo o deserto é que ele esconde um poço em algum lugar.”

(Antoine de Saint-Exupéry)

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte inesgotável de sabedoria que nos impulsiona diariamente.

A minha mãe Lindanece e meus irmãos Nanci, Raquel e Marconi por sempre acreditarem e apoiarem incondicionalmente meus projetos de vida.

A minha orientadora, Profa. Dra. Iguaracyra Araújo, amiga de todas as horas nesta difícil tarefa, que sempre manteve o bom humor e a perseverança necessários ao bom pesquisador.

A todos os funcionários do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Aristides Maltez pela ajuda na identificação dos casos e pelo empenho em localizar os prontuários para a pesquisa de dados, especialmente a Conceição e Ivonilde.

Aos Drs. Michael Hummel e William Harrington Jr (*in memoriam*) pelo auxílio na obtenção dos marcadores imuno-histoquímicos e da hibridização.

A Dra. Graça Vieira pela inestimável ajuda na realização da imuno-histoquímica e da hibridização *in situ*.

A Dra. Márcia Mazzei da Vigilância Epidemiológica do Estado da Bahia pelo fornecimento dos dados de mortalidade do nosso estado, contribuindo de forma importantíssima para análise da sobrevivência dos pacientes.

Ao Dr. Eduardo Netto pelo auxílio na conferência das análises estatísticas.

Ao Dr. Luciano Espinheira pelo auxílio na documentação fotográfica das lâminas.

Enfim, a todos que contribuíram para que este grande sonho se tornasse realidade.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE AS TONSILAS PALATINAS	17
2.2 O LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B	19
2.3 LDGCB DAS TONSILAS PALATINAS	20
2.4 FATORES PROGNÓSTICOS EM LDGCB	22
2.4.1 Fatores prognósticos clínicos	23
2.4.2 Marcadores prognósticos teciduais	24
2.4.2.1 Marcadores do perfil de centro germinativo e não-centro germinativo	25
2.4.2.2 A Proteína p53	29
2.4.2.3 A molécula CD5	31
2.4.2.4 Marcadores de angiogênese em LDGCB	32
2.4.3 Contagem linfocitária ao diagnóstico como fator prognóstico em LDGCB	34
2.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE INFECÇÃO PELO EBV E LDGCB DE CABEÇA E PESCOÇO	36
3 OBJETIVOS	40
3.1 GERAL	40
3.2 ESPECÍFICOS	40
4 JUSTIFICATIVA	41
5 PACIENTES E MÉTODOS	42
5.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES	42
5.2 COLETA DE DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS	42
5.3 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO	43
5.4 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO (IHQ)	43
5.5 HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i>	45

5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	46
6 RESULTADOS	47
6.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS GRUPOS	47
6.2 ÍNDICE PROGNÓSTICO INTERNACIONAL	50
6.3 CONTAGEM LINFOCITÁRIA AO DIAGNÓSTICO	53
6.4 PERFIL DE CENTRO GERMINATIVO E NÃO-CENTRO GERMINATIVO	55
6.5 PROTEÍNA Bcl-2	60
6.6 PROTEÍNA p53	62
6.7 CD34	64
6.8 CD5	68
6.9 HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> PARA EBV	68
7 DISCUSSÃO	70
8 CONCLUSÕES	77
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
ANEXO A	93
APÊNDICE A	94
APÊNDICE B	96
APÊNDICE C	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vista anterior das tonsilas palatinas	17
Figura 2: Vista sagital da tonsila palatina	17
Figura 3: Aspectos histológicos das tonsilas palatinas	18
Figura 4: Algoritmo de decisão para classificação dos LDGCB	26
Figura 5: Aspectos histológicos e imuno-histoquímicos dos linfomas tonsilares	50
Figura 6: Aspectos histológicos e imuno-histoquímicos dos linfomas nodais	51
Figura 7: Expressão IHQ de CD10, Bcl-6 e MUM1 nos linfomas tonsilares	59
Figura 8: Expressão IHQ de CD10, Bcl-6 e MUM1 nos linfomas nodais	60
Figura 9: Expressão IHQ da proteína Bcl-2	63
Figura 10: Expressão IHQ da proteína p53	65
Figura 11: Microvasos marcados pelo CD34	67
Figura 12: Expressão IHQ do CD5	68
Figura 13: Hibridização <i>in situ</i> para o EBV	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variantes morfológicas, subgrupos e subtipos de LDGCB	20
Tabela 2: Dados de sobrevida segundo o IPI e o R-IPI	24
Tabela 3: Marcadores prognósticos teciduais em LDGCB	25
Tabela 4: Papel prognóstico da expressão IHQ de CD10 em LDGCB	28
Tabela 5: Papel prognóstico da expressão IHQ do Bcl-6 em LDGCB	28
Tabela 6: Papel prognóstico da expressão IHQ de MUM1 em LDGCB	28
Tabela 7: Papel prognóstico da expressão IHQ do Bcl-2 em LDGCB	29
Tabela 8: Papel prognóstico da expressão IHQ de p53 em LDGCB	31
Tabela 9: Funções dos antígenos nucleares e proteínas latentes do EBV	37
Tabela 10: Padrões de latência do EBV	38
Tabela 11: Anticorpos utilizados na imuno-histoquímica	44
Tabela 12: Características clínicas e laboratoriais gerais	48
Tabela 13: Características dos pacientes com linfoma tonsilar e nodal segundo a contagem linfocitária	54
Tabela 14: Positividade dos anticorpos do perfil de CG e nCG	56
Tabela 15: Análise de SG e SLE segundo a expressão IHQ de CD10, Bcl-6 e MUM1 (valores de p)	56
Tabela 16: Características dos pacientes com linfoma tonsilar e nodal segundo o perfil de CG ou nCG	58
Tabela 17: Características dos pacientes com linfoma tonsilar e nodal segundo a expressão de Bcl-2	61
Tabela 18: Características dos pacientes com linfoma tonsilar e nodal segundo a expressão de p53	64

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Sobrevida global e sobrevida livre de eventos de todos os pacientes	49
Gráfico 2: Sobrevida global e sobrevida livre de eventos segundo os grupos	49
Gráfico 3: Sobrevidas global e livre de eventos de todos os pacientes segundo o IPI	52
Gráfico 4: Sobrevidas global e livre de eventos dos pacientes com linfoma tonsilar segundo o IPI	52
Gráfico 5: Sobrevidas global e livre de eventos dos pacientes com linfoma nodal segundo o IPI	52
Gráfico 6: Sobrevidas global e livre de eventos de todos os pacientes segundo a contagem linfocitária ao diagnóstico	54
Gráfico 7: Sobrevidas global e livre de eventos dos pacientes com linfoma tonsilar segundo a contagem linfocitária ao diagnóstico	55
Gráfico 8: Sobrevidas global e livre de eventos dos pacientes com linfoma nodal segundo a contagem linfocitária ao diagnóstico	55
Gráfico 9: SG e SLE segundo o perfil (CG ou nCG) de todos os pacientes	57
Gráfico 10: SG e SLE segundo o perfil (CG ou nCG) dos pacientes com linfoma tonsilar	57
Gráfico 11: SG e SLE segundo o perfil (CG ou nCG) dos pacientes com linfoma nodal	58
Gráfico 12: SG e SLE segundo a expressão de Bcl-2 em todos os pacientes	61
Gráfico 13: SG e SLE segundo a expressão de Bcl-2 nos pacientes com linfoma tonsilar	62
Gráfico 14: SG e SLE segundo a expressão de Bcl-2 nos pacientes com linfoma nodal	62
Gráfico 15: SG e SLE segundo a quantidade de microvasos/campo em todos os pacientes	66
Gráfico 16: SG e SLE segundo a quantidade de microvasos/campo nos pacientes com linfoma tonsilar	66
Gráfico 17: SG e SLE segundo a quantidade de microvasos/campo nos pacientes com linfoma nodal	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC: Semelhante à célula B ativada

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ALK: do inglês, *anaplastic lymphoma kinase*

CD: do inglês, *cluster of differentiation*

CG: Centro germinativo

CHOP: Ciclofosfamida, Adriamicina, Vincristina e Prednisona

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COP: Ciclofosfamida, Vincristina e Prednisona

DNA: Ácido desoxirribonucléico

EBNA: Antígeno nuclear do vírus Epstein-Barr

EBV: Vírus Epstein-Barr

ECOG: do inglês, *Eastern Cooperative Oncology Group*

Et al.: E outros

GCB: Semelhante à célula B do centro germinativo

HAM: Hospital Aristides Maltez

H&E: Hematoxilina-eosina

HHV-8: Herpesvírus Humano Tipo 8

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

IHQ: Imuno-histoquímica

IPI: Índice Prognóstico Internacional

LCL: Linhagem de células linfoblastóides

LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B

LDH: Desidrogenase láctica

LMP: do inglês, *latent membrane protein*

LNH: Linfoma não-Hodgkin

LNHs: Linfomas não-Hodgkin

MALT: Tecido linfóide associado a mucosas

MCT: Ministério da Ciência e Tecnologia

mRNA: Ácido ribonucléico mensageiro

MUM1: Oncogene 1 do mieloma múltiplo

MV: Microvasos

NA: Não avaliável

nCG: Não-centro germinativo

NFkB: do inglês, *Nuclear factor Kappa B*

OMS: Organização Mundial da Saúde

p53: Proteína 53

R-CHOP: Rituximab, Ciclofosfamida, Adriamicina, Vincristina e Prednisona

R-IPi: Índice Prognóstico Internacional Revisado

RNA: Ácido ribonucléico

SG: Sobrevida global

SLE: Sobrevida livre de eventos

sVEGF: Fator de crescimento endotelial vascular sérico

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

WHO: do inglês, *World Health Organization*

RESUMO

BIOMARCADORES PROGNÓSTICOS E PESQUISA DA INFECÇÃO PELO EBV NOS LINFOMAS DIFUSOS DE GRANDES CÉLULAS B DAS TONSILAS PALATINAS E DOS LINFONODOS

[INTRODUÇÃO] O LDGCB é o mais comum subtipo histológico de LNH, respondendo por 30-40% dos diagnósticos. Mais de 50% dos linfomas do anel de Waldeyer acometem as tonsilas palatinas e o LDGCB é o principal diagnóstico. Atualmente, os LDGCB estão sendo classificados segundo o perfil de expressão de determinadas proteínas que conferem melhor ou pior prognóstico. A infecção pelo EBV como causa destes linfomas também vem sendo estudada, principalmente na região da cabeça e pescoço, pois a orofaringe é a porta de entrada do vírus no organismo. **[OBJETIVO]** Estudar as características clínicas, laboratoriais e o perfil de expressão imuno-histoquímica para alguns marcadores (CD10, Bcl-2, Bcl-6, MUM1, p53, CD5 e CD34) nos LDGCB das tonsilas palatinas, correlacionando-os com o prognóstico, e estabelecer a associação destes linfomas com a infecção pelo EBV, comparativamente com linfomas nodais. **[PACIENTES E MÉTODOS]** Foram estudados retrospectivamente todos os pacientes com LDGCB das tonsilas palatinas diagnosticados no Hospital Aristides Maltez, em Salvador – Bahia, Brasil, no período de janeiro de 1999 a dezembro de 2006. Foi também estudado um grupo de 19 pacientes com LDGCB nodal diagnosticado no mesmo período. Os pacientes foram submetidos à revisão histopatológica e foi feita IHQ complementar para CD10, Bcl-2, Bcl-6, MUM1, p53, CD5 e CD34. Foi também realizada pesquisa da infecção pelo EBV pela técnica da hibridização *in situ*. A análise de SG e SLE foi feita pelo método de Kaplan-Meier e a comparação destas sobrevidas pelo *log-rank test*. **[RESULTADOS]** De um total de 567 diagnósticos de LNH, o LDGCB representou 44,6% dos casos (253 casos) e os LDGCB das tonsilas palatinas representaram 4,2% do total de diagnósticos (24 casos). Os pacientes com linfoma tonsilar apresentaram LDH significativamente mais baixa que pacientes com linfoma nodal ($p= 0,02$). Pacientes com IPI 0 e 1 apresentaram SG e SLE maior (se considerados todos juntos) que pacientes com IPI ≥ 2 ($p= 0,04$ e $0,005$, respectivamente) e pacientes com linfoma nodal e IPI 0 e 1 apresentaram SLE maior ($p= 0,01$). Pacientes com expressão de Bcl-2 e linfoma tonsilar apresentaram SLE significativamente menor ($p= 0,02$). Pacientes com linfócitos $< 1.000/\text{mm}^3$ ao diagnóstico apresentaram SG menor ($p= 0,02$), se considerados todos juntos. Pacientes com linfoma tonsilar e linfócitos $< 1.000/\text{mm}^3$ apresentaram SG e SLE menores ($p= < 0,0001$ e $0,003$, respectivamente). Não houve diferença significativa na sobrevida entre pacientes dos dois grupos (tonsilar e nodal) e o perfil de CG e não-CG, assim como em relação à expressão de p53 e CD34. A pesquisa de CD5 e da infecção pelo EBV resultaram negativas. **[CONCLUSÃO]** Os parâmetros que influenciaram a SG e a SLE nos pacientes com linfoma tonsilar foram a contagem linfocitária ao diagnóstico e a expressão de Bcl-2. Nos pacientes com linfoma nodal o IPI influenciou a SLE. Não foi demonstrada infecção pelo EBV nos pacientes estudados. **[PALAVRAS-CHAVE]** Biomarcadores; LDGCB; Tonsilas palatinas; EBV.

ABSTRACT

PROGNOSTIC BIOMARKERS AND EBV INFECTION RESEARCH IN DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMAS OF THE PALATINE TONSILS AND LYMPH NODES

[INTRODUCTION] Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most histological subtype of non-Hodgkin lymphoma (NHL), corresponding for 30-40% of the diagnosis. More than 50% of the lymphomas in Waldeyer's ring occur in the palatine tonsils and DLBCL is the main diagnosis. Presently, DLBCL are classified according to the expression profiles of certain proteins that are related to better or worse prognosis. Epstein-Barr virus (EBV) infection as a cause of this lymphomas has been studied, especially in head and neck region, once oropharynx is the main access of this virus into the organism.

[OBJECTIVE] Study the clinical and laboratory characteristic, and the immunohistochemical expression profile for some markers (CD10, Bcl-2, Bcl-6, MUM1, p53, CD5, and CD34) in the DLBCL of the palatine tonsils relating than with the prognosis, and establish an association of this lymphomas with the EBV infection, comparing with nodal lymphomas. **[PATIENTS AND METHODS]**

All patients included at this study were diagnosis with DLBCL of the palatine tonsils and were followed at the Aristides Maltez Hospital during January 1999 to December 2006 was studied retrospectively. A group of 19 patients diagnosed with nodal DLBCL was studied at the same period. The patients were submitted to histopathological review and complementary immunohistochemical was done for CD10, Bcl-2, Bcl-6, MUM1, p53, CD5, and CD34. Search for EBV infection was also done through *in situ* hybridization technique. Overall survival (OS) and event free survival (EFS) analysis was done through Kaplan-Meier method and comparison of these survivals through log-rank test. **[RESULTS]** Out of 567 diagnosis of NHL total, DLBCL represented 44.6% of cases (253 cases) and DLBCL of the palatine tonsils 4.2% of the total diagnosis (24 cases). Patients with tonsils lymphoma had significantly lower LDH (lactate dehydrogenase) value than patients with nodal lymphoma ($p= 0.02$).

Patients with 0 and 1 IPI (International Prognostic Index) had higher OS and EFS (if all were considered together) than patients with IPI ≥ 2 ($p= 0.04$ and 0.005 , respectively), and patients with nodal lymphoma and IPI 0 and 1 had higher EFS ($p= 0.01$). Patients with tonsil lymphoma who expressed Bcl-2 had significantly lower EFS ($p= 0.02$). Patients with lymphocyte count $< 1.000/\text{mm}^3$ had lower OS ($p= 0.02$) if considered all together. Patients with tonsils lymphoma and lymphocyte count $< 1.000/\text{mm}^3$ had lower OS and EFS ($p= < 0.0001$ and 0.003 respectively). There was no significant difference in the survival among patients from both groups (tonsil and nodal) and the GC (germinal center) and non-GC profile, as well as in relation to p53 and CD34 expression. CD5 and EBV infection research was negative. **[CONCLUSIONS]**

Parameters that influenced OS and EFS in the patients with tonsils lymphoma were lymphocyte count at the time of the diagnosis and Bcl-2 expression. IPI influenced EFS in the patients with nodal lymphoma. EBV infection was not found in the studied patients. **[KEY WORDS]** Biomarkers; DLBCL; Palatine tonsils; EBV.

1 INTRODUÇÃO

As tonsilas palatinas, juntamente com os tecidos linfóides da nasofaringe, da base da língua e da parede posterior da orofaringe, compõem o anel linfático de Waldeyer. Este anel localiza-se na entrada dos tratos aéreo e digestivo e é o segundo sítio mais comum de linfomas extranodais após o trato gastrointestinal (YUEN & JACOBS, 1999; NATHU et al., 1999). Estes tumores representam 15 a 20% de todos os linfomas e metade dos linfomas de cabeça e pescoço. Cerca de 50% dos linfomas do anel de Waldeyer acometem as tonsilas palatinas na sua apresentação, podendo ser bilaterais em torno de 20% dos casos (ZUCCA et al., 1999).

A maioria dos linfomas que acomete as tonsilas palatinas é de células B, e destes, o linfoma difuso de grandes células B representa a maioria dos casos, atingindo 80% em algumas séries estudadas (ZUCCA et al., 1999; SILVA NETO et al., 2008).

Embora morfológicamente indistintos alguns estudos moleculares suportam a hipótese de que o LDGCB compreende um grupo heterogêneo de linfomas com implicações prognósticas diferentes (ALIZADEH et al., 2000). Classicamente, o Índice Prognóstico Internacional (SHIPP et al., 1993) vem sendo utilizado para predizer a sobrevida de pacientes com LDGCB, porém ele não é útil em todos os casos. Estudos utilizando análise por DNA *microarray* mostram que o perfil de expressão gênica do LDGCB semelhante às células B do centro germinativo teria melhor prognóstico que o perfil semelhante às células B ativadas (ALIZADEH et al., 2000; ROSENWALD et al., 2002). Transpondo este perfil gênico para a expressão protéica, Hans e colegas (2004) propuseram um algoritmo para classificar os pacientes com LDGCB em perfil de centro germinativo (CG) e não-CG utilizando três marcadores imunohistoquímicos (CD10, Bcl-6 e MUM1): o perfil semelhante ao CG apresentou melhor sobrevida que não-CG. Outros marcadores teciduais, tais como Bcl-2 (MURIS et al., 2006), CD5 (YAMAGUCHI et al., 2002), proteína p53 (PIRIS et al., 1994) e densidade dos microvasos (VACCA et al., 1995) têm sido referidos como preditores de prognóstico em LDGCB. Recentemente, tem sido descrito

que a contagem linfocitária < 1.000 células/mm³ ao diagnóstico está relacionada à sobrevida global inferior em LDGCB (KIM et al., 2007).

Outro marcador prognóstico tecidual controverso tem sido a detecção da infecção pelo Vírus Epstein-Barr (EBV) em células neoplásicas. Enquanto em linfomas de Hodgkin pediátricos esta infecção está relacionada a um melhor prognóstico (ENGEL et al., 2000), em adultos com LDGCB esta infecção parece estar relacionada a um pior prognóstico (PARK et al., 2007) e tem sido detectada em cerca de 9% dos pacientes com LDGCB (PARK et al., 2007). Em linfomas de cabeça e pescoço, entretanto, este índice parece ser mais elevado, atingindo 90% no Egito (BAHNASSY et al., 2006).

Considerando que o uso do IPI tem se mostrado insuficiente como único marcador prognóstico em LDGCB, avaliamos a significância prognóstica de outros marcadores laboratoriais e teciduais, tais como contagem linfocitária ao diagnóstico, perfil imuno-histoquímico, densidade vascular e infecção pelo EBV em LDGCB tonsilares. Para tanto, estes linfomas foram comparados com LDGCB nodais, todos procedentes de uma instituição de referência para o diagnóstico e tratamento de pacientes com câncer no nordeste do Brasil.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE AS TONSILAS PALATINAS

As tonsilas palatinas são massas de tecido linfóide localizadas lateralmente na parede da orofaringe (**Figuras 1 e 2**) e representam o maior acúmulo de tecido linfóide do anel de Waldeyer, composto também pela tonsila faríngea, pelo tecido linfóide da base da língua e pelo tecido linfóide da parede posterior da orofaringe (GOSS, 1988).

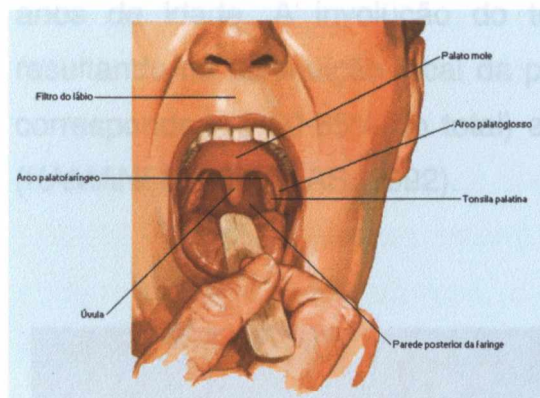


Figura 1: Vista anterior das tonsilas palatinas (adaptado de Netter – Atlas de Anatomia)

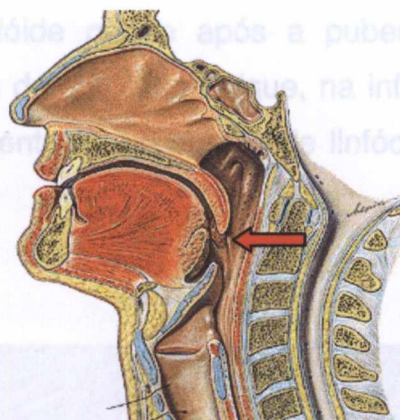


Figura 2: Vista sagital da tonsila palatina (adaptado de Sobotta – Atlas de Anatomia)

As tonsilas palatinas estão estrategicamente localizadas na entrada do trato aerodigestivo para a proteção imunológica do mesmo. São recobertas por epitélio estratificado pavimentoso semelhante ao do palato. As tonsilas palatinas apresentam em sua superfície 10 a 30 invaginações bem desenvolvidas denominadas criptas. Cada cripta é circundada por uma camada de tecido linfático contendo numerosos nódulos linfáticos esparsos, cujos centros germinativos são especialmente desenvolvidos em crianças e adultos jovens (GOSS, 1988; KAMANI & DOUGLAS, 1992) (**Figura 3**).

Uma fina cápsula de tecido conjuntivo, derivada da submucosa da faringe, envolve toda a tonsila palatina e envia delicados septos entre as camadas de tecido linfático que envolve as criptas. O epitélio escamoso das criptas possui

sistema complexo de transporte através de microporos que levam antígenos ingeridos ou inalados ao tecido linfóide subjacente (GOSS, 1988). Dentro do tecido linfóide o antígeno entra em contato com as células processadoras de antígenos, responsáveis por apresentá-lo aos linfócitos T. Quando há uma concentração suficiente de um antígeno, é estimulada a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos e sua expansão clonal. Isso resulta na produção de imunoglobulinas que é transportada à superfície mucosa, fornecendo proteção imunológica local. Mecanismos de defesa no interior da tonsila palatina eliminam os estímulos antigênicos mais fracos. Por isso, apenas concentrações antigênicas elevadas induzem a proliferação de linfócitos B nos centros germinativos. As tonsilas são imunologicamente ativas entre os quatro e 10 anos de idade. A involução do tecido linfóide ocorre após a puberdade, resultando na diminuição local da população de linfócitos B (que, na infância, correspondem a 50-65% do total) e no aumento da proporção de linfócitos T (KAMANI & DOUGLAS, 1992).

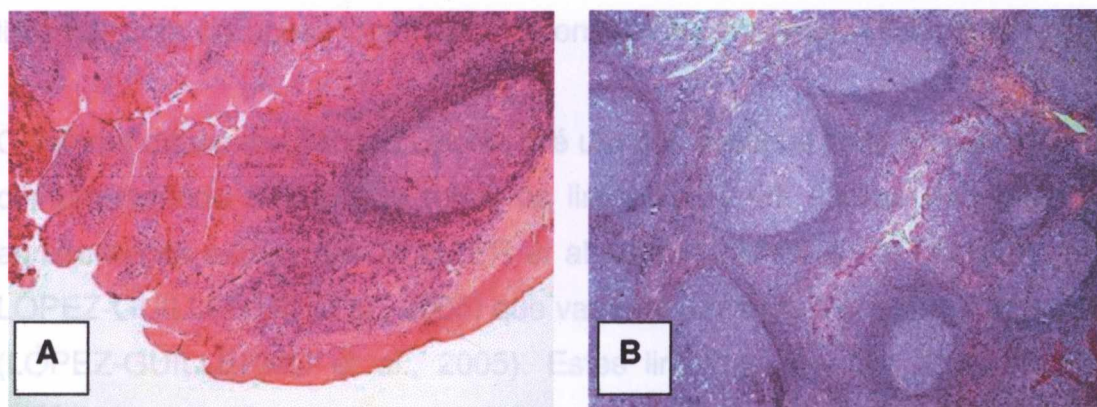


Figura 3: Aspectos histológicos das tonsilas palatinas. Em **A** observam-se o epitélio estratificado e o sistema de criptas (H&E, 40X). Em **B** observam-se os folículos linfóides (H&E, 40X). Disponível em <<http://www.uv.es/histomed/odonto/07-amigdala/07-amigdala.htm>>.

As tonsilas palatinas lembram o tecido linfóide associado a mucosas (MALT) do trato intestinal na sua relação com o epitélio faríngeo e não possuem vasos linfáticos aferentes (ZUCCA et al, 1999), por isso, são consideradas como órgãos extranodais (ZUCCA et al, 1999; SWERDLOW et al., 2008).

2.2 O LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B

O LDGCB é uma neoplasia de células linfóides B grandes com tamanho do núcleo igual ou maior que o núcleo de um macrófago normal ou mais do que duas vezes o tamanho de um linfócito normal, que tem um padrão de crescimento difuso (SWERDLOW et al., 2008). Citomorfologicamente, o LDGCB pode ser dividido em variantes morfológicas comuns (centroblástica, imunoblástica e anaplásica) e raras (com estroma mixóide ou com matriz fibrilar, com formação de pseudo-rosetas, dentre outras). As células neoplásicas expressam marcadores pan-B como CD19, CD20, CD22 e CD79a, mas podem perder a expressão de um ou mais destes marcadores. Imunoglobulina de superfície e/ou citoplasmática pode ser demonstrada em 50-75% dos casos (SWERDLOW et al., 2008).

A nova classificação da OMS de 2008 (SWERDLOW et al., 2008) inclui para os LDGCB algumas variantes morfológicas, dois subgrupos moleculares, três subgrupos imuno-histoquímicos, outros subtipos especificados de LDGCB e linfomas com situações intermediárias entre duas entidades (**Tabela 1**).

O linfoma difuso de grandes células B é um dos subtipos mais comuns de LNH, compreendendo 30-40% de todos os linfomas. É um subtipo com frequente apresentação extranodal (MOLLER et al., 2004; JAFFE & PITTALUGA, 2005; LÓPEZ-GUILLERMO et al., 2005) que varia de um terço a um quarto dos casos (LÓPEZ-GUILLERMO et al., 2005). Estes linfomas têm um comportamento biológico agressivo, mas respondem bem à quimioterapia. As taxas de remissão completa com os regimes modernos de quimioterapia chegam a 75-80%, com sobrevida livre de doença duradoura em mais de 50% dos casos (JAFFE & PITTALUGA, 2005).

Tabela 1: Variantes morfológicas, subgrupos e subtipos de LDGCB

1- Linfoma difuso de grandes células B, sem outras especificações

- 1.1- Variantes morfológicas comuns:
 - 1.1.1- Centrolástica
 - 1.1.2- Imunoblástica
 - 1.1.3- Anaplásica
- 1.2- Variantes morfológicas raras
- 1.3- Subgrupos moleculares:
 - 1.3.1- Semelhante às células B do centro germinativo
 - 1.3.2- Semelhante às células B ativadas
- 1.4- Subgrupos imuno-histoquímicos:
 - 1.4.1- Linfoma difuso de grandes células B CD5 positivo
 - 1.4.2- Semelhante às células B do centro germinativo
 - 1.4.3- Semelhante às células B não do centro germinativo

2- Subtipos de linfoma difuso de grandes células B

- 2.1- Linfoma de grandes células B, rico em células T/histiócitos
- 2.2- Linfoma difuso de grandes células B primário do sistema nervoso central
- 2.3- Linfoma difuso de grandes células B primário cutâneo, tipo da perna
- 2.4- Linfoma difuso de grandes células B EBV positivo dos idosos

3- Outros linfomas de grandes células B

- 3.1- Linfoma de grandes células B primário do mediastino (tímico)
- 3.2- Linfoma de grandes células B intravascular
- 3.3- Linfoma difuso de grandes células B associado com inflamação crônica
- 3.4- Granulomatose linfomatóide
- 3.5- Linfoma de grandes células B ALK positivo
- 3.6- Linfoma plasmoblástico
- 3.7- Linfoma de grandes células B surgindo na doença de Castleman multicêntrica associada ao HHV-8
- 3.8- Linfoma primário de efusão

4- Casos “borderlines”

- 4.1- Linfoma de células B, inclassificável, com características intermediárias entre linfoma difuso de grandes células B e linfoma de Burkitt
 - 4.2- Linfoma de células B, inclassificável, com características intermediárias entre linfoma difuso de grandes células B e linfoma de Hodgkin clássico
-

Fonte: adaptado de Swerdlow et al., 2008.

2.3 LDGCB DAS TONSILAS PALATINAS

O anel de Waldeyer é o segundo sítio mais comum de linfomas não-Hodgkin extranodais após o trato gastrointestinal. Estes tumores representam 15 a 20% de todos os linfomas e, aproximadamente, metade dos linfomas de cabeça e pescoço (YUEN & JACOBS, 1999; NATHU et al., 1999). Cerca de metade dos

LNHs do anel de Waldeyer acometem as tonsilas palatinas e podem ser bilaterais em torno de 20% dos casos (ZUCCA et al., 1999).

Em relação à histologia, a grande maioria dos linfomas que acometem as tonsilas são linfomas de células B, com o LDGCB representando mais de 70% destes linfomas (ZUCCA et al., 1999; SILVA NETO et al., 2008). As séries publicadas sobre LDGCB das tonsilas palatinas mostram predomínio de acometimento do sexo masculino e idade ao diagnóstico em torno de 60 anos.

Em 1994, Lee et al. publicaram estudo realizado na Coréia com 18 pacientes com LNH do anel de Waldeyer. Treze destes pacientes tinham linfoma nas tonsilas palatinas e nove tinham LDGCB, havendo discreto predomínio em pacientes do sexo masculino.

Krol et al., em 2001, publicaram grande estudo sobre linfomas do anel de Waldeyer realizado na Holanda. Foram avaliados 1.168 pacientes e destes, 101 (9%) tinham linfoma do anel de Waldeyer. As tonsilas estavam acometidas em 62% dos pacientes (n= 42) e o LDGCB foi encontrado em 66% dos pacientes. Neste estudo houve discreto predomínio de pacientes do sexo feminino, com idade superior a 60 anos. Também em 2001, Ezzat et al. estudaram 130 pacientes sauditas com linfoma do anel de Waldeyer. O sítio primário destes linfomas foi a tonsila palatina em 58% dos casos e o LDGCB representou 84% dos diagnósticos. Houve predomínio do sexo masculino, porém a idade ao diagnóstico destes pacientes foi menor que 60 anos em 65% dos casos.

Na Turquia, Gurkaynak et al. publicaram estudo realizado em 2003 com 32 casos de LNH do anel de Waldeyer. Cinquenta por cento dos pacientes tinham envolvimento das tonsilas palatinas ao diagnóstico e com 13 casos de LDGCB. Também houve predomínio discreto do sexo masculino e a idade média ao diagnóstico foi de 46 anos.

Em 2005, estudo realizado no Irã (MOHAMMADIANPANAHA et al.) mostra 19 casos de LNH das tonsilas palatinas, com 10 casos de LDGCB. Os pacientes

deste estudo eram predominantemente do sexo masculino, com idade média de 44 anos. Também em 2005, Frata et al. publicaram estudo com 107 pacientes com LNH de cabeça e pescoço realizado na Itália. O sítio primário do linfoma foi a tonsila palatina em 58% dos casos e 80% dos pacientes tinham linfoma de grau intermediário, contudo sem descrição exata da histologia. Novamente o predomínio foi de pacientes do sexo masculino e com idade maior que 60 anos.

Mais recentemente, estudo local (Salvador – Bahia), demonstrou que, de 145 diagnósticos de LNH realizados em uma instituição de referência em câncer, 30,3% eram extranodais, sendo 65% destes localizados na região de cabeça e pescoço. O acometimento das tonsilas foi observado em 11/40 casos (27,5%) de linfoma extranodal e, nesta localização, o LDGCB foi o subtipo histológico mais comum com nove diagnósticos (SILVA NETO et al., 2008).

2.4 FATORES PROGNÓSTICOS EM LDGCB

O LDGCB é uma entidade heterogênea. Na classificação da OMS múltiplas variantes morfológicas são reconhecidas e uma variedade de anormalidades genéticas e moleculares estão presentes de forma variável (SWERDLOW et al., 2008), além do que os pacientes exibem variadas apresentações clínicas e diferentes respostas à terapia. Entretanto, os avanços na biologia molecular têm levado a um reconhecimento de novas entidades e há uma tentativa de agrupar os subtipos histológicos de LDGCB de acordo com o prognóstico (SEHN, 2006).

Para que um marcador prognóstico possa ser útil clinicamente ele deve obedecer a alguns critérios: as amostras do marcador devem estar acessíveis; a tecnologia deve estar uniformemente disponível; a metodologia deve estar padronizada e deve poder ser reproduzível; o marcador deve ser independente de outros marcadores prognósticos reconhecidos; deve predizer uma ampla taxa de resultados clínicos ou caracterizar um subgrupo que possa se beneficiar de uma terapia específica e deve ser validado prospectivamente em

uma população de pacientes independentes (SEHN, 2006; LOSSOS & MORGENZTERN, 2006).

A informação prognóstica necessária pode ser baseada em dados clínicos ou pode ser obtida através do estudo de amostras de tecido tumoral. Cuidado especial deve ser tomado neste último caso, pois a conservação das amostras é parte fundamental para que o(s) estudo(s) possa(m) ter resultado(s) confiável(is). É importante também reconhecer que a informação trazida por determinado marcador clínico ou biológico pode ser um “alvo em movimento”, pois a introdução de novas terapias pode significar alteração na relevância de determinado fator prognóstico previamente reconhecido como útil (SEHN, 2006; WILSON et al., 2007).

2.4.1 Fatores prognósticos clínicos

O Índice Prognóstico Internacional (IPI) tem sido uma ferramenta amplamente utilizada para prever a sobrevida de pacientes com linfomas agressivos, incluindo o LDGCB. Baseado no número de fatores prognósticos negativos ao diagnóstico (idade maior que 60 anos, estadiamento III/IV da doença, nível de LDH elevado, ECOG maior que ou igual a dois e mais de um sítio extranodal de doença presente), quatro grupos prognósticos foram identificados com sobrevida global variando de 26-73% (SHIPP et al., 1993) (**Tabela 2**).

Mais recentemente, após o advento da imunoterapia nos LDGCB (anticorpo monoclonal anti-CD20), foi realizada uma análise retrospectiva de 365 pacientes tratados com esquema R-CHOP na *British Columbia* (IPI revisado ou R-IPI). Embora o IPI mantivesse seu valor prognóstico, apenas três grupos prognósticos foram identificados, com sobrevida global variando de 55-94% (SEHN et al., 2007). Contudo, estes dados precisam ser validados em ensaios prospectivos com população independente. A tabela 2 sumariza os dados de sobrevida relativos ao IPI e ao R-IPI.

Tabela 2: Dados de sobrevida segundo o IPI e o R-IPI

Grupos de risco	Número de fatores	% de pacientes	Sobrevida global (%)
IPI (n= 2.031)			(em 5 anos)
Baixo	0 ou 1	35	73
Baixo-intermediário	2	27	51
Alto-intermediário	3	22	43
Alto	4 ou 5	16	26
R-IPI (n= 365)			(em 4 anos)
Muito bom	0	10	94
Bom	1 ou 2	45	79
Ruim	3, 4 ou 5	45	55

Fontes: adaptada de Shipp et al., 1993 e Sehn et al., 2007.

2.4.2 Marcadores prognósticos teciduais

A heterogeneidade do LDGCB torna-se mais evidente diante da expressão variável de uma grande quantidade de marcadores teciduais, alguns dos quais vistos como preditores de resposta à terapia. Embora o estudo de certos marcadores individualmente tenha aumentado o conhecimento sobre a patogênese do LDGCB, muitos estudos ainda apresentam resultados conflitantes (SEHN, 2006).

A **tabela 3** apresenta uma lista de marcadores teciduais, seu papel prognóstico nos LDGCB e o mecanismo envolvido.

Neste trabalho foram analisados principalmente os marcadores teciduais relacionados com a diferenciação celular. A seguir estão descritos os biomarcadores avaliados por expressão imuno-histoquímica no contexto do nosso trabalho.

Tabela 3: Marcadores prognósticos teciduais em LDGCB

Marcador prognóstico	Efeito no resultado	Mecanismo
Bcl-2*	Desfavorável	Anti-apoptose
Bcl-6*	Favorável	Repressor transcricional
CD10*	Favorável	Endopeptidase neutra
CD5*	Desfavorável	Diferenciação da célula B
FOXP1	Desfavorável	Fator de transcrição
MUM1*	Desfavorável	Fator de transcrição
Proteína p53*	Desfavorável	Regulação do ciclo celular
Alta densidade dos microvasos (CD34)*	Desfavorável	Angiogênese
Ciclinas D2/D3	Desfavorável	Regulação do ciclo celular
Survivina	Desfavorável	Anti-apoptose
CD21	Favorável	Diferenciação da célula B
sVEGF	Desfavorável	Angiogênese

Fonte: adaptada de Sehn, 2006. * Marcadores utilizados neste trabalho

2.4.2.1 Marcadores do perfil de centro germinativo e não-centro germinativo

Estudos de perfil de expressão gênica têm tentado caracterizar alterações específicas em células tumorais através da expressão de mRNA. Estes estudos têm confirmado que existem subgrupos moleculares distintos de LDGCB. Os dois principais subtipos identificados mostram perfil similar às células B normais do centro germinativo (GCB) e outro que mimetiza o de células B ativadas do sangue periférico (ABC) (ALIZADEH et al., 2000).

Usando a tecnologia de DNA *microarray*, Alizadeh et al. (2000) demonstraram que pacientes com LDGCB com perfil de expressão gênica semelhante às células B do centro germinativo apresentaram sobrevida global significativamente superior a pacientes que apresentaram perfil semelhante ao das células B ativadas do sangue periférico, pois estes últimos apresentam uma ativação constitutiva da via do NFκB, que leva a um bloqueio da apoptose induzida pela quimioterapia (DAVIS et al., 2001).

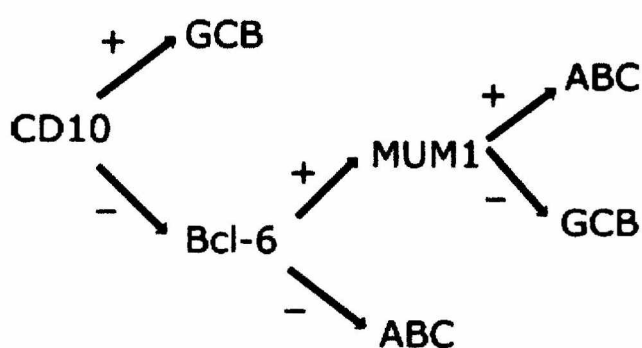
Em 2002, Rosenwald et al. também utilizando a tecnologia de DNA *microarray*, mostraram mais uma vez que pacientes com LDGCB com perfil semelhante a

GCB apresentavam melhor sobrevida que pacientes com perfil semelhante a ABC.

Contudo, devido à falta de padronização dos testes comercialmente disponíveis referidos acima e à necessidade de amostras de tecido fresco ou congelado, esta ainda não é uma metodologia de uso rotineiro na prática diagnóstica atual. Por isso, diversos investigadores, baseados em informações derivadas de estudos de DNA *microarray*, têm tentado criar modelos mais reprodutíveis utilizando outras técnicas, como a imuno-histoquímica.

Em 2004, Hans et al. utilizando a expressão imuno-histoquímica de três marcadores (CD10, Bcl-6 e MUM1), estudaram 152 pacientes com LDGCB e categorizam-nos em pacientes com perfil de centro germinativo (CG) e não-centro germinativo (não-CG), conforme mostrado na **figura 4**. Pacientes com perfil de CG mostraram sobrevida global significativamente melhor que pacientes com perfil não-CG. O estudo serviu ainda para validar esta técnica como uma modalidade alternativa mais acessível que o DNA *microarray*.

Figura 4: Algoritmo de decisão para classificação dos LDGCB



Fonte: adaptado de Hans et al., 2004.

O CD 10 é uma endopeptidase neutra associada à membrana celular que é expresso em uma variedade de tecidos humanos, mas no tecido linfóide tem

expressão restrita em células do centro germinativo (DOGAN et al., 2000). O Bcl-6 é uma proteína que atua como um repressor transcripcional e é expresso em células B do centro germinativo e em uma sub-população de células T CD4 positivas (HANS et al., 2004). MUM1 é um membro da família dos interferons e é expresso em plasmócitos e na fase final de diferenciação da célula B, podendo ser considerado um marcador de célula B pós-centro germinativo (HANS et al., 2004). Outro marcador muito frequente em células neoplásicas centrofoliculares é o Bcl-2. Apesar de não ser utilizado no algoritmo de Hans et al. (2004), ele tem sido identificado em diversos estudos como um marcador prognóstico em LDGCB. O Bcl-2 é uma proteína anti-apoptótica que é importante no desenvolvimento e diferenciação da célula B normal (SEHN, 2006) e está ausente nos centros germinativos não neoplásicos. O papel prognóstico da expressão por IHQ do CD10, Bcl-6, MUM1 e Bcl-2, isoladamente, em alguns trabalhos realizados em pacientes com LDGCB são sumarizados nas **tabelas 4, 5, 6 e 7**, respectivamente.

Especificamente em relação ao LDGCB das tonsilas palatinas e sua classificação segundo o perfil de CG ou não-CG, apenas dois estudos foram encontrados. Em 2003, Ree et al. estudaram retrospectivamente 51 pacientes (42 coreanos e 9 japoneses) com LDGCB das tonsilas palatinas. Houve predomínio do sexo masculino e a idade média dos pacientes foi de 61 anos. Uma discreta maioria dos pacientes (51%) apresentou perfil semelhante às células do CG, caracterizado apenas pela expressão de Bcl-6, porém estes autores não utilizaram MUM1 e nem utilizaram nenhum algoritmo já descrito na literatura para classificar melhor os grupos.

Em 2009, Wong et al. estudaram 17 pacientes com LDGCB das tonsilas palatinas na Malásia. Utilizando o algoritmo de Hans et al. (2004), seis pacientes foram classificados como perfil semelhante ao CG e 11 pacientes foram classificados como não-CG. Também houve discreto predomínio de pacientes do sexo masculino (nove casos) e a idade dos pacientes variou de 19-76 anos.

Tabela 4: Papel prognóstico da expressão IHQ de CD10 em LDGCB

Referência	Número de pacientes	Percentual de casos positivos	Análise estatística (sobrevida global)
Ohshima et al., 2001*	138	28,2%	Significante
Colomo et al., 2003	128	21%	Não significativa
Hans et al., 2004*	152	28%	Significante
Fabiani et al., 2004	98	34%	Não significativa
Biasoli et al., 2005	83	25%	Não significativa
Berglund et al., 2005*	159	35%	Significante
De Paepe et al., 2005	151	40%	Não significativa
Muris et al., 2006*	71	23%	Significante
Van Imhoff et al., 2006*	64	50%	Significante

*Nota: a positividade foi associada com sobrevida global **superior** nestes estudos.

Tabela 5: Papel prognóstico da expressão IHQ do Bcl-6 em LDGCB

Referência	Número de pacientes	Percentual de casos positivos	Análise estatística (Sobrevida global)
Lossos et al., 2001*	30	63,3%	Significante
Colomo et al., 2003	127	72%	Não significativa
Hans et al., 2004*	152	56%	Significante
Berglund et al., 2005*	161	48%	Significante
De Paepe et al., 2005	153	70,5%	Não significativa
Muris et al., 2006	71	58%	Não significativa
Winter et al., 2006*	199	77%	Significante
Veelken et al., 2007*	60	85%	Significante

*Nota: a positividade foi associada com sobrevida global **superior** nestes estudos.

Tabela 6: Papel prognóstico da expressão IHQ de MUM1 em LDGCB

Referência	Número de pacientes	Percentual de casos positivos	Análise estatística (Sobrevida global)
Colomo et al., 2003	126	54%	Não significativa
Hans et al., 2004*	151	47%	Significante
De Paepe et al., 2005	152	58,5%	Não significativa
Muris et al., 2006*	71	65%	Significante
Van Imhoff et al., 2006*	64	17%	Significante

*Nota: a positividade foi associada com sobrevida global **inferior** nestes estudos.

Tabela 7: Papel prognóstico da expressão IHQ do Bcl-2 em LDGCB

Referência	Número de pacientes	Percentual de casos positivos	Análise estatística (Sobrevida global)
Hermine et al., 1996*	151	45%	Significante
Kramer et al., 1996	165	42%	Não significativa
Gascoyne et al., 1997*	116	28%	Significante
Barrans et al., 2002*	111	56%	Significante
Colomo et al., 2003*	126	59%	Significante
Sohn et al., 2003	94	26,4%	Não significativa
Hans et al., 2004	152	50%	Não significativa
Biasoli et al., 2005*	86	42%	Significante
Berglund et al., 2005*	156	55%	Significante
Pedersen et al., 2005*	76	51%	Significante
Muris et al., 2006*	71	30%	Significante
Van Imhoff et al., 2006*	64	45%	Significante
Amen et al., 2007*	79	45,7%	Significante

***Nota:** a positividade foi associada com sobrevida global **inferior** nestes estudos.

Também é necessário que os marcadores prognósticos teciduais em LDGCB sejam validados na era da imunoterapia. Wilson et al., em 2007, publicaram estudo realizado no Canadá com 140 pacientes com LDGCB e concluíram que a terapia com esquema R-CHOP pode reverter o efeito prognóstico adverso da expressão de Bcl-2 nestes pacientes.

2.4.2.2 A Proteína p53

O gene supressor tumoral *P53* encontra-se situado no braço curto do cromossomo 17 (região p13.1) e transcreve a proteína nuclear de 53 kilodaltons, denominada proteína 53 (p53). O termo “guardião do genoma” atribuído a esta proteína é decorrente da sua função de monitoramento da integridade do genoma, impedindo a proliferação de células com DNA mutado (LANE, 1992). A proteína p53, quando acumulada no núcleo celular, inibe o ciclo mitótico no início da fase G1 e ativa a transcrição de genes de reparo, impedindo a propagação do erro genético para as células filhas. No entanto, se o reparo do DNA não for efetuado de forma satisfatória, a proteína p53 dispara o mecanismo de apoptose. A proteína pode perder a sua função quando o gene sofre mutação pontual, deleção gênica e por inserção de novos

nucleotídeos na sequência do DNA. Quando alterada, se acumula no núcleo celular, sendo facilmente visualizada por técnicas de imuno-histoquímica e perde a capacidade de parar o ciclo celular e de induzir a apoptose. Ocorre então a proliferação de células clonais com instabilidade genética e transformação neoplásica (MILNER, 1997; STEELE et al., 1998; NIEDER et al., 2001; KLUMB & CAVALCANTI JÚNIOR, 2002).

Um dos primeiros relatos da expressão de p53 em LDGCB foi feito em 1996 por Kramer et al. Eles estudaram 372 pacientes com LDGCB na Holanda e a expressão da proteína p53 foi estudada em 364 destes pacientes, com 13% dos casos positivos. Não houve diferença na sobrevida entre os pacientes positivos e negativos, porém a forte expressão da proteína p53 foi relacionada à pacientes com alta carga tumoral.

Em 1997, Ichikawa et al. demonstraram que pacientes japoneses com mutações no gene *P53* apresentam pior prognóstico que os pacientes com gene *P53* não mutado. Neste trabalho foram estudados pacientes com linfoma de células B agressivos, sendo excluídos casos de linfoma linfoblástico e linfoma de pequenas células não-clivadas.

Miyauchi et al. (2000) descrevem 13 casos de pacientes com LNH de células B na região da cabeça e pescoço. Destes 13 casos, nove mostram expressão da proteína p53 (69,2%) e sete mostram mutação no gene *P53* (53,8%). Nesta casuística, dois pacientes apresentavam LDGCB do anel de Waldeyer, sendo que nenhum dos dois tinha mutação do gene *P53*, porém um apresentava expressão da proteína p53.

Ao longo dos últimos anos diversos estudos têm tentado esclarecer o papel da expressão imuno-histoquímica da proteína p53 nos LDGCB. Este papel ainda é controverso, pois parte dos estudos mostra um prognóstico desfavorável quando há expressão de p53 e outros não mostram esse achado, conforme detalhado a seguir na tabela 8.

Tabela 8: Papel prognóstico da expressão IHQ de p53 em LDGCB

Referência	Número de pacientes	Percentual de casos positivos	Análise estatística (Sobrevida global)
Piris et al., 1994*	119	26%	Significante
Navaratnam et al., 1998*	50	40%	Significante
Sanchez et al., 1998	141	30%	Não significativa
Pagnano et al., 2001*	62 (52 com LDGCB)	30%	Significante
Leroy et al., 2002*	69	23%	Significante
Sohn et al., 2003	94	22,6%	Não significativa
Kerbauy et al., 2004	48	60%	Não significativa
Paik et al., 2005	214	44,4%	Não significativa
Visco et al., 2006*	80	23%	Significante
Domingues, 2006	75	41%	Não significativa

*Nota: a positividade foi associada com sobrevida global **inferior** nestes estudos.

2.4.2.3 A molécula CD5

A molécula CD5 é uma glicoproteína de 67 KD que aparentemente está envolvida na modulação da sinalização dos receptores das células B e T. Esta molécula é considerada um marcador pan-T e está presente em células T pós-tímicas, bem como em tímócitos. Entretanto, está também presente em um pequeno número de células B não-neoplásicas (linfócitos B1) (HSI & YEGAPPAN, 2001).

O CD5 é expresso na maioria dos casos de leucemia linfóide crônica e linfoma de células do manto e em poucos casos de LDGCB *de novo* (cerca de 5-10% dos casos) (HARADA et al., 1999; YAMAGUCHI et al., 2002; SWERDLOW et al., 2008). Estudos mostram que LDGCB *de novo*, com expressão de CD5, formam um subgrupo particular, distinto daqueles desenvolvidos a partir de LNH linfocítico/leucemia linfóide crônica ou de linfoma de células do manto (TANIGUCHI et al., 1998; YAMAGUCHI et al., 2002), provavelmente por mutações envolvendo o gene da cadeia pesada da imunoglobulina (TANIGUCHI et al., 1998; KATZENBERGER et al., 2003; NAKAMURA et al., 2005).

Diversos estudos têm mostrado que LDGCB com expressão de CD5 apresentam pior prognóstico que pacientes com LDGCB CD5 negativos (YAMAGUCHI et al, 2002; SUGURO et al., 2006; ENNISHI et al., 2008). As características clínicas dos pacientes com LDGCB CD5 positivos são: geralmente pacientes idosos, com predomínio do sexo feminino e frequente envolvimento de órgãos extranodais (YAMAGUCHI et al., 2002; ENNISHI et al., 2008; YAMAGUCHI et al., 2008).

Na mais recente classificação de linfomas da OMS (SWERDLOW et al., 2008), a sub-classificação dos LDGCB passou a apresentar um grupo definido por suas características imuno-histoquímicas que inclui os LDGCB CD5 positivos, firmando-o como uma entidade distinta.

Apenas no trabalho de Taniguchi et al., em 1998, observamos descrição de pacientes com LDGCB CD5 positivos do anel de Waldeyer (em três dos 13 pacientes descritos). Porém, o número reduzido de pacientes positivos para CD5 neste trabalho não permitiu análise estatística.

2.4.2.4 Marcadores de angiogênese em LDGCB

Os vasos sanguíneos são importantes para manter a homeostase de virtualmente todas as células do organismo, que geralmente distam, no máximo, 100 μm de um capilar. A angiogênese é a geração de novos capilares a partir de vasos sanguíneos pré-existentes, geralmente por dois mecanismos: brotamento e intussuscepção (FOLKMAN, 1971; FOLKMAN, 1995; RISAU, 1997; CARMELIET & JAIN, 2000).

Trabalhos pioneiros sobre este tema mostram que a angiogênese tem um papel importante no desenvolvimento, na progressão e no mecanismo de metástase de alguns tumores (FOLKMAN, 1971; FOLKMAN, 1995). A densidade dos microvasos é frequentemente usada como um parâmetro de angiogênese. Em linfomas, o papel da angiogênese é ainda pouco conhecido. Alguns estudos têm sugerido associação entre densidade alta dos microvasos e uma histologia mais agressiva (VACCA et al, 1995), mas o valor como fator

prognóstico é ainda desconhecido, principalmente porque outros estudos mostram que baixa densidade dos microvasos pode estar associada com resistência à quimioterapia (KOSTER et al., 2005).

Estudos sobre angiogênese especificamente em LDGCB ainda são escassos. As medidas de densidade de microvasos geralmente são feitas pela marcação com CD34, que é expresso pelas células endoteliais (NORRBY & RIDELL, 2003). Em 2003, Norrby & Ridell, realizaram estudo com 31 pacientes, sendo que sete tinham LDGCB. Estes pacientes mostraram uma média de microvasos marcados pelo CD34 considerada intermediária entre linfoma de células do manto (com mais baixa densidade) e leucemia linfóide crônica (com mais alta densidade).

Em 2004, Mazur et al. não encontraram diferença entre a densidade de microvasos, medida pela expressão de CD34, em pacientes com linfomas agressivos (incluindo LDGCB) e LNH indolentes. O mesmo achado foi publicado por Ruan et al., em 2006, ao estudarem 28 pacientes com LDGCB. Também não foi encontrada diferença na resposta à quimioterapia em um estudo de densidade de microvasos com 36 pacientes com LDGCB (BAIREY et al., 2000).

Gratzinger et al., em 2007, estudaram a expressão de marcadores da angiogênese em 94 pacientes com LDGCB e analisaram os resultados segundo o perfil do linfoma: perfil de centro germinativo ou pós-centro germinativo. Não foram encontradas diferenças entre as taxas de vascularização nos dois subgrupos.

Também em 2007, Jorgensen et al., mostraram que o perfil de densidade dos microvasos não teve nenhum impacto na sobrevida de pacientes com LDGCB, não havendo também correlação entre o perfil de densidade dos microvasos (se alto ou baixo) com parâmetros prognósticos pré-tratamento como IPI, infiltração da medula óssea, estadiamento clínico, aumento de LDH e alto índice de proliferação celular.

Contrariamente a alguns estudos, Tzankov et al. (2007) publicaram trabalho que mostra um aumento significativo na densidade dos microvasos em pacientes com LDGCB *de novo* nodais em relação a pacientes com outras histologias como linfoma de células do manto, linfoma folicular e LNH linfocítico. Também, neste estudo, os parâmetros de angiogênese estudados não se correlacionaram com parâmetros clínicos pré-tratamento e nem com sobrevida.

Mais recentemente, Lenz et al. (2008) introduzem um novo conceito, o de assinatura estromal em LDGCB. Observou-se que pacientes com LDGCB mostravam dois perfis baseados na expressão de alguns genes: a) perfil **estromal-1**, refletindo deposição de matriz extracelular e infiltração histiocitária, e b) perfil **estromal-2**, refletindo densidade dos vasos sanguíneos do tumor aumentada. Os pacientes com perfil estromal-2 apresentaram pior sobrevida que os demais.

Não foram encontrados estudos comparando diferentes sítios de envolvimento (por exemplo, nodal e extranodal) e sua densidade de microvasos, principalmente na região de cabeça e pescoço.

2.4.3 Contagem linfocitária ao diagnóstico como fator prognóstico em LDGCB

A presença de linfocitopenia ao diagnóstico (< 1.500 linfócitos/mm³) tem sido associada com pior prognóstico em várias doenças hematológicas malignas. Pacientes com baixa contagem de linfócitos ao diagnóstico (principalmente < 1.000 células/mm³) que tiveram linfoma folicular (SIDDIQUI et al., 2006), linfoma de Hodgkin (HASENCLEVER & DIEHL, 1998) e leucemia mielóide aguda (BEHL et al., 2006) mostraram menores sobrevidas global e livre de eventos que pacientes com contagens de linfócitos maiores que estes níveis.

Recentes estudos têm mostrado que a contagem linfocitária ao diagnóstico é um fator prognóstico independente que pode prever a sobrevida em pacientes com linfoma difuso de grandes células B. Em 2007, um dos primeiros

relatos, feito por Kim et al., mostra que uma contagem de linfócitos ao diagnóstico menor que $1.000 \text{ células/mm}^3$ tem impacto negativo significativo nas sobrevidas global e livre de eventos em pacientes com LDGCB tratados com esquemas CHOP e R-CHOP.

Em 2008, Cox et al. (a,b) mostraram que uma contagem linfocitária ao diagnóstico menor que 840 células/mm^3 em pacientes com LDGCB estava fortemente associada a piores sobrevida global e livre de eventos, independente até do IPI apresentado pelos pacientes. Cerca de 23% dos pacientes estudados apresentavam linfocitopenia. Nestes mesmos trabalhos, a contagem de linfócitos isoladamente, após a imunoquimioterapia com R-CHOP, não mostrou valor prognóstico.

Dados muito semelhantes também foram encontrados por Talaulikar et al., em 2008, ao estudarem 158 pacientes com LDGCB. A taxa de pacientes com contagem linfocitária ao diagnóstico menor que $1.000 \text{ células/mm}^3$ foi de 35,8% e esta contagem também foi associada a uma pior sobrevida global independente do IPI. Da mesma maneira, Oki et al., em 2008, mostraram que uma contagem inicial de linfócitos menor que $1.000/\text{mm}^3$ em pacientes com LDGCB estava associada com estadiamento avançado, pior desempenho clínico, valores elevados de LDH e beta-2 microglobulina e IPI de alto risco, além de estar associada também a uma sobrevida global e livre de eventos significativamente menor, independente dos outros parâmetros mencionados.

Mais recentemente, Porrata et al. (2008) sugerem que a contagem de linfócitos menor que $1.000/\text{mm}^3$ também pode estar associada a um pior prognóstico em pacientes com LDGCB no momento que apresentam uma primeira recaída da doença.

As principais hipóteses para explicar a baixa contagem de linfócitos ao diagnóstico em pacientes com LDGCB como um fator prognóstico desfavorável são: **a)** as células do câncer podem causar imunossupressão durante a progressão do tumor por diversos mecanismos, incluindo a supressão das células dendríticas e das células T por fatores de crescimento derivados do

tumor (KIM et al., 2006); **b)** a correlação entre linfocitopenia e quimioterapia levando a neutropenia febril poderia ser um outro mecanismo que proporciona piores resultados em doenças neoplásicas (CHOI et al., 2003; RAY-COQUARD et al., 2003); **c)** pode haver ainda uma combinação destes fatores.

2.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE INFECÇÃO PELO EBV E LDGCB DE CABEÇA E PESCOÇO

O EBV, ou herpesvírus humano tipo 4 (HHV4), pertence ao gênero Linfocriptovírus da sub-família dos gama-herpesvírus. Características comuns a estes vírus são seu linfotropismo, sua habilidade em estabelecer infecção latente nas células dos seus hospedeiros e sua capacidade de induzir proliferação nas células com infecção latente (MIDDELDORP et al., 2003).

O vírus penetra no organismo humano pela orofaringe e estruturas adjacentes e, preferencialmente, infecta células B via receptor C3d do complemento (CD21) (OHGA et al., 2002). Um subgrupo de células T tímicas imaturas e de células T/NK ativadas podem expressar CD21 e também podem ser eficazmente infectadas pelo EBV (SU & CHEN, 1997). A transmissão pela saliva de células infectadas pelo EBV é vista como a principal rota de infecção (MIDDELDORP et al., 2003).

O EBV é um vírus encapsulado que contém DNA linear de dupla fita no nucleocapsídeo com 170-175 Kb, que codifica cerca de 100 proteínas virais (OUDEJANS et al., 1997). A infecção de células epiteliais pelo EBV *in vitro* resulta em replicação ativa com produção de vírus e lise celular. Em contraste, a infecção *in vivo* de células B resulta em infecção latente e imortalização destas células, com o EBV presente de forma epissomal nas células B, ou pode ocorrer infecção na forma lítica ou replicativa, que se caracteriza pela liberação de vírions na circulação (COHEN, 2000). Linfócitos B normais em repouso infectados pelo EBV apresentam crescimento espontâneo contínuo em cultura e dão origem a uma linhagem de células B imortalizadas que são conhecidas como linhagem de células linfoblastóides (LCL) (RICKINSON & KIEFF, 1996).

Apenas cerca de 10 dos quase 100 genes identificados no genoma do EBV são ativamente transcritos nas células B imortalizadas - são os chamados genes de latência viral (RICKINSON & KIEFF, 1996). As proteínas virais de latência codificadas por estes genes consistem de seis antígenos nucleares (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C e LP), três proteínas latentes de membrana (LMP-1, -2A e -2B) e dois pequenos RNAs nucleares não poliadenilados e não codificantes do EBV chamados de EBER-1 e EBER-2, que apesar de não terem uma função clara, são uma característica constante em todos os tipos de infecção latente pelo EBV (DELECLUSE & HAMMERSCHMIDT, 2000). As funções dos antígenos nucleares e das proteínas latentes de membrana são sumarizadas na tabela 9 e os padrões de latência viral e os antígenos expressos nas diferentes neoplasias associadas ao EBV são apresentados na tabela 10.

Tabela 9: Funções dos antígenos nucleares e proteínas latentes do EBV

Gene	Funções
EBNA-1	Fator de transcrição; essencial para manutenção do genoma viral
EBNA-2	Fator de transcrição; induz expressão de LMP-1; essencial para a transformação das células B
EBNA-3A/B/C	Fatores de transcrição; responsáveis pela resposta imune em indivíduos saudáveis soropositivos para o EBV (expressão regulatória)
EBNA-LP	Possível interferência com as funções normais das proteínas p53 e pRb pela formação de complexos com essas moléculas; regulação positiva dos fatores necessários para o crescimento das células B
LMP-1	Essencial para potencial transformação; interage com fatores associados ao receptor do fator de necrose tumoral; hiper-expressão do bcl-2 e IL-10
LMP-2A/B	Possível controle da ativação do ciclo lítico do vírus

Fontes: adaptado de Oudejans et al., 1997 e Middeldorp et al., 2003.

A infecção primária das células B resulta em expansão rápida dos linfócitos infectados que é análoga à proliferação observada em LCL imortalizadas pelo EBV. Evidências moleculares mostram um papel patogênico do EBV em determinadas neoplasias, a saber: **a)** o EBV induz efetivamente imortalização de linfócitos B; **b)** o genoma monoclonal do EBV pode ser encontrado em

células tumorais; **c)** algumas células infectadas pelo EBV mostram expressão de LMP-1 que é considerado um oncogene (HSU & GLASER, 2000).

Tabela 10: Padrões de latência do EBV

Tipos de latência	Antígenos expressos	Neoplasias associadas
Tipo I	EBER-1/EBER-2 EBNA-1	Linfoma de Burkitt Carcinoma gástrico
Tipo II	EBER-1/EBER-2 EBNA-1 LMP-1/LMP-2A/-2B	Carcinoma de nasofaringe Linfoma de Hodgkin Linfoma de células T/NK nasal
Tipo III	EBER-1/EBER-2 EBNA-1/-2/-3/-LP LMP-1/LMP-2A/-2B	LNHs relacionados à AIDS Doença linfoproliferativa pós- -transplante
Outro	EBER-1/EBER-2 EBNA-1/-2	Leiomiossarcoma

Fonte: adaptado de Hsu & Glaser, 2000.

O EBV está fortemente associado com malignidades na região da cabeça e pescoço, incluindo linfoma de Burkitt, carcinoma de nasofaringe e linfoma de células T/NK nasal (EPSTEIN et al., 1964; JONES et al., 1988; PATHMANATHAN et al., 1995). Recente trabalho com 380 pacientes mostra uma associação entre LDGCB e infecção pelo EBV (PARK et al., 2007). Neste trabalho, 9% dos pacientes apresentaram hibridização *in situ* positiva para o EBV nos tecidos estudados e esta infecção estava relacionada à pior prognóstico.

A associação entre LDGCB do anel de Waldeyer e, mais especificamente, das tonsilas palatinas, com infecção pelo EBV já foi demonstrada em alguns estudos (LEE et al., 1994; BAHNASSY et al., 2006). Embora a orofaringe seja a porta de entrada do EBV no organismo, as taxas de infecção pelo vírus nesta localização são variáveis ao redor do mundo.

Em 1999, Araújo et al. demonstraram que um número significativamente maior de células das tonsilas de crianças brasileiras estavam infectadas pelo EBV em relação às células das tonsilas de crianças alemãs. Também, Hudnall et al. (2005), nos Estados Unidos (Texas), mostraram que o EBV infectava

principalmente células B de tonsilas humanas reativas e era encontrado principalmente nas regiões interfoliculares, nas criptas tonsilares e nos folículos linfóides.

Lee et al (1994) demonstraram a presença de infecção pelo EBV em quatro de 18 casos de linfoma não Hodgkin do anel de Waldeyer estudados, sendo que dois casos eram nas tonsilas palatinas. Os subtipos histológicos incluíam LDGCB, linfoma folicular e linfoma linfoplasmocítico.

No Egito, Bahnassy et al. (2006) demonstraram a presença de infecção pelo EBV em 90% de 50 casos de LNH de cabeça e pescoço estudados nesta série. Destes 50 pacientes, 13 apresentavam linfoma das tonsilas palatinas. Adicionalmente, os pacientes infectados pelo EBV apresentaram significativamente percentuais mais altos de Ki67 e p53.

Por outro lado, Wong et al. em 2009, estudaram 32 casos de LDGCB do trato aerodigestivo superior na Malásia, incluindo 17 casos de LDGCB das tonsilas. A infecção pelo EBV não foi demonstrada em nenhum destes 17 casos.

Não dispomos de dados sobre as taxas de infecção pelo EBV nos LDGCB em nosso meio e mais especificamente nos LDGCB das tonsilas palatinas.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Estudar as características clínicas, laboratoriais e o perfil de expressão imuno-histoquímica para determinados marcadores (CD10, Bcl-2, Bcl-6, MUM1, p53, CD5 e densidade dos microvasos marcados pelo CD34) nos LDGCB das tonsilas palatinas e sua associação com o EBV, comparativamente com linfomas nodais.

3.2 ESPECÍFICOS

Determinar se o perfil de expressão imuno-histoquímica dos marcadores teciduais CD10, Bcl-2, Bcl-6, MUM1, p53, CD5 e densidade dos microvasos marcados pelo CD34 em LDGCB das tonsilas palatinas difere dos linfomas nodais;

Observar a associação da infecção pelo EBV com LDGCB das tonsilas palatinas, comparando com LDGCB nodais;

Correlacionar os biomarcadores estudados com sobrevida global e sobrevida livre de eventos em ambos os grupos de pacientes.

4 JUSTIFICATIVA

O LDGCB é o subtipo histológico mais comum de LNH, respondendo por cerca de 30-40% de todos os diagnósticos ao redor do mundo (MOLLER et al., 2004). Estudo recente mostra que as tonsilas palatinas são o principal sítio extranodal de apresentação dos LNH em um estudo realizado em nosso meio e o LDGCB foi o principal subtipo histológico apresentado (SILVA NETO et al., 2008).

Apesar de agrupado sobre a mesma terminologia, o LDGCB apresenta grande heterogeneidade de apresentações clínicas, histopatológicas, citogenéticas e moleculares, levando a diferentes respostas à terapia (SWERDLOW et al., 2008). Cada vez mais se busca identificar fatores prognósticos que possam homogeneizar as condutas terapêuticas e melhorar os resultados após o tratamento.

Recentemente, vários marcadores teciduais e sua relação prognóstica em linfomas têm sido investigados, porém com resultados ainda controversos. Especificamente em relação ao LDGCB o perfil molecular e/ou imuno-histoquímico compatível com células do CG correlaciona-se com melhor prognóstico (HANS et al., 2004). Por outro lado, em LDGCB, a infecção pelo EBV tem sido associada a um pior prognóstico (PARK et al., 2007) e é de interesse especial para LDGCB tonsilares pela frequência elevada desta infecção em tonsilas de crianças em nosso meio (ARAÚJO et al., 1999) e pelo papel oncogênico do EBV, que penetra no organismo humano pela orofaringe.

Considerando que apresentamos em nossa cidade situação peculiar em relação a alguns aspectos dos LDGCB (maior acometimento das tonsilas palatinas) e grandes taxas de infecção pelo EBV, resolvemos fazer este estudo para caracterizar melhor este grupo de pacientes com LDGCB das tonsilas palatinas. Para tanto foram analisados dados clínicos e laboratoriais, realizadas IHQ e pesquisa da infecção pelo EBV nestes linfomas, tentando contribuir para um melhor entendimento desta patologia.

5 PACIENTES E MÉTODOS

5.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES

Através dos livros de laudos de biópsias do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Aristides Maltez – Liga Bahiana Contra o Câncer, em Salvador – Bahia, foram identificados consecutivamente os pacientes com diagnóstico de Linfoma não-Hodgkin referentes ao período de janeiro de 1999 a dezembro de 2006. Nesta busca inicial foram identificados, nos laudos, o sítio de origem do material estudado e o diagnóstico final.

Foram selecionados para análise de prontuário os pacientes com linfoma não-Hodgkin das tonsilas palatinas e aqueles que não tinham referência ao sítio da biópsia, a fim de obter tal informação. Após, foram incluídos no estudo os pacientes com linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) das tonsilas palatinas (que o material da biópsia era deste sítio, com massa tumoral predominante nesta localização - considerado um sítio extranodal no presente estudo). Foi também estudado para comparação um grupo de pacientes com LDGCB exclusivamente nodal (doença localizada unicamente nos linfonodos após rotina habitual de estadiamento, a saber: anamnese, exame físico, tomografias de pescoço, tórax e abdômen total, estudo do líquido quando indicado, biópsia de medula óssea, hemograma e dosagem de marcadores bioquímicos como desidrogenase lática, função renal e perfil hepático). Foram excluídos os casos que não tinham o bloco de parafina disponível para a realização dos estudos complementares.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Aristides Maltez, parecer nº 185/07 (**Anexo A**).

5.2 COLETA DE DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

Nos prontuários dos pacientes foram colhidas informações como: nome completo, idade, registro hospitalar, sexo, local da realização da biópsia naqueles que não tinham este dado no laudo anatomopatológico, resultados de

exames (LDH, tomografias, biópsia de medula óssea, estudo do líquido, dentre outros). Estes dados foram anotados em ficha padrão de inquérito clínico (**Apêndice A**). Foram também colhidos dados sobre o tratamento realizado (cirurgia, quimioterapia e/ou radioterapia) e o estado atual do doente (vivo em remissão completa, vivo com recidiva, óbito e causa do óbito) baseados na última consulta realizada, sendo esta a mais próxima de quando o levantamento final de dados foi realizado. O levantamento final dos dados foi realizado em fevereiro de 2009. Os dados foram armazenados em planilha Excel (*Windows*) para posterior análise estatística.

Foram solicitados e recebidos da Vigilância Epidemiológica do Estado da Bahia, os dados de mortalidade do período de 1999 a 2008 a fim de saber se os pacientes que tinham perdido o seguimento clínico tinham ido a óbito.

O estadiamento foi obtido segundo os critérios de Ann Arbor modificado (ROSENBERG, 1977); o cálculo do Índice Prognóstico Internacional (IPI) foi obtido segundo os parâmetros previamente estabelecidos (SHIPP et al., 1993) e o desempenho clínico foi registrado conforme a tabela do ECOG (OKEN et al., 1982).

5.3 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Foram obtidas lâminas coradas com hematoxilina-eosina (H&E) para revisão histológica e esta revisão foi realizada em conjunto com um patologista (I.A.). Quando a lâmina não foi encontrada ou estava em estado precário de conservação, novos cortes com espessura de 4 µm foram realizados, a partir dos blocos de parafina, e foram corados pelo H&E.

5.4 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO (IHQ)

Pacientes que tinham lâminas de IHQ disponíveis foram revisadas. Quando não disponíveis, novos cortes histológicos de 4 µm dos blocos de parafina dos casos selecionados foram feitos e submetidos à imuno-histoquímica para posterior revisão utilizando os critérios diagnósticos da Organização Mundial da

Saúde de 2008 (SWERDLOW et al., 2008). Foi empregada a técnica da estreptoavidina-biotina-peroxidase (BOENISH, 1989).

Foram utilizados anticorpos monoclonais (marcadores) disponíveis comercialmente conforme tabela 11 abaixo.

Tabela 11: Anticorpos utilizados na imuno-histoquímica

Anticorpo	Clone	Fabricante	Diluição
CD10	56C6	Novocastra	1:50
Bcl-2	124	DakoCytomation	1:50
Bcl-6	P1F6	Novocastra	1:20
CD20	L26	DakoCytomation	1:100
MUM1	MUM1p	DakoCytomation	1:50
CD5	4C7	Novocastra	1:50
p53	PAb1801	Novocastra	1:100
CD34	QBEnd-10	DakoCytomation	1:200
Ki67	MIB-1	DakoCytomation	1:50

As reações foram consideradas positivas quando mais de 10% das células tumorais estavam marcadas para o anticorpo em questão. Exceções foram feitas para os anticorpos Ki67, p53 e CD 34. O marcador Ki67 foi semi-quantificado numa escala de positividade de 0 a 100% conforme a quantidade de células neoplásicas com núcleos marcados. A proteína p53 foi quantificada segundo o escore de Sannino & Shousha (1994).

A densidade dos microvasos foi estabelecida pela contagem de lumens vasculares marcados pelo CD34, contando sempre que possível 10 campos consecutivos (variação de 4 a 10 campos, relacionada ao tamanho do fragmento da biópsia) num aumento de 400 vezes. Cada campo contado representou uma área de 0,20 mm². Nesta contagem foram considerados microvasos qualquer lúmen ou célula fusiforme formando trajeto vascular, além

dos vasos bem formados. Não foram consideradas células isoladas amorfas, sem núcleos e fragmentos de citoplasma. As análises da IHQ foram feitas em microscópio Olympus BX41 de cinco cabeças e as lâminas foram fotografadas em microscópio Olympus BX50 acoplado a um sistema de câmera fotográfica (*Evolution LC Color*), sendo as imagens gravadas em computador.

Os pacientes foram categorizados como perfil de CG ou não-CG segundo o algoritmo de Hans et al. (2004). Aqueles que eram positivos para CD10 isoladamente ou positivos para CD10 e Bcl-6 foram classificados como perfil de CG. Pacientes negativos para CD10 e Bcl-6 foram classificados como perfil nCG. Pacientes negativos para CD10 e positivos para Bcl-6, foram classificados após a análise do MUM1: se MUM1 foi negativo, foram classificados como CG e se MUM1 foi positivo, foram classificados como nCG.

5.5 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

A pesquisa da infecção pelo EBV foi realizada pela técnica de hibridização *in situ*, conforme descrito anteriormente (ARAÚJO et al., 1999), visando a detecção de transcritos EBER-1 e EBER-2 do EBV. A hibridização foi feita em condições livres de RNAses, utilizando sondas específicas marcadas com digoxigenina. Em resumo, secções (4µm) de tecidos incluídos em parafina foram desparafinizadas, reidratadas e foram expostas a 0.2N HCl, 0.6mg/ml pronase, seguidas por pós-fixação com formaldeído a 4% e desidratação com graus decrescentes de etanol. As secções foram hibridizadas com 0.1µg de sondas marcadas e foram incubadas durante toda a noite a uma temperatura de 50°C (Hibridizador da DAKO). Após lavagem, sondas EBER marcadas com digoxigenina foram detectadas usando um anticorpo monoclonal digoxigenina-específico, conjugado à fosfatase alcalina.

Como controles positivos foram utilizados tecidos provenientes de pacientes com linfoma de Burkitt e com mononucleose infecciosa, previamente identificados que eram positivos para EBV. O sinal considerado positivo foi localizado exclusivamente no núcleo.

5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para realização das análises estatísticas foi utilizado o software BioEstat[®] versão 5.0 – Sociedade Civil Mamirauá / MCT – CNPq / Conservation International (AYRES et al., 2007). Na análise de dados não-paramétricos dicotômicos foram utilizados os testes do qui-quadrado e o de probabilidades exato de Fisher. Este último foi utilizado quando a amostra, em uma das caselas, foi inferior a cinco. As diferenças entre as medianas de Ki67, contagem linfocitária e dos microvasos marcados pelo CD34 foram calculadas pelo teste Mann-Whitney. O valor de p foi considerado significativo quando $< 0,05$.

As análises das sobrevidas global e livre de eventos foram feitas utilizando o método de Kaplan-Meier e a análise comparativa destas sobrevidas foi feita utilizando o teste *log-rank*. Para o cálculo da sobrevida global foi considerado para contagem inicial a data do diagnóstico na biópsia e a contagem foi finalizada na data do óbito ou, para os que estavam vivos, a data do fechamento do seguimento clínico que foi em fevereiro de 2009. Para o cálculo da sobrevida livre de eventos foi também considerada a data da biópsia como o início e finalizado quando documentada uma recidiva (através do exame clínico, de exames de imagem ou da realização de uma nova biópsia), quando o paciente foi a óbito ou, naqueles que estavam vivos e sem doença, no fim do seguimento clínico (fevereiro de 2009).

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS GRUPOS

No período de janeiro de 1999 a dezembro de 2006 foram feitos 567 diagnósticos de Linfoma não-Hodgkin (LNH) no Serviço de Anatomia Patológica do HAM. Destes, 253 foram classificados como linfoma difuso de grandes células B (44,6%).

Foram feitos 32 diagnósticos de linfoma não-Hodgkin das tonsilas palatinas (5,6% do total de LNH) no mesmo período referido acima. Destes 32 casos, 26 eram LDGCB centroblasticos (81,4%), dois eram linfoma de células T/NK (6,2%), dois eram linfoma de células do manto (6,2%), um era linfoma folicular (3,1%) e um era linfoma da zona marginal tipo MALT (3,1%). Apenas os pacientes com LDGCB das tonsilas palatinas foram objeto do presente estudo.

Foram excluídos do estudo dois pacientes com LDGCB das tonsilas palatinas, pois seus blocos de parafina não foram encontrados para novos recortes, sendo então estudados 24 pacientes (4,2% do total de LNH). Daqui por diante, este grupo será referido apenas como pacientes com **linfoma tonsilar**.

O grupo de pacientes com linfoma exclusivamente nodal foi composto por 19 pacientes com LDGCB, sem qualquer envolvimento extranodal detectável no estadiamento inicial. A região cervical foi a mais acometida, com 13 pacientes (68,4%) apresentando linfonodomegalia nesta localização, quatro tinham adenomegalia inguinal (21%), um tinha acometimento em axila esquerda (5,3%) e um tinha adenomegalia retroperitoneal (5,3%). Daqui por diante, este grupo será referido apenas como pacientes com **linfoma nodal**.

As principais características clínicas e laboratoriais dos dois grupos de pacientes estão apresentadas na tabela 12. Pacientes com linfoma tonsilar apresentaram valor de LDH significativamente mais baixo que pacientes com linfoma nodal ($p=0,02$).

Tabela 12: Características clínicas e laboratoriais gerais

Parâmetros		LDGCB tonsilar (n= 24)	LDGCB nodal (n= 19)	Valor de p
Sexo	Masculino	11 (45,8%)	12 (63,1%)	0,41
	Feminino	13 (54,2%)	7 (36,9%)	
Idade (anos)*		57	62	0,66
Tabagismo		12 (50%)	11 (57,9%)	0,98
Etilismo		6 (25%)	8 (42,1%)	0,59
Tabagismo e etilismo		4 (16,7%)	7 (36,9%)	0,20
Estadia- -mento	I/II	13 (45,8%)	14 (73,7%)	1,00
	III/IV	6 (25%)	5 (26,3%) [#]	
Sintomas B		12 (50%)	8 (42,1%)	0,96
ECOG	< 2	23 (95,8%)	17 (89,5%)	0,60
	≥ 2	1 (4,2%)	1 (5,3%)	
LDH	Normal	16 (66,7%)	9 (47,4%)	0,02
	Elevado	2 (8,3%)	8 (42,1%)	
IPI	0 e 1	15 (62,5%)	12 (63,2%)	0,70
	2	2 (8,3%)	4 (21,1%)	
	3	1 (4,2%)	1 (5,3%)	
	4 e 5	0	0	

*Mediana dos valores.

[#]Não foram incluídos pacientes com estadiamento IV.

O tempo médio de seguimento dos pacientes foi de 43 meses no grupo de pacientes com linfoma tonsilar, variando de um a 104 meses e no grupo de pacientes com linfoma nodal foi de 42,2 meses, variando de cinco a 111 meses.

Após análise dos prontuários, a sorologia para HIV pôde ser obtida em seis dos 24 pacientes com linfoma tonsilar e em seis dos 19 pacientes com linfoma nodal. Nestes pacientes a sorologia para HIV foi negativa.

Dos 24 pacientes com linfoma tonsilar, 13 foram tratados com o esquema de quimioterapia CHOP, um com esquema clorambucil e prednisona, um com esquema COP, um com radioterapia exclusiva e um com esquema R-CHOP. Quatro pacientes tratados com esquema CHOP também realizaram radioterapia complementar à quimioterapia. Seis pacientes faleceram sem terapia e em um caso não foi possível saber com segurança se o paciente foi

tratado (perda de seguimento). Os 19 pacientes com linfoma nodal foram tratados com esquema CHOP e 10 deles realizaram também radioterapia complementar.

As sobrevidas global e livre de eventos foram em média de 43,5 e 39,5 meses, respectivamente, nos pacientes com linfoma tonsilar e de 34 meses e 24 meses, respectivamente, nos pacientes com linfoma nodal, não sendo significativas estas diferenças ($p= 0,79$ entre as sobrevidas globais e $p= 0,80$ entre as sobrevidas livre de eventos dos dois grupos).

O gráfico 1 representa a sobrevida global e livre de eventos de todos os pacientes (análise de Kaplan-Meier). As curvas de sobrevida global e livre de eventos segundo o grupo (tonsilar ou nodal) são apresentadas no gráfico 2.

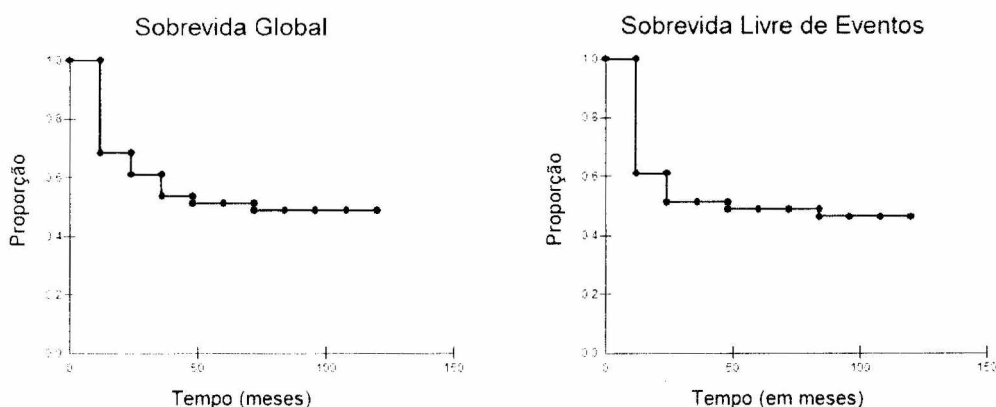


Gráfico 1: Sobrevida global e sobrevida livre de eventos de todos os pacientes.

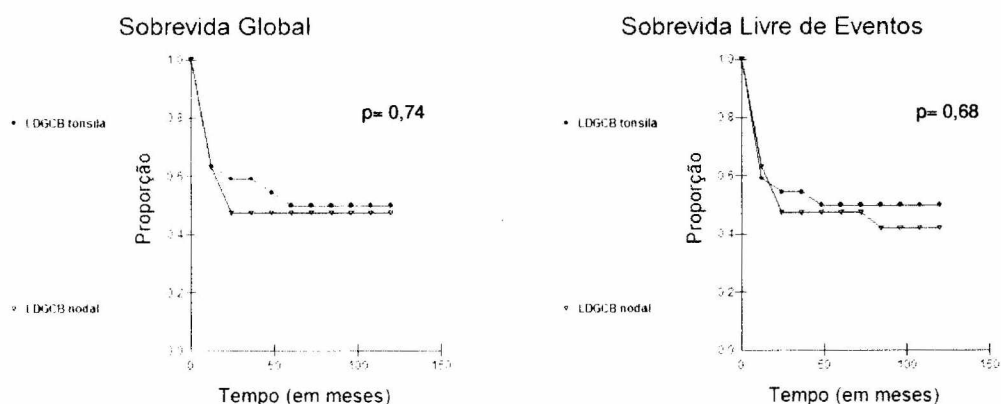


Gráfico 2: Sobrevida global e sobrevida livre de eventos segundo os grupos (*log-rank test*).

As figuras 5 e 6 mostram alguns aspectos histopatológicos (coloração pelo HE) e imuno-histoquímicos (marcação para CD20 e Ki67) dos LDGCB em pacientes com linfoma tonsilar e linfoma nodal, respectivamente. Pacientes com linfoma nodal apresentaram mediana de Ki67 significativamente mais elevada que pacientes com linfoma tonsilar (80% versus 60%, $p=0,03$).

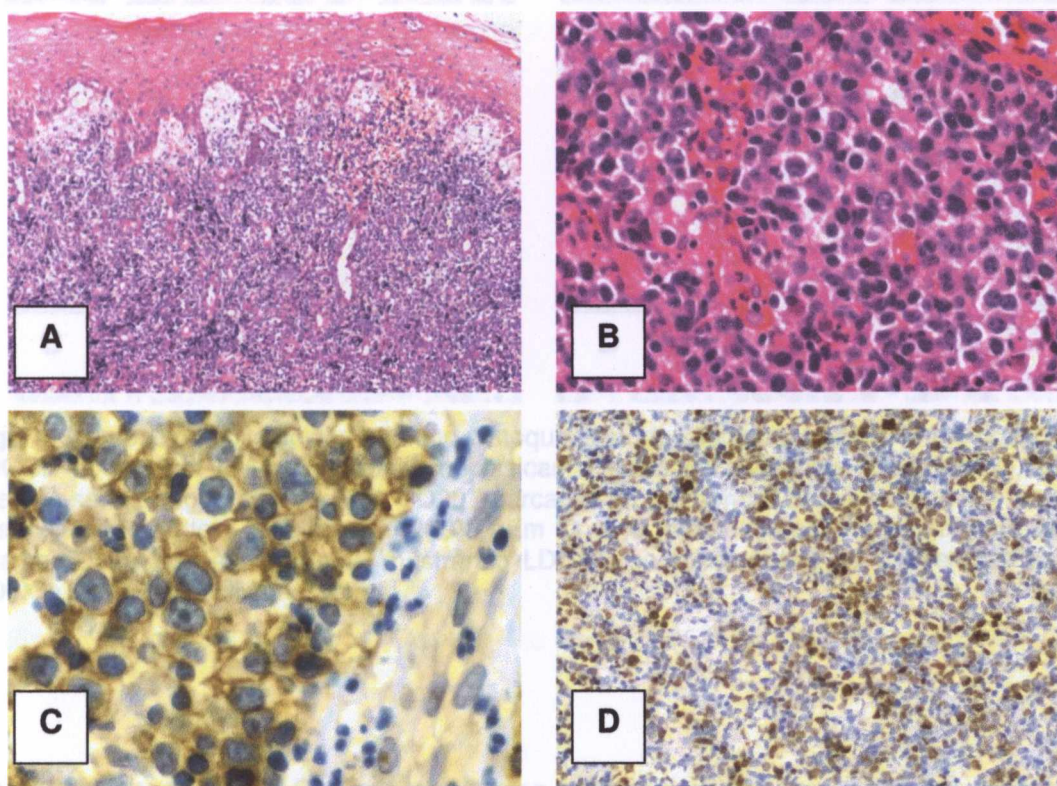


Figura 5: Aspectos histológicos e imuno-histoquímicos dos linfomas tonsilares. Em **A** observa-se secção de tonsila (epitélio na parte superior da figura) com destruição da arquitetura normal pela proliferação difusa do linfoma (H&E, 40X). Em **B**, vêem-se células linfóides grandes neoplásicas, com nucléolos evidentes (H&E, 200X). Em **C** observa-se marcação positiva para CD20 (marcação da membrana citoplasmática em marrom) nas células grandes neoplásicas (400X). Em **D** observa-se marcação pelo MIB-1 (marcação nuclear em marrom), mostrando LDGCB com alto índice de proliferação celular (100X).

6.2 ÍNDICE PROGNÓSTICO INTERNACIONAL

Os dados relativos ao IPI nos dois grupos de pacientes (tonsilar e nodal) são mostrados na tabela 12 (página 48). A maioria apresentou IPI de baixo risco (zero ou um fator) ou baixo risco intermediário (dois fatores).

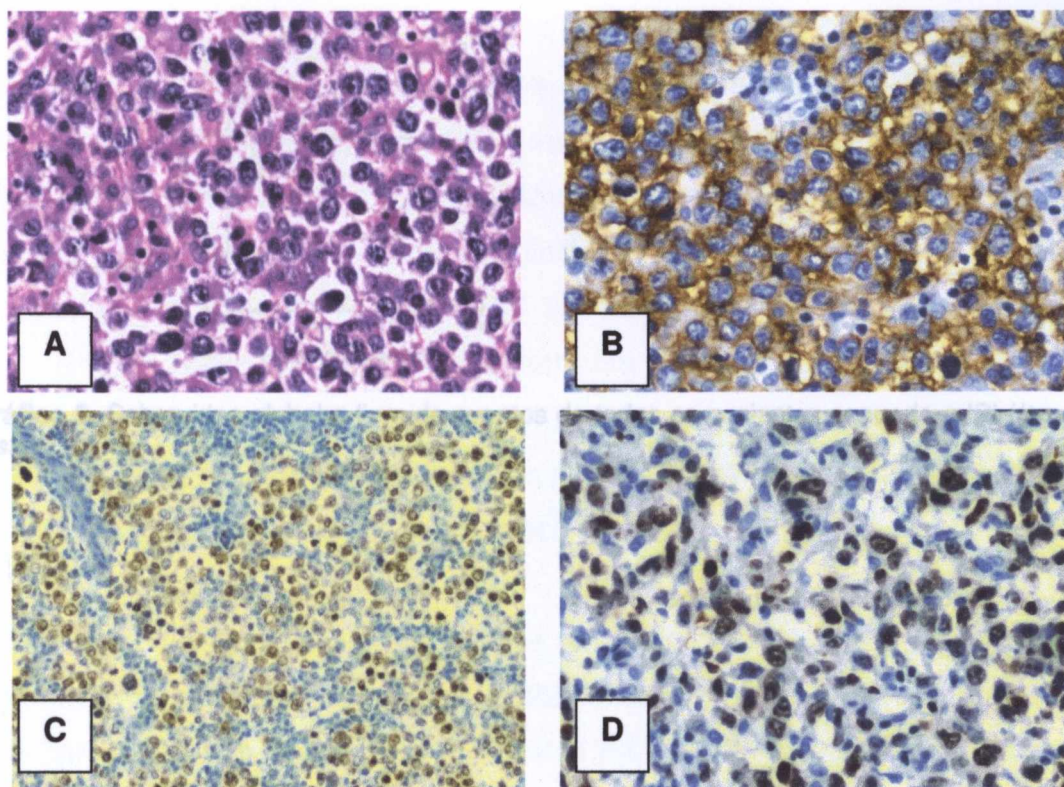


Figura 6: Aspectos histológicos e imuno-histoquímicos dos linfomas nodais. Em **A** observa-se LDGCB nodal com células grandes neoplásicas e nucléolos evidentes (H&E, 200X). Em **B** observa-se marcação positiva para CD20 (marcação da membrana citoplasmática em marrom) nas células grandes neoplásicas (200X). Em **C** e **D** observam-se marcação pelo MIB-1 (marcação nuclear em marrom), mostrando LDGCB com alto índice de proliferação celular (100X e 200X, respectivamente).

Gráfico 4: Sobrevidas global e livre de eventos dos pacientes com linfoma tonsilar segundo o IPI (log-rank test).

Para análise da SG e SLE os pacientes foram divididos em IPI igual a zero ou um e IPI maior que ou igual a dois. Na análise destas sobrevidas segundo o IPI, os pacientes com linfoma tonsilar não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Os pacientes com linfoma nodal com IPI zero ou um apresentaram SLE significativamente maior que pacientes com IPI \geq dois ($p=0,01$). Considerando-se todos os pacientes juntos, aqueles com IPI zero ou um apresentaram SG e SLE significativamente maiores que pacientes com IPI \geq dois ($p=0,04$ e $0,005$, respectivamente). As curvas de SG e SLE são mostradas a seguir nos gráficos 3, 4 e 5.

Gráfico 5: Sobrevidas global e livre de eventos dos pacientes com linfoma nodal segundo o IPI (log-rank test).

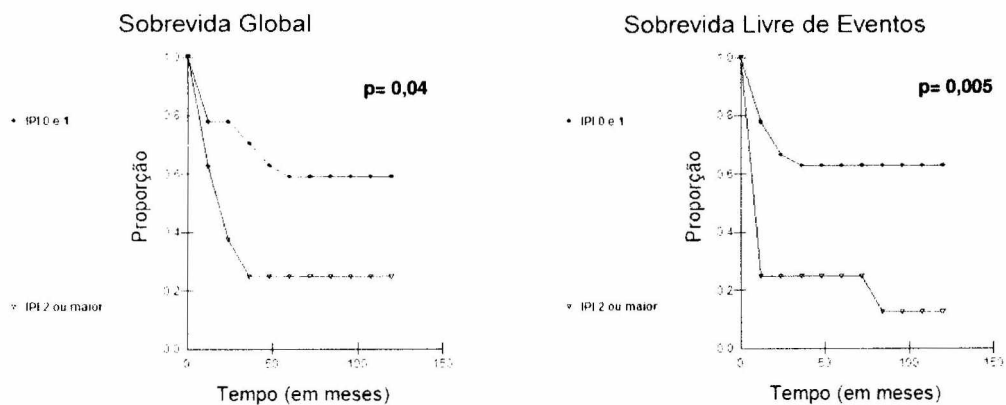


Gráfico 3: Sobrevidas global e livre de eventos de todos os pacientes segundo o IPI (*log-rank test*).

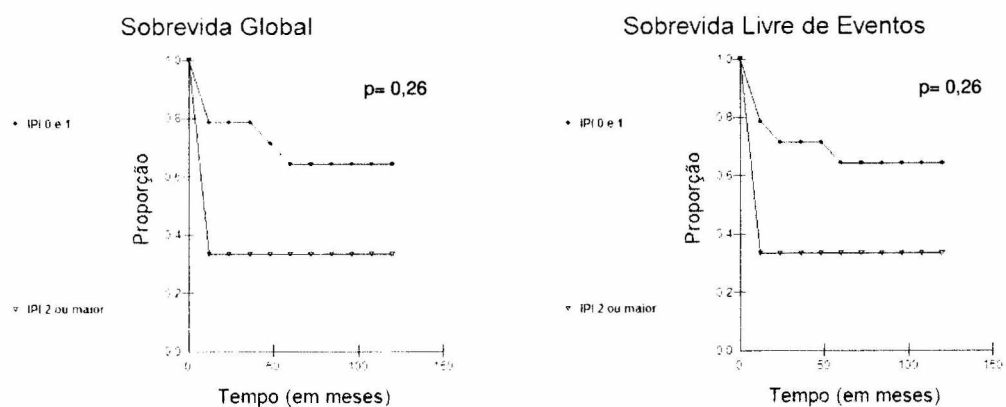


Gráfico 4: Sobrevidas global e livre de eventos dos pacientes com linfoma tonsilar segundo o IPI (*log-rank test*).

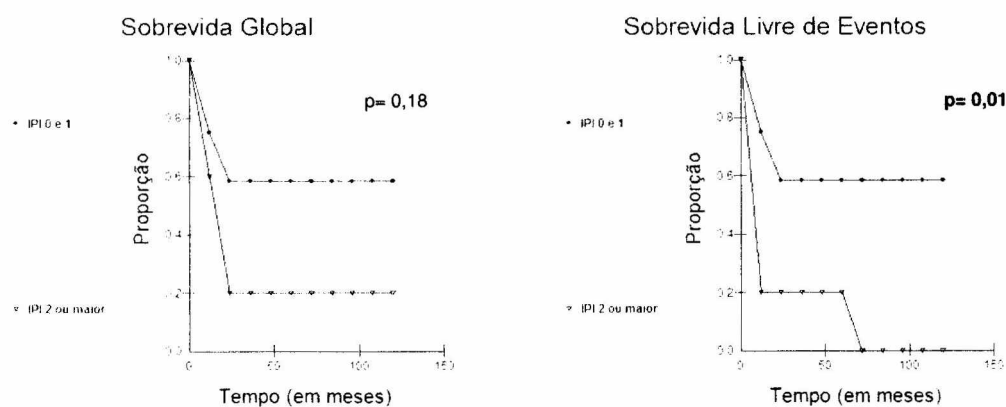


Gráfico 5: Sobrevidas global e livre de eventos dos pacientes com linfoma nodal segundo o IPI (*log-rank test*).

6.3 CONTAGEM LINFOCITÁRIA AO DIAGNÓSTICO

De um total de 43 pacientes, obteve-se em 41 o número de linfócitos ao diagnóstico: 32 (78%) apresentavam valor ≥ 1.000 células/mm³ e nove (22%) apresentavam valor < 1.000 células/mm³. No grupo de linfomas tonsilares (n=22), 18 pacientes apresentaram linfócitos ≥ 1.000 /mm³ (81,8%) e quatro apresentaram linfócitos < 1.000 /mm³ ao diagnóstico (18,2%). Nos pacientes com linfoma nodal (n= 19), 14 apresentaram linfócitos ≥ 1.000 /mm³ (73,7%) e cinco apresentaram linfócitos < 1.000 /mm³ ao diagnóstico (26,3%), não havendo diferença significativa entre os grupos e sua contagem linfocitária (se ≥ 1.000 ou se < 1.000 /mm³) ao diagnóstico (p= 0,70).

A mediana da contagem linfocitária de todos os pacientes (n= 41) foi de 1824 células/mm³, variando de 200 a 3922 linfócitos/mm³. No grupo de linfoma tonsilar a mediana da contagem foi de 1980 linfócitos/mm³, com variação de 354 a 3922 células/mm³. Nos pacientes com linfoma nodal a mediana da contagem linfocitária foi de 1638 células/mm³, variando de 200 a 3622 linfócitos/mm³. Esta diferença, nas medianas da contagem linfocitária entre os grupos, não foi estatisticamente significativa (p= 0,41).

As características dos pacientes com linfoma tonsilar e nodal segundo a contagem linfocitária ao diagnóstico são sumarizadas na tabela 13.

A análise dos parâmetros mencionados na tabela 13, quando comparados entre pacientes no mesmo grupo de contagem linfocitária (< 1.000 ou ≥ 1.000 células/mm³) versus linfoma tonsilar e nodal, não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significativa.

No grupo do linfoma tonsilar, pacientes com linfócitos ≥ 1.000 /mm³ apresentaram SG e SLE significativamente maior que os demais (p= $< 0,0001$ e 0,003, respectivamente). Considerando-se todo o grupo, os pacientes com linfócitos ≥ 1.000 /mm³ apresentaram SG significativamente maior (p= 0,02). Os pacientes com linfoma nodal não mostraram diferença nas sobrevidas segundo a contagem linfocitária ao diagnóstico. As análises da SG e SLE em relação à

contagem linfocitária ao diagnóstico (se ≥ 1.000 ou se $< 1.000/\text{mm}^3$) nos grupos de pacientes são apresentadas nos gráficos 6, 7 e 8 a seguir.

Tabela 13: Características dos pacientes com linfoma tonsilar e nodal segundo a contagem linfocitária

Parâmetros		LDGCB tonsilar		Valor de p	LDGCB nodal		Valor de p
		Nº de linfócitos/ mm^3			Nº de linfócitos/ mm^3		
		< 1.000	≥ 1.000		< 1.000	≥ 1.000	
Sexo	Masculino	3	8	0,58	3	9	0,99
	Feminino	1	10		2	5	
Idade (anos)*		52	58	0,96	62	62,5	0,64
Perfil	CG	1	8	0,61	1	5	0,63
	nCG	3	10		4	9	
LDH	Normal	3	13	0,99	3	6	1,00
	Elevado	1	2		2	6	
IPI	0 e 1	3	12	NA	4	8	NA
	2		2		1	3	
	3		1			1	
	4 e 5						

*Mediana dos valores; N^o: número; NA: não avaliável.

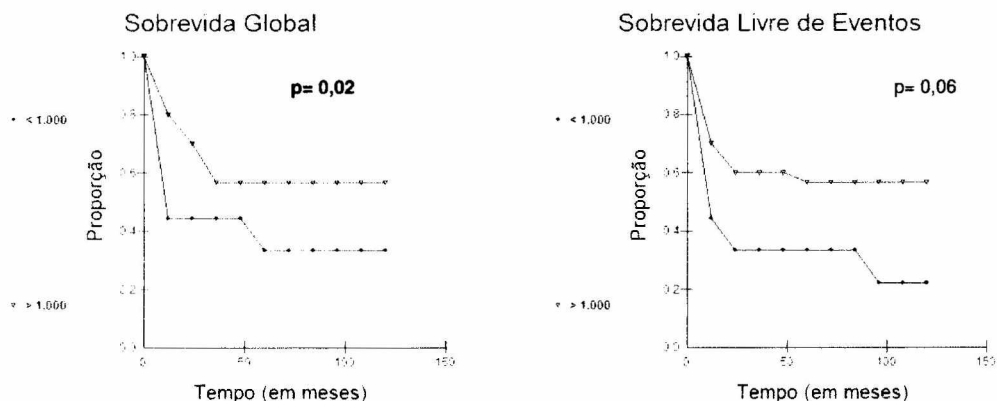


Gráfico 6: Sobrevidas global e livre de eventos de todos os pacientes segundo a contagem linfocitária ao diagnóstico (log-rank test).

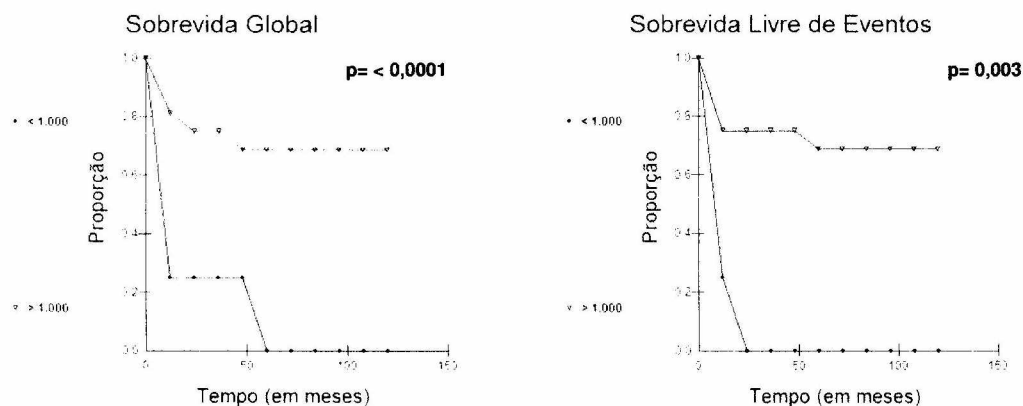


Gráfico 7: Sobrevidas global e livre de eventos dos pacientes com linfoma tonsilar segundo a contagem linfocitária ao diagnóstico (*log-rank test*).

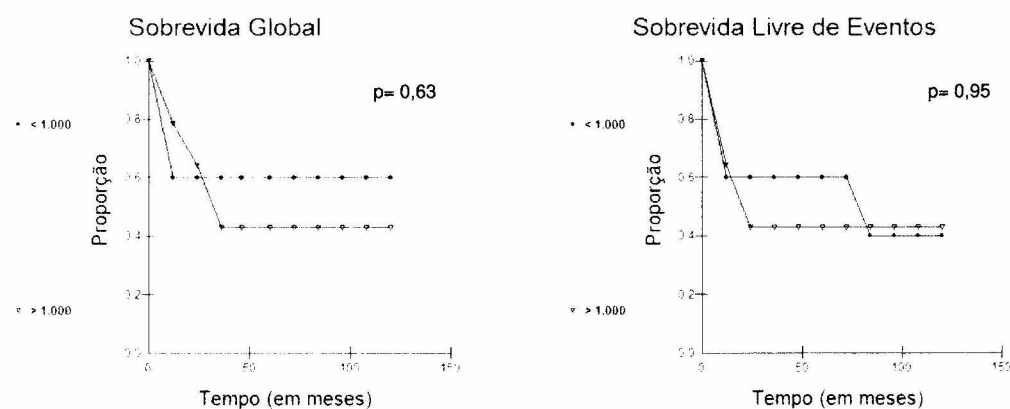


Gráfico 8: Sobrevidas global e livre de eventos dos pacientes com linfoma nodal segundo a contagem linfocitária ao diagnóstico (*log-rank test*).

6.4 PERFIL DE CENTRO GERMINATIVO E NÃO-CENTRO GERMINATIVO

Segundo o algoritmo de Hans et al. (2004), os pacientes foram classificados como perfil de centro germinativo (CG) e não-centro germinativo (nCG). No grupo dos linfomas tonsilares ($n=24$), 10 pacientes foram classificados como CG (41,6%) e 14 foram classificados como nCG (58,4%). No grupo de linfomas nodais ($n= 19$), seis pacientes apresentaram perfil de centro germinativo (31,6%) e 13 pacientes apresentaram perfil nCG (68,4%). A diferença entre os grupos em relação ao perfil de CG e nCG não foi estatisticamente significativa ($p= 0,71$). Considerando os dois grupos juntos, 16/43 pacientes apresentaram perfil de CG (37,2%) e 27/43 pacientes apresentaram perfil nCG (62,8%).

Os dados em relação à positividade dos anticorpos utilizados na classificação de CG e nCG nos dois grupos de pacientes são sumarizados na tabela 14. Pacientes com linfoma tonsilar apresentaram significativamente maior expressão de Bcl-6 ($p= 0,007$) que pacientes com linfoma nodal.

Tabela 14: Positividade dos anticorpos do perfil de CG e nCG

Anticorpos		Todos os pacientes	LDGCB tonsilar	LDGCB nodal	Valor de p*
CD10	Positivo	10 (23,2%)	5 (20,8%)	5 (26,3%)	0,72
	Negativo	33 (76,8%)	19 (79,2%)	14 (73,7%)	
Bcl-6	Positivo	30 (69,8%)	21 (87,5%)	9 (47,3%)	0,007
	Negativo	13 (30,2%)	3 (12,5%)	10 (52,6%)	
MUM1	Positivo	26 (60,5%)	15 (62,5%)	11 (57,9%)	0,99
	Negativo	17 (39,5%)	9 (37,5%)	8 (42,1%)	

* Comparação entre linfoma tonsilar e linfoma nodal

Analisando-se cada anticorpo utilizado para definir o perfil (CG ou nCG), isoladamente, não houve diferença significativa na SG e SLE em nenhum dos grupos (tonsilar, nodal e todos os pacientes). Os anticorpos utilizados foram CD10, Bcl-6 e MUM1. Estes dados são apresentados na tabela 15. A positividade isolada para Bcl-6 e MUM1 foi associada com SG e SLE menores que pacientes negativos nos dois grupos de pacientes. Para os pacientes CD10 positivos, a SG e a SLE foi maior considerando-se todos os pacientes juntos e nos pacientes com linfoma tonsilar. Nos pacientes com linfoma nodal a positividade para CD10 mostrou SG e SLE menores que pacientes negativos.

Tabela 15: Análise de SG e SLE segundo a expressão IHQ de CD10, Bcl-6 e MUM1 (valores de p)

Anticorpos	Todos os pacientes		LDGCB tonsilar		LDGCB nodal	
	SG	SLE	SG	SLE	SG	SLE
CD10	0,12	0,30	0,12	0,15	0,64	0,88
Bcl-6	0,26	0,47	0,58	0,56	0,20	0,33
MUM1	0,27	0,30	0,20	0,18	0,88	0,95

Nota: análises realizadas pelo *log-rank test*.

Distribuindo-se os pacientes por grupos (todos os pacientes, linfoma tonsilar e linfoma nodal) e segundo o perfil de CG e nCG, também não se observou diferença nas sobrevidas global e livre de eventos. Considerando-se todos os pacientes juntos e os de linfoma tonsilar, os pacientes com perfil de CG apresentaram SG e SLE superiores. Ao contrário, no grupo de linfoma nodal os pacientes com perfil nCG apresentaram SG e SLE superior. Em todos os grupos estas diferenças não foram significantes. Os gráficos relativos a estes dados são mostrados a seguir (gráficos 9, 10 e 11).

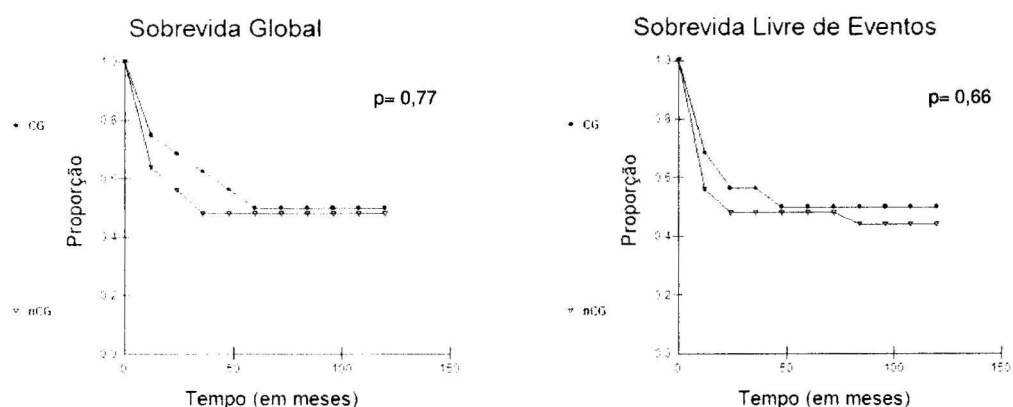


Gráfico 9: SG e SLE segundo o perfil (CG ou nCG) de todos os pacientes (*log-rank test*).

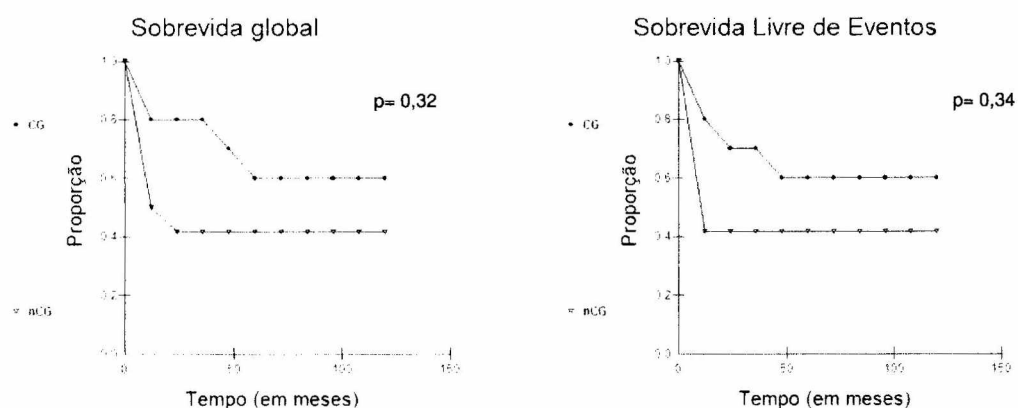


Gráfico 10: SG e SLE segundo o perfil (CG ou nCG) dos pacientes com linfoma tonsilar (*log-rank test*).

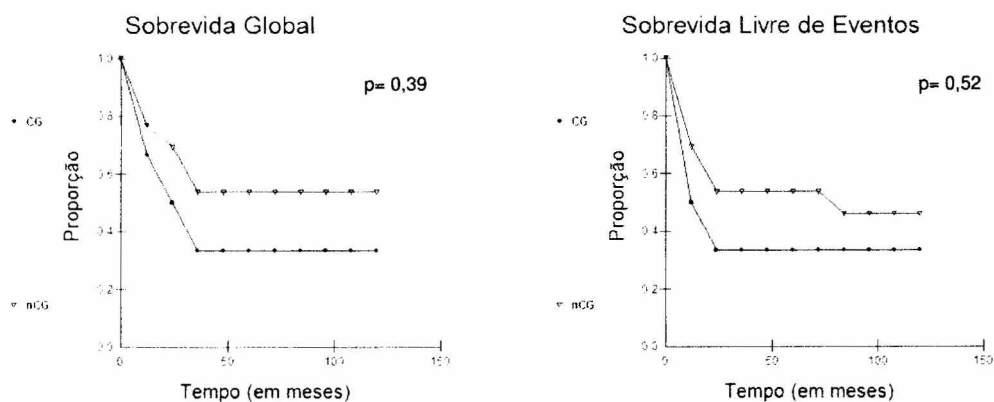


Gráfico 11: SG e SLE segundo o perfil (CG ou nCG) dos pacientes com linfoma nodal (*log-rank test*).

A tabela 16 sumariza os dados dos pacientes segundo o perfil de CG e nCG nos grupos com linfoma tonsilar e nodal.

Tabela 16: Características dos pacientes com linfoma tonsilar e nodal segundo o perfil de CG ou nCG

Parâmetros		LDGCB tonsilar		Valor de p	LDGCB nodal		Valor de p
		Perfil			Perfil		
		CG	nCG		CG	nCG	
Sexo	Masculino	4	7	0,69	3	9	0,61
	Feminino	6	7		3	4	
Idade (anos)*		62,5	52,5	0,88	68	59	0,21
LDH	Normal	7	9	0,49	3	6	1,00
	Elevado	0	2		2	6	
IPI	0 e 1	7	8	NA	3	9	NA
	2		2		2	2	
	3		1			1	
	4 e 5						

*Mediana dos valores; NA: não avaliável.

A análise dos parâmetros mencionados na tabela 16, quando comparados entre pacientes no mesmo grupo (CG ou nCG) versus linfoma tonsilar e nodal, não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significativa.

As figuras 7 e 8 mostram a expressão imuno-histoquímica de CD10, Bcl-6 e MUM1 nos dois grupos de pacientes.

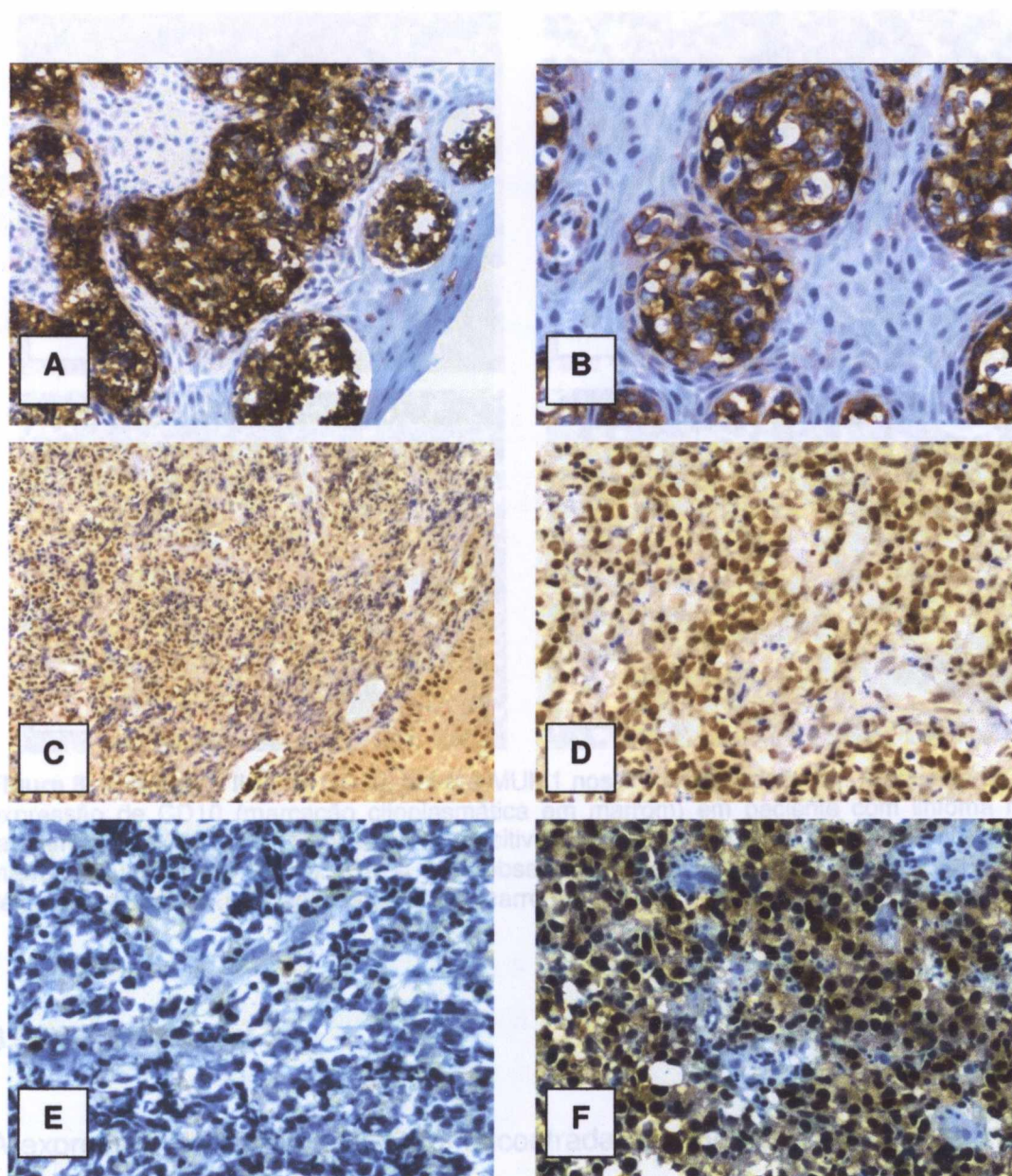


Figura 7: Expressão IHQ de CD10, Bcl-6 e MUM1 nos linfomas tonsilares. Em **A** e **B** observa-se forte expressão de CD10 (marcação citoplasmática em marrom) em paciente com linfoma infiltrando inclusive o epitélio tonsilar (aumento de 200 e 400X, respectivamente). Em **C** e **D** observa-se positividade para Bcl-6, com marcação nuclear em marrom (100 e 200X, respectivamente). Em **E** observam-se raras células reacionais marcadas para MUM1, caso considerado negativo (200X). Em **F**, paciente com forte positividade para MUM1 nas células neoplásicas (marcação nuclear em marrom; 200X).

As características dos pacientes segundo o grupo (tonsilar ou nodal) e a expressão do Bcl-2 são sumarizadas a seguir na tabela 17. Pacientes com linfoma tonsilar Bcl-2 negativos foram significativamente mais jovens ($p=0,02$).

A análise dos parâmetros mencionados na tabela 17, quando comparados entre pacientes no mesmo grupo de expressão da proteína Bcl-2 (positivo ou

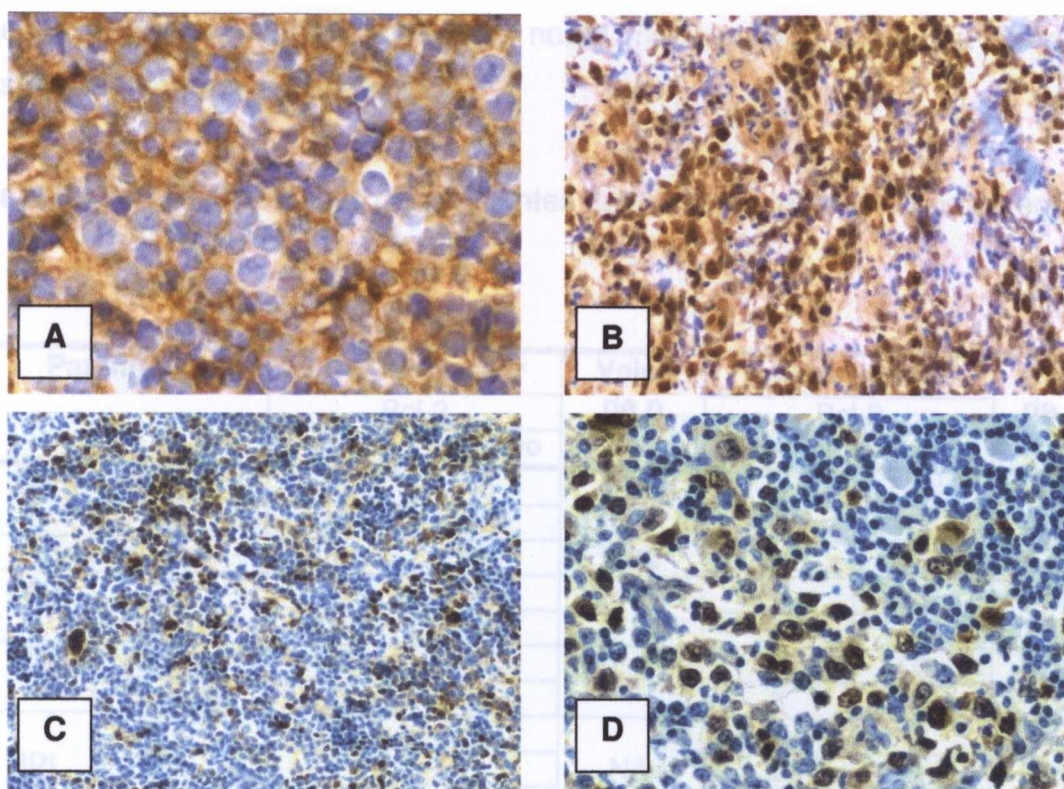


Figura 8: Expressão IHQ de CD10, Bcl-6 e MUM1 nos linfomas nodais. Em **A** observa-se forte expressão de CD10 (marcação citoplasmática em marrom) em paciente com linfoma nodal (aumento de 400X). Em **B** observa-se positividade para Bcl-6, com marcação nuclear em marrom (aumento de 200X). Em **C** e **D** observa-se positividade para MUM1 nas grandes células neoplásicas (marcação nuclear em marrom; aumento de 100 e 200X, respectivamente).

6.5 PROTEÍNA Bcl-2

A expressão da proteína Bcl-2 foi encontrada em 13/24 pacientes com linfoma tonsilar (54,2%) e em 11/19 pacientes com linfoma nodal (57,9%), com $p=0,94$. Considerando-se juntos todos os 43 pacientes, a proteína Bcl-2 foi expressa em 24/43 pacientes (55,8%).

As características dos pacientes segundo o grupo (tonsilar ou nodal) e a expressão do Bcl-2 são sumarizadas a seguir na tabela 17. Pacientes com linfoma tonsilar Bcl-2 negativos foram significativamente mais jovens ($p=0,02$).

A análise dos parâmetros mencionados na tabela 17, quando comparados entre pacientes no mesmo grupo de expressão da proteína Bcl-2 (positivo ou

negativo) versus linfoma tonsilar e nodal, não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significativa.

Tabela 17: Características dos pacientes com linfoma tonsilar e nodal segundo a expressão de Bcl-2

Parâmetros		LDGCB tonsilar		Valor de p	LDGCB nodal		Valor de p
		Bcl-2			Bcl-2		
		Positivo	Negativo		Positivo	Negativo	
Sexo	Masculino	5	6	0,70	6	6	0,63
	Feminino	8	5		5	2	
Idade (anos)*		65	44	0,02	66	47,5	0,05
Perfil	CG	3	7	0,09	3	3	1,00
	nCG	10	4		8	5	
LDH	Normal	9	7	0,47	7	2	0,15
	Elevado	0	2		3	5	
IPI	0 e 1	6	9	NA	6	6	NA
	2	2			3	1	
	3	1			1		
	4 e 5						

*Mediana dos valores; NA: não avaliável.

As curvas de SG e SLE de todos os pacientes, dos pacientes com linfoma tonsilar e dos pacientes com linfoma nodal segundo a expressão IHQ da proteína Bcl-2 são mostradas a seguir (gráficos 12, 13 e 14). Pacientes com linfoma tonsilar e com expressão de Bcl-2 mostraram menores SG e SLE, sendo a SLE significativamente menor ($p=0,02$).

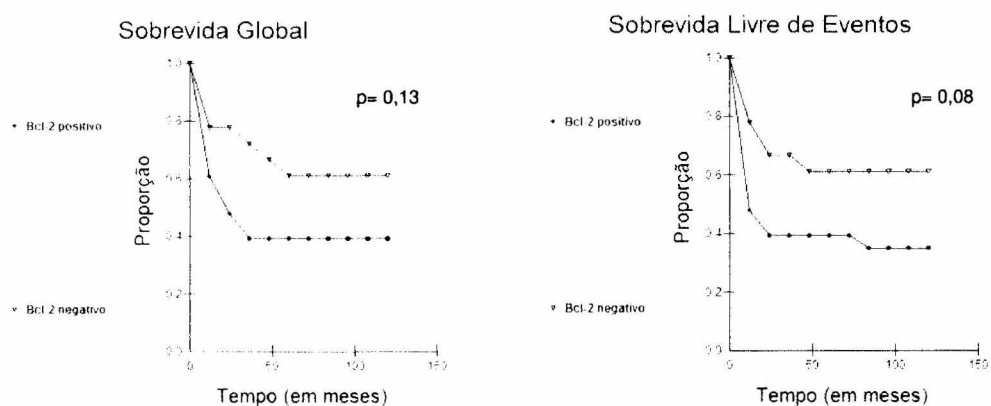


Gráfico 12: SG e SLE segundo a expressão de Bcl-2 em todos os pacientes (*log-rank test*).

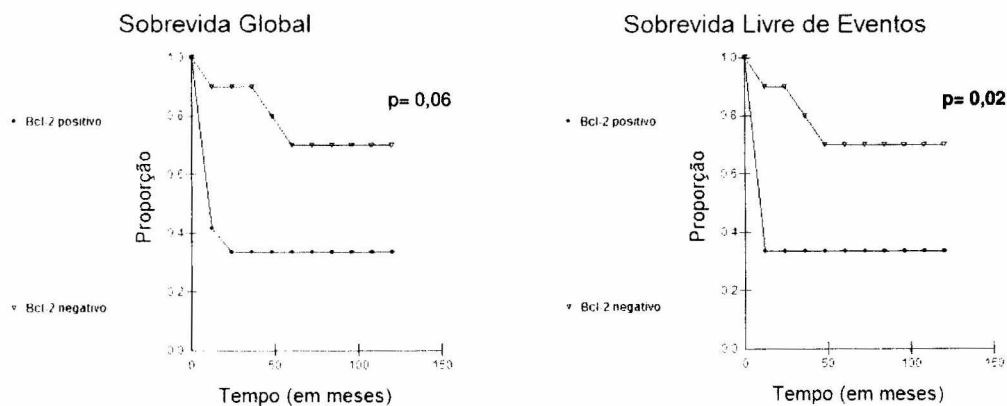


Gráfico 13: SG e SLE segundo a expressão de Bcl-2 nos pacientes com linfoma tonsilar (*log-rank test*).

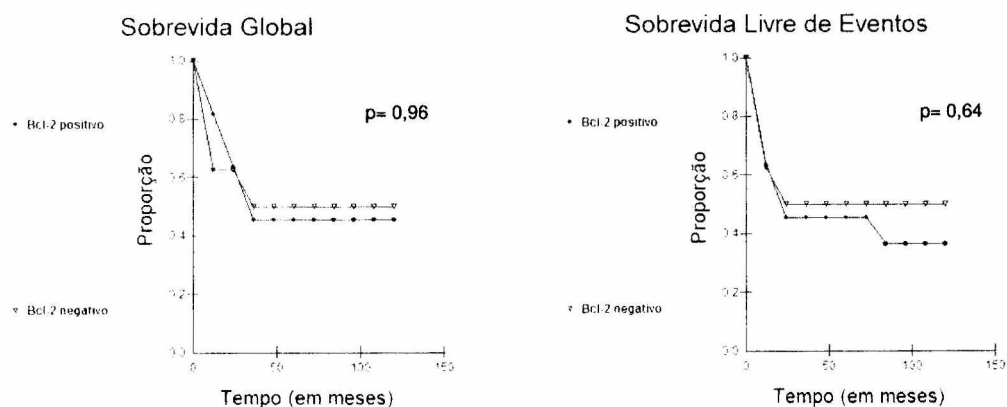


Gráfico 14: SG e SLE segundo a expressão de Bcl-2 nos pacientes com linfoma nodal (*log-rank test*).

A figura 9 mostra a expressão imuno-histoquímica da proteína Bcl-2 nos dois grupos de pacientes.

6.6 PROTEÍNA p53

A expressão da proteína p53 foi encontrada em 11/24 pacientes com linfoma tonsilar (45,8%) e em 9/19 pacientes com linfoma nodal (47,4%), com $p=0,83$. Considerando-se juntos todos os 43 pacientes, a proteína p53 foi expressa em 20/43 pacientes (46,5%).

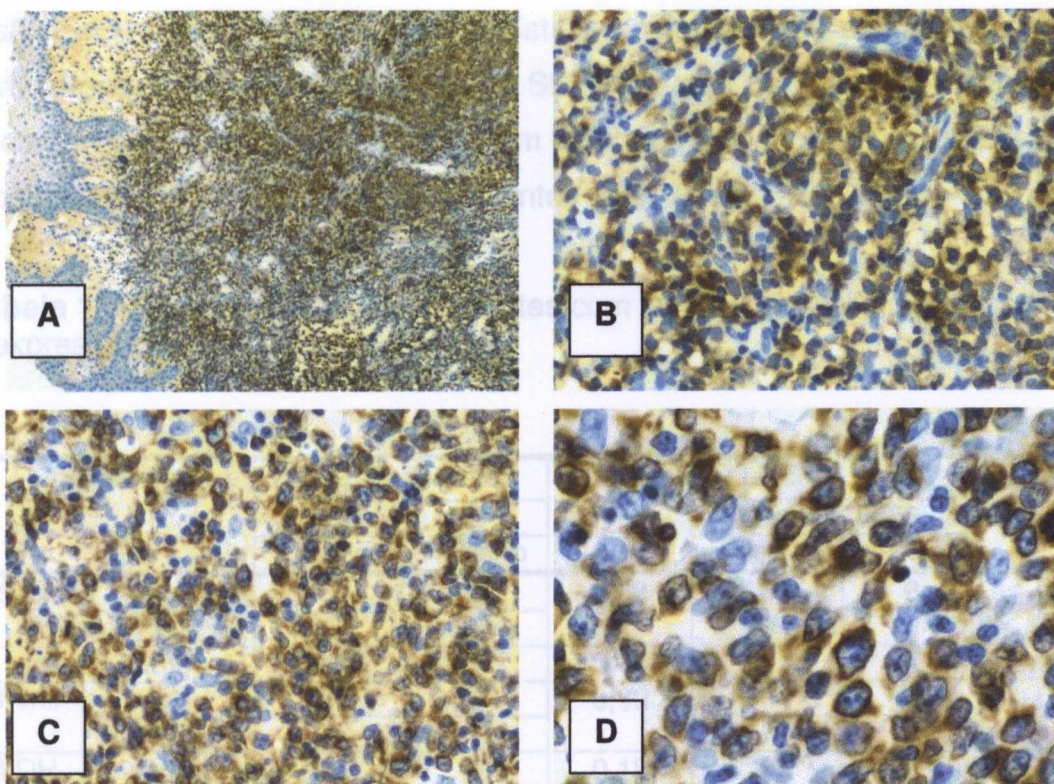


Figura 9: Expressão IHQ da proteína Bcl-2. Em **A** e **B** observa-se a forte expressão de Bcl-2 (marcação citoplasmática em marrom) em paciente com linfoma tonsilar (aumento de 40 e 200X, respectivamente). Em **C** e **D** observa-se mesmo aspecto descrito anteriormente em paciente com linfoma nodal (200 e 400X, respectivamente).

As características dos pacientes segundo o grupo (tonsilar ou nodal) e a expressão de p53 são sumarizadas a seguir na tabela 18. Pacientes com linfoma tonsilar do sexo masculino mostraram maior positividade para p53 e pacientes do sexo feminino mostraram maior negatividade para p53 ($p= 0,03$).

3.7 CD34

A análise dos parâmetros mencionados na tabela 18, quando comparados entre pacientes no mesmo grupo de expressão da proteína p53 (positivo ou negativo) versus linfoma tonsilar e nodal, não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significativa.

Também, a análise comparativa da sobrevida global de todos os pacientes, dos pacientes com linfoma tonsilar e dos pacientes com linfoma nodal segundo a expressão da proteína p53 (se positivo ou negativo), não apresentou diferença significativa ($p= 0,91$; $0,36$ e $0,20$, respectivamente – *log-rank test*). Na SLE a diferença entre os grupos (todos os pacientes; linfoma tonsilar e linfoma nodal) também não foi significativa ($p= 0,85$; $0,41$ e $0,33$, respectivamente – *log-rank*

test). Embora sem significância estatística, pacientes com expressão de p53 com linfoma tonsilar mostraram SG e SLE melhores que pacientes negativos. O contrário ocorreu com pacientes com linfoma nodal (a positividade para p53 mostrou SG e SLE menores que pacientes negativos).

Tabela 18: Características dos pacientes com linfoma tonsilar e nodal segundo a expressão de p53

Parâmetros		LDGCB tonsilar		Valor de p	LDGCB nodal		Valor de p
		Proteína p53			Proteína p53		
		Positivo	Negativo		Positivo	Negativo	
Sexo	Masculino	8	3	0,03	6	6	1,00
	Feminino	3	10		3	4	
Idade (anos)*		49	63	0,08	62	60	0,93
Perfil	CG	4	6	0,69	2	4	0,62
	nCG	7	7		7	6	
LDH	Normal	10	6	0,18	3	6	0,34
	Elevado	0	2		5	3	
IPI	0 e 1	8	7	NA	5	7	NA
	2	1	1		2	2	
	3	1			1		
	4 e 5						

*Mediana dos valores; NA: não avaliável.

A figura 10 mostra a expressão imuno-histoquímica da proteína p53 nos dois grupos de pacientes.

6.7 CD34

A análise da densidade dos microvasos marcados pelo anticorpo CD34 foi realizada em 20 dos 24 pacientes com linfoma tonsilar e em 18 dos 19 pacientes com linfoma nodal. Nos pacientes em que a análise deste marcador não foi realizada, o principal motivo foi fragmento de biópsia exíguo impedindo a contagem mínima de quatro campos consecutivos. Um paciente com linfoma tonsilar apresentava também alteração vascular secundária à ulceração no epitélio e não pôde ser avaliado.

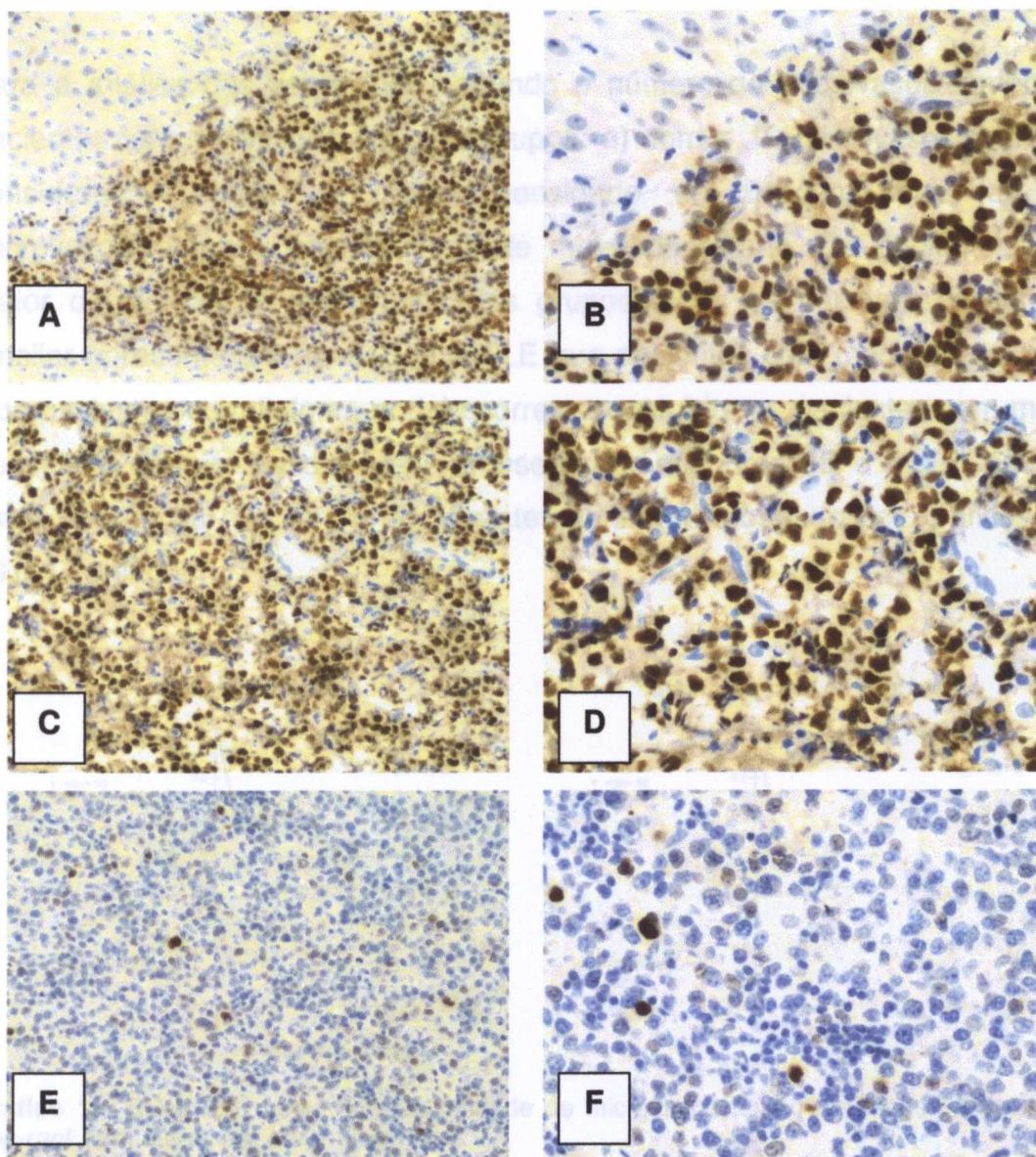


Figura 10: Expressão IHQ da proteína p53. Em **A** e **B** observa-se a forte expressão de p53 (marcação nuclear em marrom) em paciente com linfoma tonsilar (aumento de 200 e 400X, respectivamente). Em **C** e **D** observa-se mesmo aspecto descrito anteriormente em paciente com linfoma nodal (200 e 400X, respectivamente). Em **E** e **F** observa-se paciente com linfoma nodal com fraca expressão da proteína p53 (200 e 400X, respectivamente).

Nos pacientes com linfoma tonsilar a mediana de microvasos marcados pelo CD34/área de superfície foi de 11 microvasos/campo, variando de 6,3 a 26,3 microvasos/campo (área do campo= 0,20 mm²). Nos pacientes com linfoma nodal a mediana de microvasos marcados por campo foi de 9,2 variando de 6,3 a 17,7 microvasos/campo, não sendo significativa a diferença das medianas entre os grupos ($p= 0,10$ - teste Mann-Whitney). As contagens dos microvasos nos dois grupos de pacientes são mostradas no **Apêndice B**. A média geral de microvasos marcados pelo CD34 foi de 10 por campo.

Para a análise das sobrevidas segundo o número de microvasos/campo os pacientes foram divididos em dois grupos: **a)** com ≤ 10 microvasos/campo – considerados como de menor densidade e, **b)** com mais de 10 microvasos/campo – considerados de maior densidade. Os pacientes com maior densidade de microvasos dos grupos todos os pacientes e linfoma tonsilar apresentaram piores SG e SLE que pacientes com menor densidade. Nos pacientes com linfoma nodal ocorreu o contrário: os pacientes com maior densidade de microvasos/campo apresentaram melhores SG e SLE. Contudo, estas diferenças não foram significantes conforme mostrado nos gráficos 15, 16 e 17 a seguir.

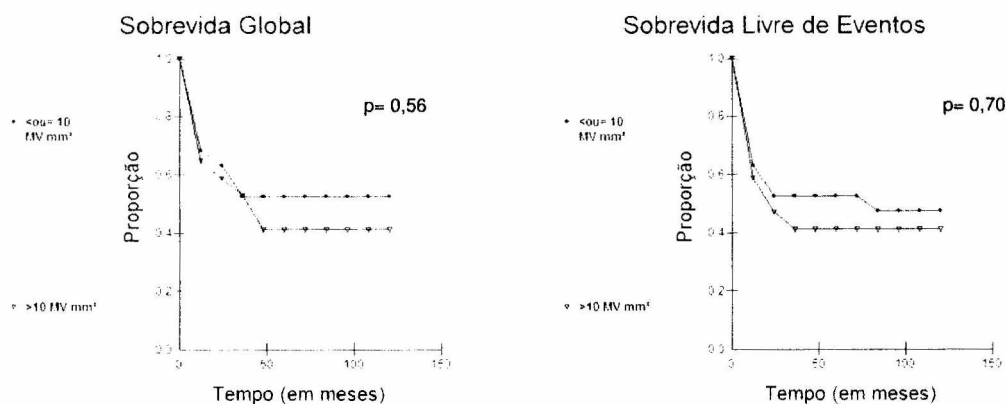


Gráfico 15: SG e SLE segundo a quantidade de microvasos/campo em todos os pacientes (*log-rank test*). Legenda: MV= microvasos.

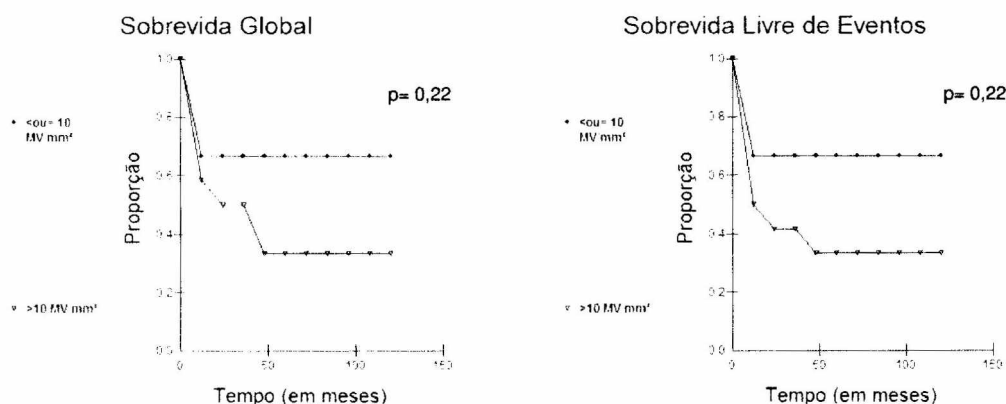


Gráfico 16: SG e SLE segundo a quantidade de microvasos/campo nos pacientes com linfoma tonsilar (*log-rank test*). Legenda: MV= microvasos.

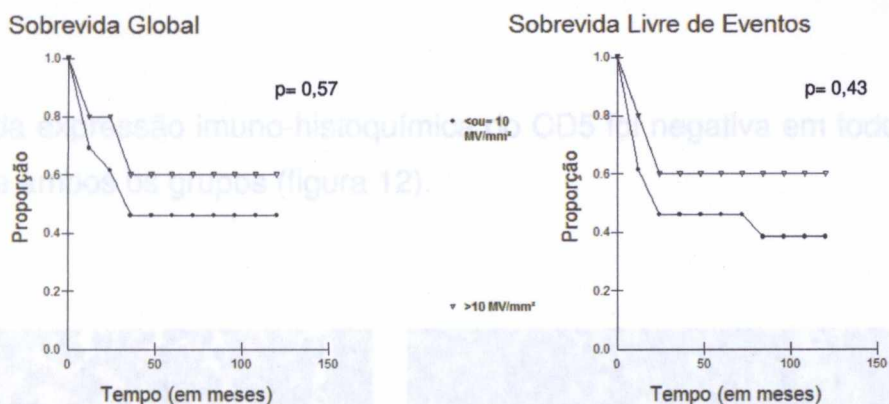


Gráfico 17: SG e SLE segundo a quantidade de microvasos/campo nos pacientes com linfoma nodal (*log-rank test*). Legenda: MV= microvasos.

A figura 11 mostra a marcação dos microvasos pelo CD34 em ambos os grupos de pacientes descritos (tonsilar e nodal).

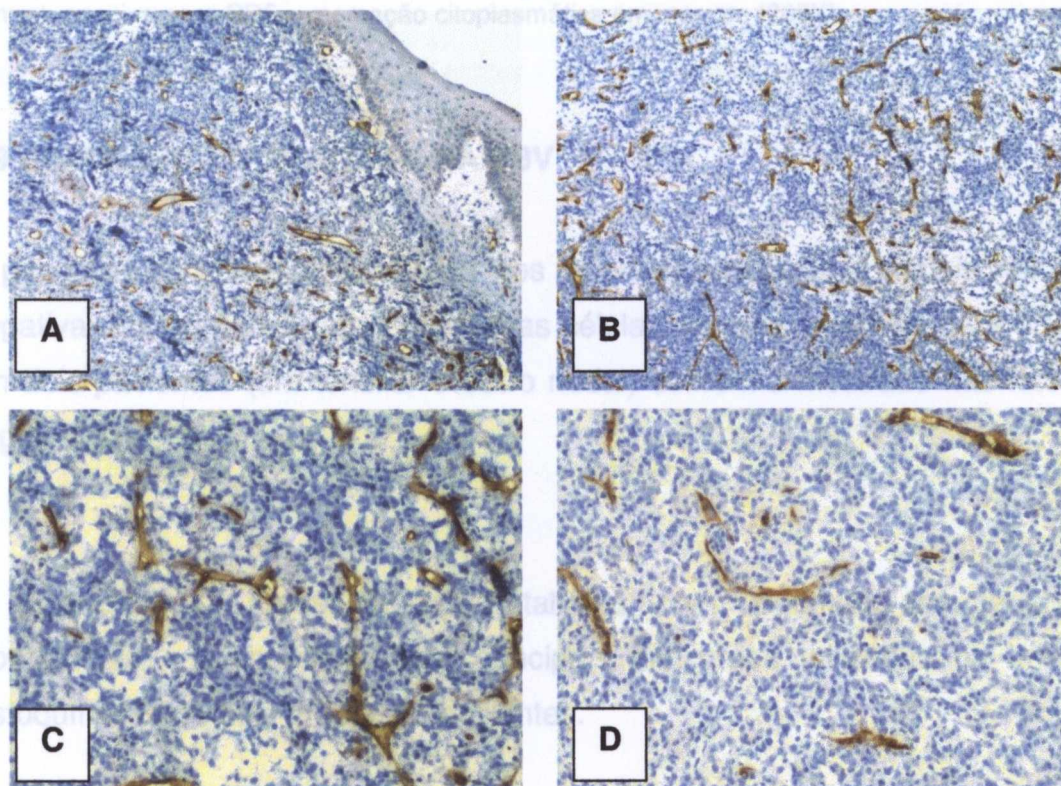


Figura 11: Microvasos marcados pelo CD34. Em **A**, **B** e **C** observam-se microvasos marcados pelo CD 34 (em marrom) em paciente com linfoma tonsilar, mostrando uma moderada quantidade de vasos positivos (aumento de 40X, 40X, 100X, respectivamente). Em **D**, paciente com linfoma nodal mostrando menor densidade de microvasos/campo (100X).

6.8 CD5

A pesquisa da expressão imuno-histoquímica do CD5 foi negativa em todos os pacientes, de ambos os grupos (figura 12).

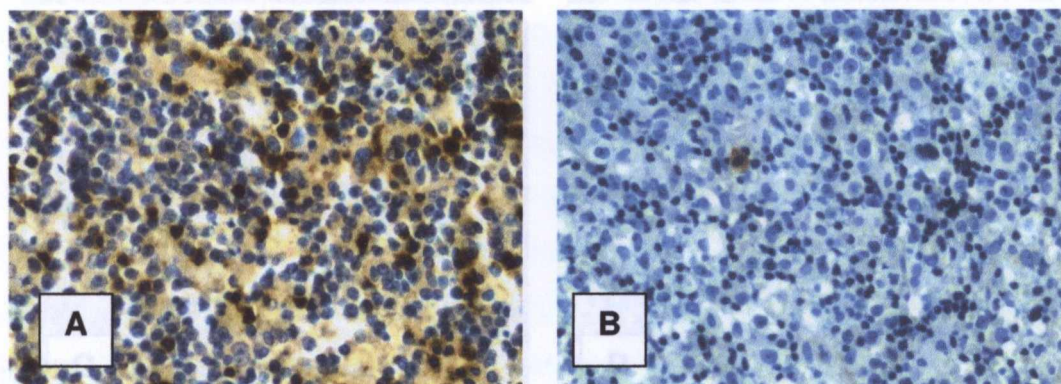


Figura 12: Expressão IHQ do CD5. Em **A**, há positividade para CD5 em células pequenas (reacionais) em paciente com linfoma tonsilar. As células neoplásicas (grandes) são negativas (200X). Em **B**, paciente com linfoma nodal negativo para CD5. Há também pequena célula (no centro), positiva para CD5 – marcação citoplasmática em marrom (200X).

6.9 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* PARA EBV

A pesquisa da infecção pelo EBV nos linfomas tonsilares e nodais resultou negativa. Foram encontradas raríssimas células isoladas positivas para o EBV em dois pacientes (um tonsilar e outro nodal) conforme mostrado nas fotos a seguir (figura 13).

O **apêndice C** apresenta duas tabelas com algumas características laboratoriais e a marcação dos principais anticorpos utilizados na imuno-histoquímica nos dois grupos de pacientes.

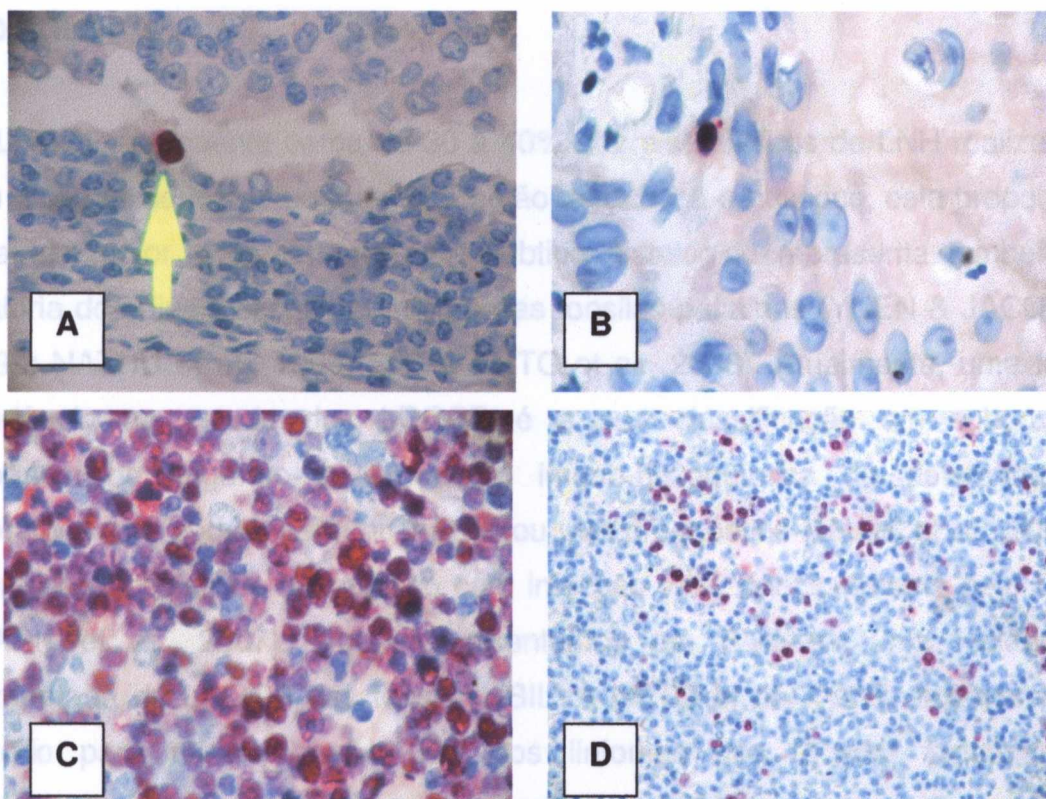


Figura 13: Hibridização *in situ* para o EBV. Em **A** observa-se célula isolada positiva para o EBV em um paciente com linfoma nodal (seta) – marcação nuclear em vermelho (400X). Em **B** observa-se pequeno linfócito positivo para EBV em meio às células do epitélio da tonsila palatina (400X). Em **C** e **D** observam-se controles positivos da reação (paciente com linfoma de Burkitt (400X) e com mononucleose infecciosa (100X), respectivamente).

cerca de 30-40% dos diagnósticos de LNH são de LDGCB (NIJEN & JACOBS, 1998; NATHU et al., 1999).

Se considerarmos apenas os pacientes com LDGCB das tonsilas palatinas, nosso dado também é compatível com a literatura (4,2% dos diagnósticos). A maior casuística publicada destes linfomas foi estudada por Krol et al., em 2001, na Holanda e, de 1.168 pacientes estudados, 42 casos eram de LDGCB das tonsilas palatinas (3,6%), dado muito próximo ao nosso.

A maioria dos nossos pacientes foi tratada com esquemas de quimioterapia baseados em antraciclinas, considerada a terapia padrão de primeira linha para LDGCB. Apenas um destes pacientes foi tratado com esquema R-CHOP, o que nos leva a necessidade de adicionar a imunoterapia ao tratamento dos pacientes com LDGCB tratados na rede pública, pois esta droga mostrou importante ganho na SO e nas taxas de cura dos pacientes com LDGCB (SEHN et al., 2007).

7 DISCUSSÃO

O LDGCB representa cerca de 30 a 40% dos diagnósticos de LNH realizados em diversas séries estudadas. Na região de cabeça e pescoço, esta proporção é ainda maior e geralmente este subtipo histológico representa também a maioria dos diagnósticos de linfoma das tonsilas palatinas (YUEN & JACOBS, 1999; NATHU et al., 1999; SILVA NETO et al., 2008). Atualmente, uma forte tendência no estudo dos LDGCB é a sua classificação em subgrupos prognósticos segundo a expressão imuno-histoquímica de determinadas proteínas que podem conferir melhor ou pior prognóstico (HANS et al., 2004), além da pesquisa da associação com infecção viral, principalmente pelo EBV (PARK et al., 2007). Como apresentamos em Salvador uma incidência aumentada de LDGCB das tonsilas (SILVA NETO et al., 2008), fizemos este estudo para caracterização IHQ dos linfomas das tonsilas palatinas e pesquisamos sua associação com infecção pelo EBV.

Em relação ao número de casos de LDGCB diagnosticados no período do estudo (44,6%), o dado é compatível com a literatura, pois há referência que cerca de 30-40% dos diagnósticos de LNH são de LDGCB (YUEN & JACOBS, 1999; NATHU et al., 1999).

Se considerarmos apenas os pacientes com LDGCB das tonsilas palatinas, nosso dado também é compatível com a literatura (4,2% dos diagnósticos). A maior casuística publicada destes linfomas foi estudada por Krol et al., em 2001, na Holanda e, de 1.168 pacientes estudados, 42 casos eram de LDGCB das tonsilas palatinas (3,6%), dado muito próximo ao nosso.

A maioria dos nossos pacientes foi tratada com esquemas de quimioterapia baseados em antraciclina, considerada a terapia padrão de primeira linha para LDGCB. Apenas um destes pacientes foi tratado com esquema R-CHOP, o que mostra a necessidade de adicionar a imunoterapia ao tratamento dos pacientes com LDGCB tratados na rede pública, pois esta droga mostrou importante ganho na SG e nas taxas de cura dos pacientes com LDGCB (SEHN et al., 2007).

Em relação aos dados demográficos, nossos pacientes com linfoma tonsilar apresentaram idade em torno de 60 anos, compatível com a maioria das séries estudadas (LEE et al., 1994; KROL et al., 2001; GURKAYNAK et al., 2003). Porém foi observada diferença em relação ao sexo: enquanto a maioria das séries estudadas mostra um predomínio do sexo masculino (LEE et al., 1994; KROL et al., 2001; GURKAYNAK et al., 2003; FRATA et al., 2005; MOHAMMADIANPANAHA et al., 2005), apresentamos uma discreta maioria de pacientes do sexo feminino com LDGCB das tonsilas palatinas (13/24 casos). Nos pacientes com linfoma nodal houve predomínio do sexo masculino.

Apesar dos pacientes com linfoma tonsilar terem apresentado SG e SLE maiores que os pacientes com linfoma nodal, estas diferenças não foram significativas. Isto pode ter ocorrido, pois a maioria dos pacientes apresentava IPI de baixo risco (entre zero e um), mostrando um bom prognóstico que não foi suplantado pelo local da apresentação inicial do linfoma.

Se considerados todos os pacientes do estudo juntos, o IPI mostrou-se eficaz para distinguir pacientes com melhores SG e SLE, pois pacientes com IPI entre zero e um mostraram SG e SLE significativamente maiores que pacientes com $IPI \geq$ dois. Este dado também valida o IPI em nosso meio, confirmando seu valor como fator prognóstico conforme já demonstrado em diversos outros trabalhos (SHIPP et al., 1993; HALLACK NETO et al., 2005; SEHN et al., 2007).

No grupo de pacientes com linfoma tonsilar, a separação conforme o IPI (se de baixo ou de alto risco) não mostrou diferença nas SG e SLE. Isso já foi observado anteriormente pelo nosso grupo (SILVA NETO et al., 2008), sugerindo que o IPI talvez não seja o melhor fator prognóstico a ser levado em consideração nos linfomas extranodais. Esta observação é reforçada pela diferença significativa na SLE apresentada pelos pacientes com linfoma exclusivamente nodal e com IPI de baixo risco estudados no presente trabalho, que apesar do número de casos reduzidos, mostraram melhor SLE que pacientes com linfoma nodal e $IPI \geq$ dois.

Conforme demonstrado recentemente por outros autores a contagem linfocitária ao diagnóstico apresenta correlação com a sobrevida. Aqueles pacientes com linfócitos ≤ 1.000 células/mm³ apresentam piores SG e SLE que os demais (KIM et al., 2007; COX et al., 2008 (a,b); TALAULIKAR et al., 2008; OKI et al., 2008). Estes dados são reproduzidos no nosso estudo, pois os pacientes com linfoma tonsilar e linfócitos > 1.000 /mm³ ao diagnóstico apresentaram SG e SLE significativamente maiores ($p = < 0,0001$ e $p = 0,003$, respectivamente) que os pacientes do mesmo grupo com linfócitos < 1.000 /mm³. Se considerados todos os pacientes estudados juntos (tonsilar e nodal), a contagem linfocitária se manteve significativamente associada com SG superior naqueles pacientes com contagem linfocitária > 1.000 /mm³ ao diagnóstico. Acreditamos que o número pequeno de pacientes do grupo de linfoma nodal possa ter influenciado na avaliação da sobrevida segundo a contagem linfocitária, não havendo significância estatística neste grupo.

Os percentuais de positividade para os anticorpos CD10, Bcl-6 e MUM1 foram semelhantes aos encontrados pelos outros autores nas séries anteriormente estudadas (Tabelas 4, 5 e 6; página 28). Pacientes com linfoma tonsilar apresentaram significativamente mais expressão de Bcl-6 que linfomas nodais ($p = 0,007$). Se considerarmos o Bcl-6 isoladamente como um marcador de CG, podemos dizer que em comparação com linfomas extranodais em outros sítios anatômicos como estômago e intestino, os linfomas tonsilares apresentam predominantemente perfil de CG (MITCHELL et al., 2008), porém se considerado o algoritmo de Hans et al. (2004), os pacientes com linfoma tonsilar apresentaram discreta maioria com perfil nCG (58,4%), semelhante ao encontrado também por Wong et al. (2009).

Diferente de outros autores, nós não encontramos diferença significativa na relação entre a positividade dos anticorpos CD10 e Bcl-6 e melhor SG e também em relação à positividade para MUM1 e pior SG (Tabelas 4, 5 e 6; página 28). Estes marcadores, isoladamente, não se mostraram úteis na diferenciação de subgrupos prognósticos no presente trabalho.

Nos pacientes com linfoma tonsilar, a SG e SLE de pacientes com perfil de CG mostrou-se melhor que a de pacientes com perfil nCG, conforme apresentado em outros estudos (ALIZADEH et al., 2000; ROSENWALD et al., 2002; HANS et al., 2004). Contudo, esta diferença, no presente estudo, não foi significativa. Isto pode ter ocorrido pelo pequeno número de pacientes nos dois grupos estudados. Importante ressaltar que pacientes com linfoma nodal apresentaram também maioria com perfil nCG (68,4%) e este subgrupo apresentou SG e SLE melhores que pacientes com perfil de CG (sem significância estatística), contrariamente a outros estudos apresentados (ALIZADEH et al., 2000; ROSENWALD et al., 2002; HANS et al., 2004).

A expressão IHQ da proteína Bcl-2 vem sendo consistentemente associada a piores SG e SLE na maioria dos estudos (Tabela 7; página 29). Neste trabalho, observamos SLE significativamente mais baixa nos pacientes com linfoma tonsilar Bcl-2 positivos ($p= 0,02$). Se considerado todo o grupo (tonsilar e nodal) a positividade mostrou tendência a pior SLE ($p= 0,08$). Estes dados corroboram a vasta literatura sobre o tema (Tabela 7; página 29), porém acreditamos que não se reproduziu na SG pelo pequeno número de pacientes ou porque a maioria dos pacientes apresenta IPI de baixo risco.

Em nosso trabalho observamos expressão da proteína p53 em 46,5% dos pacientes, dados compatíveis com outros trabalhos brasileiros que avaliaram a expressão desta proteína em LDGCB (PAGNANO et al., 2001; KERBAUY et al., 2004; DOMINGUES et al., 2006). Embora sem significância estatística e diferente de outros estudos (PIRIS et al., 1994; LEROY et al., 2002; VISCO et al., 2006), a positividade para p53 foi associada com melhores SG e SLE nos pacientes com linfoma tonsilar, ocorrendo o contrário com os pacientes com linfoma nodal. Isto deve chamar a atenção para o fato que a correlação de positividade para p53 com sobrevida pode ser diferente em pacientes com linfoma nodal e extranodal. Estudos com maior número de pacientes e envolvendo outros sítios extranodais podem ajudar a confirmar ou não esta observação.

A diferença entre a densidade dos microvasos nos dois grupos de pacientes apresentou uma tendência para maior densidade nos linfomas tonsilares, com $p= 0,10$. Não encontramos outros trabalhos comparando a densidade dos microvasos em diferentes sítios de acometimento como estudado no nosso. Em relação à sobrevida e o perfil de densidade, observamos melhores SG e SLE nos pacientes com linfoma tonsilar e com menor densidade de microvasos, porém sem significância estatística, achado corroborado por outros estudos (RUAN et al., 2006; JORGENSEN et al., 2007; TZANKOV et al., 2007). Contrariamente, a maior densidade dos microvasos foi associada com melhor sobrevida nos nossos pacientes com linfoma nodal. Isto sugere que a densidade dos microvasos pode ter valor prognóstico diferente segundo o sítio de apresentação do linfoma.

No presente trabalho todos os pacientes foram negativos para o marcador CD5. A expressão deste marcador tem sido relatada como entre 5-10% dos pacientes com LDGCB *de novo*, conferindo um pior prognóstico (HARADA et al., 1999; YAMAGUCHI et al., 2002). Devido à negatividade não pudemos avaliar este dado. Contudo, em outro estudo envolvendo pacientes com LDGCB do trato aerodigestivo, os 17 pacientes com linfoma nas tonsilas palatinas também foram CD5 negativos (WONG et al., 2009), semelhante ao encontrado em nosso estudo.

Recentemente, um novo subtipo de LDGCB especificamente associado ao EBV em idosos foi descrito pela OMS (SWERDLOW et al., 2008). Nestes pacientes, como em LNH em geral, a infecção pelo EBV tem se revelado como um biomarcador de pior prognóstico (PARK et al., 2007). No nosso estudo a infecção pelo EBV foi observada em raras células não neoplásicas em dois casos, portanto não conseguimos demonstrar uma associação entre a infecção pelo EBV e LDGCB tonsilares ou nodais. Apesar da nossa pequena casuística, este dado é distinto do descrito por Park et al., (2007) que observaram uma frequência desta associação viral em 9% de 380 casos de LDGCB. Uma discrepância ainda maior pode se observar quando comparamos com os dados de Bahnassy et al., (2006), que demonstraram a infecção pelo EBV em 90% dos 50 casos de LNH de cabeça e pescoço estudados no Egito.

Infortunadamente, não nos foi possível extrair deste trabalho a frequência desta infecção em linfomas tonsilares, tornando difícil comparação. Por outro lado, corroborando com os nossos dados, Wong et al. (2009) estudando 17 pacientes com LDGCB tonsilares na Malásia não observou nenhuma associação com a infecção pelo EBV. Isto reforça a idéia que os LDGCB tonsilares fazem parte de um grupo heterogêneo de linfomas com patogênese distinta.

A ausência de associação da infecção pelo EBV em LDGCB em tonsilas em adultos no nosso meio foi um dado inicialmente inesperado. Considerando que a porta de entrada da infecção pelo EBV é a orofaringe (OHGA et al., 2002), que tonsilas de crianças brasileiras apresentam significativamente mais células infectadas pelo EBV que crianças alemãs (ARAÚJO et al., 1999) e que células B permanecem com infecção latente durante toda a vida (COHEN, 2000), esperávamos que esta infecção estivesse associada, pelo menos em parte, à patogênese dos LDGCB tonsilares. À semelhança do sugerido para os linfomas de Burkitt (BELLAN et al., 2005), uma explicação para o fato é que, sendo a infecção pelo EBV seletiva para células B em determinado estágio de maturação (que possuam receptores CD21), postulamos que os LDGCB em tonsilas em nosso meio possam ter origem em células B não passíveis de infecção pelo EBV.

A patogênese do EBV em LDGCB, embora relacionada à pior prognóstico, não está completamente elucidada e uma possibilidade é que, durante a sua evolução clonal, parte das células se infecte posteriormente à transformação maligna. Isto é corroborado pelo fato de que não é rara a observação da infecção em parte das células malignas e não em todas as células. Isto é distinto para os linfomas de Burkitt, pois nestes a clonalidade da infecção pelo EBV e a infecção em 100% das células está demonstrada indicando que a infecção precedeu a transformação maligna (EPSTEIN et al., 1964). Assim, é possível que para os LDGCB, células com maior potencial maligno durante a sua evolução clonal passem a expressar receptores para o EBV em parte das mesmas. Isto explicaria a infecção em parte das células malignas e conseqüentemente um pior prognóstico dos LDGCB, este último relacionado à

própria progressão clonal e a infecção pelo EBV, com ganho de mecanismos bloqueadores da apoptose relacionados ao vírus. Deste modo, apesar da alta frequência dos LDGCB tonsilares no nosso meio, a infecção pelo EBV não está implicada na patogênese destes linfomas. Desde que a frequência de LDGCB tonsilares é alta no nosso meio quando comparada com outras séries e que a teoria da estimulação antigênica está relacionada à gênese de linfomas B extranodais, seria necessário um amplo estudo da patogênese dos LDGCB para testar estas hipóteses.

Outros fatores de risco para câncer, principalmente da cavidade oral, como o tabagismo e o etilismo (MÜLLER et al., 2005) foram pesquisados no presente estudo e não foi encontrada associação, devendo-se destacar também que esta é uma associação difícil de ser estabelecida sobretudo pelo pequeno número de pacientes acompanhados nesta série e pela dificuldade de quantificar os hábitos em questão num estudo de revisão de prontuários.

Portanto, apresentamos neste estudo características clínicas, laboratoriais, histopatológicas e imuno-histoquímicas de 24 pacientes com LDGCB das tonsilas palatinas e de 19 pacientes com LDGCB nodais, diagnosticados em Salvador – Bahia e pesquisamos sua associação com a infecção pelo EBV.

8 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados permitem as seguintes conclusões:

- 1.** Pacientes com LDGCB acometendo as tonsilas palatinas apresentaram predominantemente perfil não-centro germinativo, assim como pacientes com linfoma nodal;
- 2.** Nos pacientes com linfoma tonsilar os fatores que influenciaram significativamente a sobrevida foram a contagem linfocitária ao diagnóstico e a expressão de Bcl-2;
- 3.** Nos pacientes com linfoma nodal o IPI influenciou significativamente a SLE;
- 4.** Se considerados juntos os dois grupos de pacientes, o IPI e a contagem linfocitária ao diagnóstico influenciaram significativamente a sobrevida;
- 5.** Não houve diferença significativa na sobrevida dos pacientes segundo a expressão de p53, densidade dos microvasos marcados pelo CD34 e perfil de CG ou nCG;
- 6.** Não houve expressão de CD5 em nenhum dos pacientes;
- 7.** Não houve relação entre infecção pelo EBV e LDGCB das tonsilas palatinas, nem com linfomas nodais.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIZADEH, A.; EISEN, M.; DAVIS, R.; et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. **Nature**, **403**: 503-11, 2000.

AMEN, F.; HORNCastle, D.; ELDERFIELD, K.; et al. Absence of cyclin-D2 and Bcl-2 expression within the germinal centre type of diffuse large B-cell lymphoma identifies a very good prognostic subgroup of patients. **Histopathology**, **51**: 70-9, 2007.

ARAÚJO, I.; FOSS, H.; HUMMEL, M.; et al. Frequent expansion of Epstein-Barr virus (EBV) infected cells in germinal centres of tonsils from an area with a high incidence of EBV-associated lymphoma. **J. Pathol.**, **187**: 326-30, 1999.

AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D.; et al. **BioEstat 5.0 – Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Sociedade Civil Mamirauá / MCT – CNPq / Conservation International. Belém – Pará – Brasil, 2007.

BAHNASSY, A.; ZEKRI, A.; ASAAD, N.; et al. Epstein-Barr viral infection in extranodal lymphoma of the head and neck: correlation with prognosis and response to treatment. **Histopathology**, **48**: 516-28, 2006.

BAIREY, O.; ZIMRA, Y.; KAGANOVSKY, E.; et al. Microvessel density in chemosensitive and chemoresistant diffuse large B-cell lymphomas. **Med. Oncol.**, **17**: 314-8, 2000.

BARRANS, S.; O'CONNOR, S.; EVANS, P.; et al. Rearrangement of the BCL6 locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. **Br. J. Haematol.**, **117**: 322-32, 2002.

BEHL, D.; PORRATA, L.; MARKOVIC, S.; et al. Absolute lymphocyte count recovery after induction chemotherapy predicts superior survival in acute myelogenous leukemia. **Leukemia**, **20**: 29-34, 2006.

BELLAN, C.; LAZZI, S.; HUMMEL, M.; et al. Immunoglobulin gene analysis reveals 2 distinct cells of origin for EBV-positive and EBV-negative Burkitt lymphomas. **Blood**, **106**: 1031-6, 2005.

BERGLUND, M.; THUNBERG, U.; AMINI, R.; et al. Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis. **Mod. Pathol.**, **18**: 1113-20, 2005.

BIASOLI, I.; MORAIS, J.; SCHELIGA, A.; et al. CD10 and Bcl-2 expression combined with the International Prognostic Index can identify subgroups of patients with diffuse large-cell lymphoma with very good or very poor prognoses. **Histopathology**, **46**: 328-33, 2005.

BOENISH, T. **Imunochemical staining methods**. USA: DAKO Corporation, 1989.

CARMELIER, P.; JAIN, R. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, **407**: 249-57, 2000.

CHOI, C.; SUNG, H.; PARK, K.; et al. Early lymphopenia as a risk factor for chemotherapy-induced febrile neutropenia. **Am. J. Hematol.**, **73**: 263-6, 2003.

COHEN, J. Epstein-Barr virus infection. **N. Engl. J. Med.**, **343**: 481-92, 2000.

COLOMO, L.; LÓPEZ-GUILLERMO, A.; PERALES, M.; et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. **Blood**, **101**: 78-84, 2003.

COX, M.; NOFRONI, I.; LA VERDE, G.; et al. Absolute lymphocyte count is a prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma. **Br. J. Haematol.**, **141**: 265-8, 2008 (a).

COX, M.; NOFRONI, I.; RUCO, L.; et al. Low absolute lymphocyte count is a poor prognostic factor in diffuse-large-B-cell-lymphoma. **Leuk. Lymphoma**, **49**: 1745-51, 2008 (b).

DAVIS, R.; BROWN, K.; SIEBENLIST, U.; STAUDT, L. Constitutive Nuclear Factor kB Activity Is Required for Survival of Activated B Cell-like Diffuse Large B Cell Lymphoma Cells. **J. Exp. Med.**, **194**: 1861-74, 2001.

DELECLUSE, H.; HAMMERSCHMIDT, W. The genetic approach to the Epstein-Barr virus: from basic virology to gene therapy. **Mol. Pathol.**, **53**: 270-9, 2000.

DE PAEPE, P.; ACHTEN, R.; VERHOEF, G.; et al. Large cleaved and immunoblastic lymphoma may represent two distinct clinicopathologic entities within the group of diffuse large B-cell lymphomas. **J. Clin. Oncol.**, **23**: 7060-8, 2005.

DOGAN, A.; BADGI, E.; MUNSON, P.; ISAACSON, P. CD10 and BCL-6 expression in paraffin sections of normal lymphoid tissue and B-cell lymphomas. **Am. J. Surg. Pathol.**, **24**: 846-52, 2000.

DOMINGUES, M. A. C. **Significado prognóstico da expressão da survivina e do p53 no linfoma de grandes células B difuso**. 87 f. 2006. Tese (Doutorado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Campus de Botucatu, Botucatu – SP.

ENGEL, M. ; ESSOP, M.; CLOSE, P.; et al. Improved prognosis of Epstein-Barr virus associated childhood Hodgkin's lymphoma: study of 47 South African cases. **J. Clin. Pathol.**, **53**: 182-6, 2000.

ENNISHI, D.; TAKEUCHI, K.; YOKOYAMA, M.; et al. CD5 expression is potentially predictive of poor outcome among biomarkers in patients with diffuse

large B-cell lymphoma receiving rituximab plus CHOP therapy. **Ann. Oncol.**, **19**: 1921-6, 2008.

EPSTEIN, M.; ACHONG, B.; BARR, Y. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. **Lancet**, **1**: 702-3, 1964.

EZZAT, A.; IBRAHIM, E.; EL WESHI, A.; et al. Localized non-Hodgkin's lymphoma of Waldeyer's ring: clinical features, management, and prognosis of 130 adult patients. **Head Neck**, **23**: 547-58, 2001.

FABIANI, B.; DELMER, A.; LEPAGE, E.; et al. CD10 expression in diffuse large B-cell lymphomas does not influence survival. **Virchows Arch.**, **445**: 545-51, 2004.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **N. Engl. J. Med.**, **285**: 1182-6, 1971.

FOLKMAN, J. Clinical applications of research on angiogenesis. **N. Engl. J. Med.**, **333**: 1757-63, 1995.

FRATA, P.; BUGLIONE, M.; GRISANTI, S.; et al. Localized extranodal lymphoma of the head and neck: retrospective analysis of a series of 107 patients from a single institution. **Tumori**, **91**: 456-62, 2005.

GASCOYNE, R.; ADOMAT, S.; KRAJEWSKA, M.; et al. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. **Blood**, **90**: 244-51, 1997.

GOSS, C. (Ed.). In: **Anatomia de Gray**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1988, p. 974-6.

GRATZINGER, D.; ZHAO, S.; MARINELLI, R.; et al. Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in diffuse large B-cell lymphoma subtypes. **Am. J. Pathol.**, **170**: 1362-9, 2007.

GURKAYNAK, M.; CENGIZ, M.; AKYUREK, S.; et al. Waldeyer's ring lymphomas. Treatment results and prognostic factors. **Am. J. Clin. Oncol.**, **26**: 437-40, 2003.

HALLACK NETO, A. E.; PEREIRA, J.; DORLHIAC-LLACER, P.; et al. Aplicação do índice prognóstico internacional em pacientes com linfoma difuso de grandes células B em uma instituição brasileira. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, **27**: 27-30, 2005.

HANS, C.; WEISENBURGER, D.; GREINER, T.; et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by Immunohistochemistry using a tissue microarray. **Blood**, **103**: 275-82, 2004.

HARADA, S.; SUZUKI, R.; UEHIRA, K.; et al. Molecular and immunological dissection of diffuse large B cell lymphoma: CD5⁺, and CD5⁻ with CD10⁺ groups may constitute clinically relevant subtypes. **Leukemia**, **13**: 1441-7, 1999.

HASENCLEVER, D.; DIEHL, V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. **N. Engl. J. Med.**, **339**: 1506-14, 1998.

HERMINE, O.; HAIOUN, C.; LEPAGE, E.; et al. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. **Blood**, **87**: 265-72, 1996.

HSI, E.; YEGAPPAN, S. Lymphoma Immunophenotyping: A New Era in Paraffin-Section Immunohistochemistry. **Adv. Anat. Pathol.**, **8**: 218-39, 2001.

HSU, J.; GLASER, S. Epstein-Barr virus-associated malignancies: epidemiologic patterns and etiologic implications. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, **34**: 27-53, 2000.

HUDNALL, S.; GE, Y.; WEI, L.; et al. Distribution and phenotype of Epstein-Barr virus-infected cells in human pharyngeal tonsils. **Mod. Pathol.**, **18**: 519-27, 2005.

ICHIKAWA, A.; KINOSHITA, T.; WATANABE, T.; et al. Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. **N. Engl. J. Med.**, **337**: 529-34, 1997.

JAFFE, E.; PITTALUGA, S. The pathologic basis for the classification of non-Hodgkin's lymphomas. In: HOFFMAN, R.; BENZ, E.; SHATTIL, S.; et al. (Eds.). **Hematology Basic Principles and Practice**. 4th edition. Elsevier: Churchill Livingstone, 2005, cap. 76, p. 1379-96.

JONES, J.; SHURIN, S.; ABRAMOWSKY, C.; et al. T cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. **N. Engl. J. Med.**, **318**: 733-41, 1988.

JORGENSEN, J.; SORENSEN, F.; BENDIX, K.; et al. Angiogenesis in non-Hodgkin's lymphoma: Clinico-pathological correlations and prognostic significance in specific subtypes. **Leuk. Lymphoma**, **48**: 584-95, 2007.

KAMANI, N.; DOUGLAS, S. Estrutura e desenvolvimento do sistema imune. In: STITES, D.; TERR, A. (Eds.). **Imunologia Básica**. Rio de Janeiro: Prentice-Hall do Brasil LTDA, 1992, p. 7-25.

KATZENBERGER, T.; LOHR, A.; SCHWARZ, S.; et al. Genetic analysis of the novo CD5⁺ diffuse large B-cell lymphomas suggests an origin from a somatically mutated CD5⁺ progenitor B cell. **Blood**, **101**: 699-702, 2003.

KERBAUY, F.; COLLEONI, G.; SAAD, S.; et al. Detection and possible prognostic relevance of p53 gene mutation in diffuse large B-cell lymphoma. An

analysis of 51 cases and review of the literature. **Leuk. Lymphoma**, **45**: 2071-8, 2004.

KIM, D.; BAEK, J.; CHAE, Y.; et al. Absolute lymphocyte counts predicts response to chemotherapy and survival in diffuse large B-cell lymphoma. **Leukemia**, **21**: 2227-30, 2007.

KIM, R.; EMI, M.; TANABE, K.; ARIHIRO, K. Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. **Cancer Res.**, **66**: 5527-36, 2006.

KLUMB, C.; CAVALCANTI JÚNIOR, G. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfóides. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, **24**: 111-25, 2002.

KOSTER, A.; VAN KRIEKEN, J.; MACKENZIE, M.; et al. Increased vascularization predicts favorable outcome in follicular lymphoma. **Clin. Cancer Res.**, **11**: 154-61, 2005.

KRAMER, M.; HERMANS, J.; PARKER, J.; et al. Clinical significance of bcl2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. **J. Clin. Oncol.**, **14**: 2131-8, 1996.

KROL, A.; LE CESSIE, S.; SNIJDER, S.; et al. Waldeyer's ring lymphomas: a clinical study from the Comprehensive Cancer Center West Population based NHL registry. **Leuk. Lymphoma**, **42**: 1005-13, 2001.

LANE, D. p53, guardian of the genome. **Nature**, **358**: 15-6, 1992.

LEE, J.; LEE, S.; PARK, J.; et al. Prevalence of EBV RNA in sinonasal and Waldeyer's ring lymphomas. **J. Korean Med. Sci.**, **9**: 281-8, 1994.

LENZ, G.; WRIGHT, G.; DAVE, S.; et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. **N. Engl. J. Med.**, **359**: 2313-23, 2008.

LEROY, K.; HAIOUN, C.; LEPAGE, E.; et al. p53 gene mutations are associated with poor survival in low and low-intermediate risk diffuse large B-cell lymphomas. **Ann. Oncol.**, **13**: 1108-15, 2002.

LÓPEZ-GUILLERMO, A.; COLOMO, L.; JIMÉNEZ, M.; et al. Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Clinical and Biological Characterization and Outcome According to the Nodal or Extranodal Primary Origin. **J. Clin. Oncol.**, **23**: 2797-804, 2005.

LOSSOS, I.; JONES, C.; WARNKE, R.; et al. Expression of a single gene, *BCL-6*, strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. **Blood**, **98**: 945-51, 2001.

LOSSOS, I.; MORGENSZTERN, D. Prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma. **J. Clin. Oncol.**, **24**: 995-1007, 2006.

MAZUR, G.; WRÓBEL, T.; DZIEGIEL, P.; et al. Angiogenesis measured by expression of CD34 antigen in lymph nodes of patients with non-Hodgkin's lymphoma. **Folia Histochem. Cytobiol.**, **42**: 241-3, 2004.

MIDDELDORP, J.; BRINK, A.; VAN DEN BRULE, A.; MEIJER, C. Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, **45**: 1-36, 2003.

MILNER, J. Structures and functions of the tumor suppressor p53. **Pathol. Biol.** **45**: 797-803, 1997.

MITCHELL, K.; FINN, W., OWENS, S. Differences in germinal centre and non-germinal center phenotype in gastric and intestinal diffuse large B-cell lymphomas. **Leuk. Lymphoma**, **49**: 1717-23, 2008.

MIYAUCHI, M.; HIGASHIKAWA, K.; SUGIYAMA, M.; et al. p53, bcl-2 and bax abnormalities in non-Hodgkin's lymphomas of the head and neck. **J. Oral Pathol. Med.**, **29**: 180-5, 2000.

MOHAMMADIANPANAH, M.; OMIDVAI, S.; MOSALEI, A.; AHMADLOO, N. Treatment results of tonsillar lymphomas: a 10-year experience. **Ann. Hematol.**, **84**: 223-6, 2005.

MOLLER, M.; PEDERSEN, N.; CHRISTENSEN, B. Diffuse large B-cell lymphoma: clinical implications of extranodal versus nodal presentation – a population-based study of 1575 cases. **Br. J. Haematol.**, **124**: 151-9, 2004.

MÜLLER, A.; IHORST, G.; MORTELSMANN, R.; et al. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): trends, geographic distribution, and etiology. **Ann. Hematol.**, **84**: 1-12, 2005.

MURIS, J.; MEIJER, C.; VOS, W.; et al. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. **J. Pathol.**, **208**: 714-23, 2006.

NAKAMURA, N.; NAKAMURA, S.; YAMAGUCHI, M.; et al. CD5⁺ diffuse large B-cell lymphoma consist of germline cases and hypermutated cases in the immunoglobulin heavy chain gene variable region. **Int. J. Hematol.**, **81**: 58-61, 2005.

NATHU, R.; MENDENHALL, N.; ALMASRI, N.; LYNCH, J. Non-Hodgkin's lymphoma of the head and neck: a 30-year experience at the University of Florida. **Head Neck**, **21**: 247-54, 1999.

NAVARATNAM, S.; WILLIAMS, G.; RUBINGER, M.; et al. Expression of p53 predicts treatment failure in aggressive non-Hodgkin's lymphomas. **Leuk. Lymphoma**, **29**: 139-44, 1998.

NIEDER, C.; PETERSEN, S.; PETERSEN, C.; THAMES, H. The challenge of p53 as prognostic and predictive factor in Hodgkin's or non-Hodgkin's lymphoma. **Ann. Hematol.**, **80**: 2-8, 2001.

NORRBY, K.; RIDELL, B. Tumour-type-specific capillary cell stainability in malignant B-cell lymphomas using antibodies against CD31, CD34 and Factor VIII. **APMIS**, **111**: 483-9, 2003.

OHGA, S.; NOMURA, A.; TAKADA, H.; HARA, T. Immunological aspects of Epstein-Barr virus infection. **Clin. Rev. Oncol. Hematol.**, **44**: 203-15, 2002.

OHSHIMA, K.; KAWASAKI, C.; MUTA, H.; et al. CD10 and Bcl10 expression in diffuse large B-cell lymphoma: CD10 is a marker of improved prognosis. **Histopathology**, **39**: 156-62, 2001.

OKEN, M.M.; CREECH, R.H.; TORMEY, D. C.; et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. **Am. J. Clin. Oncol.**, **5**:649-55, 1982.

OKI, Y.; YAMAMOTO, K.; KATO, H.; et al. Low absolute lymphocyte count is a poor prognostic marker in patients with diffuse large B-cell lymphoma and suggests patients' survival benefit from rituximab. **Eur. J. Haematol.**, **81**: 448-53, 2008.

OUDEJANS, J.; JIWA, N.; VAN DEN BRULE, A.; MEIJER, C. Epstein-Barr virus and its possible role in the pathogenesis of B-cell lymphomas. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, **25**: 127-38, 1997.

PAGNANO, K.; VASSALLO, J.; LORAND-METZE, I.; et al. p53, Mdm2, and c-Myc overexpression is associated with a poor prognosis in aggressive non-Hodgkin's lymphomas. **Am. J. Hematol.**, **67**: 84-92, 2001.

PAIK, J.; JEON, Y.; KIM, Y.; et al. Expression and prognostic implications of cell cycle regulatory molecules, p16, p21, p27, p14 and p53 in germinal centre and

non-germinal centre B-like diffuse large B-cell lymphoma. **Histopathology**, **47**: 281-91, 2005.

PARK, S.; LEE, J.; KO, Y.; et al. The impact of Epstein-Barr virus status on clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. **Blood**, **110**: 972-8, 2007.

PATHMANATHAN, R.; PRASAD, U.; SADLER, R.; et al. Clonal proliferations of cells infected with Epstein-Barr virus in preinvasive lesions related to nasopharyngeal carcinoma. **N. Engl. J. Med.**, **333**: 693-8, 1995.

PEDERSEN, L.; JÜRGENSEN, G.; JOHNSEN, H. Serum levels of inflammatory cytokines at diagnosis correlate to the bcl-6 and CD10 defined germinal centre (GC) phenotype and bcl-2 expression in patients with diffuse large B-cell lymphoma. **Br. J. Haematol.**, **128**: 813-9, 2005.

PIRIS, M.; PEZZELLA, F.; MARTINEZ-MONTERO, J.; et al. p53 and bcl-2 expression in high-grade B-cell lymphomas: correlation with survival time. **Br. J. Cancer**, **69**: 337-41, 1994.

PORRATA, L.; RISTOW, K.; HABERMANN, T.; et al. Absolute lymphocyte count at the time of first relapse predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. **Am. J. Hematol.**, **84**: 93-7, 2008.

RAY-COQUARD, I.; BORG, C.; BACHELOT, T.; et al. Baseline and early lymphopenia predict for the risk of febrile neutropenia after chemotherapy. **Br. J. Cancer**, **88**: 181-6, 2003.

REE, H.; OHSIMA, K.; AOZASA, K.; et al. Detection of germinal center B-cell lymphoma in archival specimens: critical evaluation of Bcl-6 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma of the tonsil. **Hum. Pathol.**, **34**: 610-6, 2003.

RICKINSON, A.; KIEFF, W. Epstein-Barr virus. In: FIELDS, B.; KNIPE, D.; HOWLEY, P. (Eds.). **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996, p. 2397-446, v2.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, **386**: 671-4, 1997.

ROSENBERG, S. Validity of the Ann Arbor Staging Classification for the non-Hodgkin's Lymphomas. **Cancer Treat. Rep.**, **61**:1023-7, 1977.

ROSENWALD, A.; WRIGHT, G.; CHAN, W.; et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma. **N. Engl. J. Med.**, **346**: 1937-47, 2002.

RUAN, J.; HYJEK, E.; KERMANI, P.; et al. Magnitude of stromal hemangiogenesis correlates with histologic subtype of non-Hodgkin's lymphoma. **Clin Cancer Res.**, **12**: 5622-31, 2006.

SANCHEZ, E.; CHACON, I.; PLAZA, M.; et al. Clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma is dependent on the relationship between different cell-cycle proteins. **J. Clin. Oncol.**, **16**: 1931-9, 1998.

SANNINO, P.; SHOUSHA, S. Demonstration of oestrogen receptors in paraffin wax sections of breast carcinoma using the monoclonal antibody 1D5 and microwave oven processing. **J. Clin. Pathol.**, **47**:90-2, 1994.

SEHN, L. Optimal use of prognostic factors in non-Hodgkin lymphoma. **Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program)** 2006: 295-302.

SEHN, L.; BERRY, B.; CHHANABHAI, M.; et al. 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**, **109**: 1857-61, 2007.

SHIPP, M.; HARRINGTON, D.; ANDERSON, J.; et al. The International non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. **N. Engl. J. Med.**, **329**: 987-94, 1993.

SIDDIQUI, M.; RISTOW, K.; MARKOVIC, S.; et al. Absolute lymphocyte count predicts overall survival in follicular lymphomas. **Br. J. Haematol.**, **134**: 596-601, 2006.

SILVA NETO, M.; JALIL, E.; ARAÚJO, I. Linfomas não-Hodgkin extranodais em Salvador-Bahia: aspectos clínicos e classificação histopatológica segundo a OMS-2001. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, **30**: 36-40, 2008.

SOHN, S.; JUNG, J.; KIM, D.; et al. Prognostic significance of bcl-2, bax, and p53 expression in diffuse large B-cell lymphoma. **Am. J. Hematol.**, **73**: 101-7, 2003.

STEELE, R.; THOMPSON, A.; HALL, P.; LANE, D. The p53 tumour suppressor gene. **Br. J. Surg.**, **85**: 1460-7, 1998.

SU, I.; CHEN, J. The role of Epstein-Barr virus in lymphoid malignancies. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, **26**: 25-41, 1997.

SUGURO, M.; TAGAWA, H.; KAGAMI, Y.; et al. Expression profiling analysis of the CD5⁺ diffuse large B-cell lymphoma subgroup: development of CD5 signature. **Cancer Sci.**, **97**: 868-74, 2006.

SWERDLOW, S.H.; CAMPO, E.; HARRIS, N.L.; et al (Eds). **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. IARC: Lyon, 2008.

TALAULIKAR, D.; CHOUDHURY, A.; SHADBOLT, B.; BROWN, M. Lymphocytopenia as a prognostic marker for diffuse large B cell lymphomas. **Leuk. Lymphoma**, **49**: 959-64, 2008.

TANIGUCHI, M.; OKA, K.; HIASA, A.; et al. De novo CD5⁺ diffuse large B-cell lymphomas express VH genes with somatic mutation. **Blood**, **91**: 1145-51, 1998.

TZANKOV, A.; HEISS, S.; EBNER, S.; et al. Angiogenesis in nodal B cell lymphomas: a high throughput study. **J. Clin. Pathol.**, **60**: 476-82, 2007.

VACCA, A.; RIBATTI, D.; RONCALI, L.; DAMMACCO, F. Angiogenesis in B cell lymphoproliferative diseases. Biological and clinical studies. **Leuk. Lymphoma**, **20**: 27-38, 1995.

VAN IMHOFF, G.; BOERMA, E.; VAN DER HOLT, B.; et al. Prognostic impact of germinal center-associated proteins and chromosomal breakpoints in poor-risk diffuse large B-cell lymphoma. **J. Clin. Oncol.**, **24**: 4135-42, 2006.

VEELKEN, H.; DANNHEIM, S.; MOENTING, J.; et al. Immunophenotype as prognostic factor for diffuse large B-cell lymphoma in patients undergoing clinical risk-adapted therapy. **Ann. Oncol.**, **18**: 931-9, 2007.

VISCO, C.; CANAL, F.; PAROLINI, C.; et al. The impact of p53 and p21^{waf1} expression on the survival of patients with the germinal center phenotype of diffuse large B-cell lymphoma. **Haematologica**, **91**: 687-90, 2006.

WILSON, K.; SEHN, L.; BERRY, B.; et al. CHOP-R therapy overcomes the adverse prognostic influence of BCL-2 expression in diffuse large B-cell lymphoma. **Leuk. Lymphoma**, **48**: 1102-9, 2007.

WINTER, J.; WELLER, E.; HORNING, S.; et al. Prognostic significance of Bcl-6 protein expression in DLBCL treated with CHOP or R-CHOP: a prospective correlative study. **Blood**, **107**: 4207-13, 2006.

WONG, K.; PREPAGERAN, N.; PEH, S. Prognostic subgroup distribution in diffuse large B-cell lymphoma of the upper aerodigestive tract. **Pathology**, **41**: 133-9, 2009.

YAMAGUCHI, M.; NAKAMURA, K.; SUZUKI, R.; et al. De novo CD5⁺ diffuse large B-cell lymphoma: results of a detailed clinicopathological review in 120 patients. **Haematologica**, **93**: 1195-202, 2008.

YAMAGUCHI, M.; SETO, M.; OKAMOTO, M.; et al. De novo CD5⁺ diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 109 patients. **Blood**, **99**: 815-21, 2002.

YUEN, A.; JACOBS, C. Lymphomas of the head and neck. **Semin. Oncol.**, **26**: 338-45, 1999.

ZUCCA, E.; ROGGERO, E.; BERTONI, F.; et al. Primary extranodal non-Hodgkin's lymphomas. Part 2: Head and neck, central nervous system and other less common sites. **Ann. Oncol.**, **10**:1023-33, 1999.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA**LIGA BAHIANA CONTRA O CÂNCER**

026/08

Salvador, 14 de julho de 2008.

Dra. Iguaracyra Barreto Oliveira
Dr. Marinho Marques da Silva Neto

Senhores,

Informamos a V.S.as. que o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Aristides Maltez, após análise de suas pendências, decidiu aprovar sem restrições o Projeto de Pesquisa Intitulado **“Significados Prognósticos da Expressão de p53 EBV e Marcadores de Centro Germinativo nos Linfomas Difusos de Grandes Células B Tonsilares”** Protocolado no CEP sob n.º 185/07, em reunião ocorrida na data de 30 de junho de 2008.

Atenciosamente,

Marinho Marques da Silva Neto
Presidência
Comitê de Ética em Pesquisa
LBCC/HAM

lsj

APÊNDICE A**FICHA PARA INQUÉRITO CLÍNICO**

Nº. _____

DADOS DO PACIENTE

Iniciais: Idade (diagnóstico Inicial): Registro:

Nome completo:

Sexo: Data do diagnóstico inicial:

Nº. biópsia: Nº. IHQ:

Diagnóstico anátomo-patológico:

Diagnóstico após IHQ:

Anticorpos utilizados:

CD3	CD45	CD20	CD30	CD34	CD10	Bcl2	Bcl6	MUM1	p53	CD79a	Ki67

Outros anticorpos:

Hibridização para EBV:

DADOS DA DOENÇA

Estadiamento:

Sintomas B?

Acomete sítio extranodal?

Estado geral:

Parâmetros laboratoriais: (Com datas)

Ht: Hb: Leuco: Linf: Líquor:

LDH: Alb: Sorologias: HIV HTLV Hep B Hep C

Outros exames: (Com datas)

Rx:

TC:

US:

Biópsia de medula óssea:

Tratamento:

Radioterapia: Início-

Fim-

Quimioterapia: Início-
 Protocolo utilizado:
 Cirurgia:

Fim-
 Nº. de ciclos:

Evolução: Remissão?

Parcial ou completa?

Refratário ao tratamento?

Recidiva?

Quando?

Última consulta:

ESTADO ATUAL

Vivo com remissão completa () Vivo com doença ()

Óbito: Devido à doença () Outra causa () Qual?

Data do óbito:

Perda de seguimento?

Se sim, data da última avaliação:

OBSERVAÇÕES

APÊNDICE B**LINFOMA NODAL – NÚMERO DE MICROVASOS/CAMPO (C)**

Caso	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	Média
113/99	5	6	7	6	7	5	8				6.3
162/00	12	9	9	8	9	11	7	9	10	6	9
01/001	12	9	13	9	6	8	8	7	10	10	9.2
206/01	10	9	9	11	13	14	12	14	9	11	11.2
445/01	#										
665/01	8	4	8	5	9	6	7	6	7	7	6.7
116/02	9	8	12	5	8	8	9	11	5	8	8.3
816/02	10	8	6	5	7	8	9	9	5	8	7.5
820/02	16	19	26	17	14	12	16	17	22	18	17.7
960/02	14	6	9	8	12	9	14	10	11	11	10.4
267/03	5	5	6	12							7
366/03	9	9	10	12	11	9	11	14	8	7	10
1049/03	9	9	7	13	8	9	7				8.9
334/04	10	10	12	7							9.8
373/04	8	10	10	7	11	12	9	8	7	10	9.2
146/05	11	13	6	10	10	18	14	7	6	9	10.4
24/005	9	7	4	4	8	7					6.5
135/06	15	16	7	14	5	10	9	10	14	11	11.1
184/06	10	8	7	10	8	8	14	14	11	7	9.7

LINFOMA TONSILAR – NÚMERO DE MICROVASOS/CAMPO (C)

Caso	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	Média
567/03	11	13	15	11	13	12	11	7	10	10	11.3
486/08	9	8	9	9	11	14	8	16	13	14	11.1
119/00	5	5	7	7	7	9					6.7
122/00	9	9	10	11	13	9	6				9.6
141/00	9	9	6	7							7.8
148/00	12	14	14	10							12.5
246/00	11	7	8	7							8.3
35/01	30	33	20	26	22	34	23	28	29	18	26.3
49/01	7	7	9	6	9						7.6
198/01	10	12	5	7	12	7	10	17	11	19	11
740/02	#										
570/02	19	7	18	9	9	16	12	11	16		13
723/02	6	6	7	4	7	8					6.3
877/02	14	9	7	8	9	8	9	7			8.9
11/003	#										
526/03	30	34	14	16	18	18					21.7
653/04	16	13	10	13	15	11	13	15	16	16	13.8
1106/04	16	14	18	19	13	16	15	18			16.1
403/05	16	7	11	10							11
627/05	10	6	5	6	6	7	9				7
693/05	10	14	12	8	8						10.4
92/06	*										
696/06	#										
20/007	16	18	4	9	16	19	15	18	22	20	13.9

* Material com alteração vascular secundária a ulceração e exíguo. # Material exíguo.

APÊNDICE C

LINFOMA TONSILAR

Nº	IHQ	Linfócito	CD20	MIB1	CD10	Bcl-2	Bcl-6	MUM1	CD5	p53	Perfil	EBER 1:2	LDH	IPI
1	567:03	680	Pos	90%	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	CG	Neg	298	1
2	486:08	1320	Pos	60%	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	nCG	Neg	256	0
3	119:00	1190	Pos	60%	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	nCG	Neg	460	2
4	122:00	1400	Pos	60%	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	nCG	Neg	449	0
5	141:00	2380	Pos	80%	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	nCG	Neg	517↑	1
6	148:00	2132	Pos	50%	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	CG	Neg		
7	246:00	2320	Pos		Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	CG	Neg	312	1
8	35:01	1536	Pos	100%	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	CG	Neg	259	1
9	49:01	553	Pos	30%	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	nCG	Neg	437	1
10	198:01		Pos	60%	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	nCG	Neg		
11	740:02	1518	Pos		Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	nCG	Neg	560↑	1
12	570:02	2627	Pos	50%	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	CG	Neg	363	1
13	723:02	1692	Pos	70%	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	nCG	Neg		
14	877:02	2970	Pos	80%	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	nCG	Neg	Normal	3
15	11:03	1860	Pos		Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	CG	Neg		
16	526:03	387	Pos	60%	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	nCG	Neg	377	1
17	653:04	2232	Pos	80%	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	nCG	Neg	375	2
18	1106:04	3922	Pos	60%	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	CG	Neg	253	0
19	403:05	354	Pos	50%	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	nCG	Neg		
20	627:05	2254	Pos	60%	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	nCG	Neg	117	0
21	693:05	2109	Pos		Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	CG	Neg	155	0
22	92:06	2100	Pos		Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	CG	Neg	289	1
23	696:06	2940	Pos	80%	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	nCG	Neg	138	1
24	20:07		Pos		Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	CG	Neg		

LINFOMA NODAL

Nº	IHQ	Linfócito	CD20	MIB1	CD10	Bcl-2	Bcl-6	MUM1	CD5	p53	Perfil	EBER1:2	LDH	IPI
1	113:99	3822	Pos	90%	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	nCG	Neg	790↑	1
2	162:00	2160	Pos	60%	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	nCG	Neg	352	1
3	01:01	1349	Pos	40%	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	CG	Neg	334	2
4	206:01	2430	Pos		Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	nCG	Neg	389	0
5	445:01	1365	Pos	75%	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	CG	Neg	589↑	2
6	665:01	620	Pos	90%	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	nCG	Neg	356	1
7	116:02	2142	Pos	80%	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	CG	Neg		
8	816:02	901	Pos	80%	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	nCG	Neg	356	2
9	820:02	1920	Pos	90%	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	nCG	Neg	1102↑	2
10	960:02	1178	Pos	80%	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	nCG	Neg	384	0
11	267:03	1152	Pos	80%	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	nCG	Neg	493↑	3
12	366:03	2268	Pos	80%	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	nCG	Neg	181	0
13	1049:03	822	Pos	90%	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	nCG	Neg	931↑	1
14	334:04	1824	Pos	50%	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	nCG	Neg	529↑	1
15	373:04	1638	Pos	100%	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	CG	Neg	351	0
16	146:05	850	Pos		Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	nCG	Neg	953↑	1
17	24:05	2842	Pos	80%	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	CG	Neg	720↑	1
18	135:06	200	Pos	80%	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	CG	Neg	291	1
19	184:06	2016	Pos	70%	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	nCG	Neg		

LEGENDA: Nº: número; IHQ: imuno-histoquímica; LDH: desidrogenase láctica; IPI: Índice Prognóstico Internacional; Pos: positivo; Neg: negativo; CG: centro germinativo; nCG: não-centro germinativo; ↑: elevado em relação ao valor de referência.