

Francisco José Penteado [Aranha 7/10/14

---

**IMUNOPEROXIDASE NOS LINFOMAS NÃO HODGKIN  
DIAGNOSTICADOS NA UNIVERSIDADE ESTADUAL  
DE CAMPINAS**

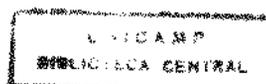
---

Orientador : Prof. Dr. José [Vassallo t.

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências  
Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para  
obtenção do Título de Mestre em Clínica Médica

Campinas

1995



## AUSÊNCIA

*Por muito tempo achei que a ausência é falta  
E lastimava, ignorante, a falta.  
Hoje não a lastimo.  
Não há falta na ausência.  
Ausência é um estar em mim.  
E sinto-a tão pegada, aconchegada nos meus braços  
Que rio e danço e invento exclamações alegres.  
Porque a ausência, esta ausência assimilada,  
Ninguém a rouba mais de mim.*

Carlos Drummond de Andrade

*Com o pensamento  
em Veruca*

*Para Daniel, Isabela e Mateus*

## **Agradecimentos**

*Ao Prof. Dr José Vassallo que, mais que um orientador, foi um grande amigo, dando o apoio necessário nas horas mais difíceis da realização deste trabalho.*

*Nosso reconhecimento à Prof. Dra. Irene Lorand-Metze, pioneira em nosso Serviço na utilização e divulgação da classificação de Kiel e uma das grandes estimuladoras do proveitoso contato anátomo-clínico.*

*Aos professores da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia, Prof. Dr. Cármino Antonio de Souza, Prof. Dr. Fernando F. Costa, Prof. Dra. Sara T. O. Saad, Prof. Dra. Joyce Maria A. Bizzacchi, pelas facilidades dadas à realização deste trabalho.*

*Às biólogas, Cida e Aglaê, pelo trabalho de arqueologia dos blocos de parafinas e também pela realização dos cortes histológicos e das colorações de rotina.*

*A todos do Laboratório de Patologia Experimental, Glauce, Sílvia, Vanda, Paulo, Cristiano e Rose, por toda ajuda na elaboração deste trabalho e pelos grandes ensinamentos dados a mim e também pelos ótimos períodos da realização das reações de imunoperoxidase. À Iara e à Marina, por realizarem comigo as primeiras reações.*

*Aos meus colegas, mais que colegas, amigos, Valder, Afonso e Carmen, que sempre aguentaram meu mau humor, minhas manias e chatices, meu muito obrigado. À Malu, grande parceira dos plantões de segunda-feira, pelas conversas sobre as nossas teses. À Simone pela grande disponibilidade na primeira correção do português.*

*Aos colegas médicos que tiveram uma grande paciência, oferecendo apoio em todos os momentos difíceis desta tese.*

*À ajuda inestimável da minha grande amiga, em todos os sentidos, Malu, que realizou a arte final, linda, desta dissertação.*

*Aos meus grandes amigos Edmilson, Bibia , Helô, Cris, Sérgio, Carlos, Gil, Dedé, Marcelo, Cassiano, Babil, Veroca, Zaldo, Verônica, Vera, Ciça, Fernando Arthur, Fernando Assoni, Nilson, Fernandinho, Rodrigo, Jarder, Rebeca, Ticha, Chico, Anette, Lú, Biaçicha, Tomás, Nina, Douglas, Plínio, Mariangela, Bia, Helena, Selma, Marina, Marcos, Paulo Freire, Tuco, Beto & Cia., Maurício.*

*Nunca faria esta tese sem ter por perto uma grande teia de Aranha. A todos vocês, Gessy, Maia, Bolão e Carminha, Rema, Lena, Rica e Pat, Pituca e Diana, Finho, Mari, Luli, Gu, Júlia, Joana, Gui, Beatriz, grande Antônio, muitíssimo obrigado, até a próxima.*

*Por último ao chefe do clã Aranha, Zéquita, meu pai, que durante anos tentou mostrar-me as delicias do estudo e não aquele realizado nas vitrines. É, Zéquita, acho que demorou, mas aprendi que até as coisas áridas têm o seu encanto e humor. Esta tese deve-se principalmente a você, que me deu grandes toques na vida e na profissão.*

## ÍNDICE

	pg
INTRODUÇÃO.....	1
Classificação dos Linfomas Não-Hodgkin.....	3
As Bases Imunológicas das Classificações Modernas dos Linfomas Não-Hodgkin.....	5
OBJETIVOS.....	10
CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	11
Técnica de Imuno-Histoquímica.....	12
RESULTADOS.....	18
DISCUSSÃO.....	36
Classificação dos Linfomas Não-Hodgkin.....	36
Reação de Imunoperoxidase.....	42
CONCLUSÕES.....	51
RESUMO.....	52
SUMMARY.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
ANEXOS.....	i

## **INTRODUÇÃO**

Os linfomas não-Hodgkin abrangem um grupo de diversas entidades com características biológicas, clínicas e patológicas próprias, não se tratando, portanto, de uma única doença. São definidos como um grupo de neoplasias heterogêneas do sistema imune que apresentam comumente um componente monoclonal constituído por um acúmulo desorganizado e progressivo de um clone de células linfóides, em consequência a alterações que se processam no genoma das células.

Nos estados de desordem imunológica, quer hereditária, quer adquirida, acredita-se que os linfomas não-Hodgkin desenvolvem-se pelo aparecimento de um clone de células anormais ou por alterações no controle da ativação dos linfócitos. Há na patogênese dos linfomas não-Hodgkin pelo menos três fatores responsáveis que podem ocorrer isoladamente ou associados: 1) vírus de Epstein-Barr (EBV) e do linfoma ou leucemia de células T humano (HTLV1); 2) defeitos na imuno-regulação do hospedeiro levando a um desequilíbrio na produção das citocinas; e 3) alterações genéticas que promovem um novo arranjo dos genes de imunoglobulina e dos receptores das células T durante a linfopoese ( HOOVER & FRAUMENI, 1973; PERRY et al., 1980; KINLEN, 1982; KINLEN, 1985; MORREL CROMARTIE & SWIFT, 1986; CUNNIGHAM-RUNDLES et al., 1987; FILIPOVICH et al., 1992; MAGRATH, 1992 ).

Há uma incidência maior de linfomas não-Hodgkin em pacientes com deficiências imunológicas, tanto congênitas, quanto adquiridas. É o que se constata, por exemplo, em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), com doenças do tecido conectivo (síndrome de Sjögren, artrite reumatóide) e naqueles submetidos a terapias imunossupressoras utilizadas no tratamento da rejeição a transplantes, principalmente nos transplantes renais. Nestas situações, aumenta a incidência de linfomas não-Hodgkin que podem não apresentar um componente monoclonal mas, assumirem características policlonais ( HOOVER & FRAUMENI, 1973; PERRY et al., 1980; KINLEN, 1982; KINLEN, 1985; MORREL CROMARTIE & SWIFT, 1986; CUNNIGHAM-RUNDLES et al., 1987; FILIPOVICH et al., 1992; MAGRATH, 1992 ). Por este motivo, devemos, na definição dos linfomas não- Hodgkin, usar a expressão "comumente

apresentam um componente monoclonal" em lugar de "sempre apresentam um componente monoclonal".

Os linfomas e as leucemias constituem oito por cento das doenças malignas em pacientes do sexo masculino e sete por cento em paciente do sexo feminino em países do primeiro mundo ( LUKES & COLLINS 1975; BANKS, 1990; LESTER & ULTMANN 1990). Em 1991, nos Estados Unidos, foram diagnosticados 37000 casos novos de linfomas não-Hodgkin. Isto representou um aumento da incidência da doença em torno de 4% entre os homens e de 3% entre as mulheres em relação aos anos anteriores. São mais comuns entre indivíduos da raça branca que da raça negra. Neste ano, de 1991, o linfoma não-Hodgkin causou 19000 óbitos (BORING, SQUIRES & TONG, 1991; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1991; ZHENG et al., 1992).

Foi registrada uma frequência relativa de linfomas não-Hodgkin, entre os tumores malignos, de 13,5% entre 1971-75 no Iraque; de 11,7% entre 1953-60 no Líbano; de 10,3% entre 1979-84 na Arábia Saudita; de 8,4% entre 1948-60 no Irã; de 2,3% entre 1973-75 na Índia, e de 1,9% Dinamarca entre 1968-76. Entre nós, em São Paulo, em 1973, a frequência relativa foi de 1,9% (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1982; TABRIZCHI, GUPTA & RAFFI, 1991). Nos dados brasileiros por BRUMINI (1982), as neoplasias linfóides ocupam o 7º e 6º lugares em ordem de frequência, respectivamente em homens e mulheres, com 4,8% e 2,1% das neoplasias malignas, excluídos os carcinomas de pele. A incidência relativa no Japão, China, Hong Kong e Tailândia de linfomas não-Hodgkin é em torno de 5,1% (KADIN et al., 1983).

A incidência dos linfomas não-Hodgkin nos Estados Unidos aumenta com a idade, atingindo principalmente os indivíduos que ultrapassaram os 55 anos. O aumento da incidência em pacientes do sexo masculino em torno de 75 anos, entre 1945 e 1990, foi de 300% a 400%. Em meados dos anos 80 houve um pico de incidência entre as pessoas da faixa etária de 25 a 44 anos, o que está provavelmente relacionado à SIDA (DEVESSA et al., 1987; NATIONAL CANCER

provavelmente relacionado à SIDA (DEVESSA et al., 1987; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1991). Não devemos nos esquecer, entretanto, que este aumento dos casos de linfomas não-Hodgkin se deve, em grande parte, ao aprimoramento do diagnóstico e possivelmente a um aumento à exposição ambiental a fatores ainda não totalmente conhecidos.

As manifestações clínicas dos linfomas não-Hodgkin são extremamente variáveis. Assumem desde formas indolentes, com sobrevida maior, até formas muito agressivas, rapidamente fatais. Praticamente todos os pacientes apresentam linfonodomegalia. Massas tumorais linfóide extra-nodais surgem em mais ou menos 25 a 40% dos casos. Cerca de 20 a 30% dos pacientes podem apresentar sintomas gerais como febre, sudorese noturna ou perda de peso. Outros sintomas são mais raros, como a dor abdominal (9%), fadiga (8%), linfadenomegalia dolorosa (8%), sensação de mal estar (7%), disfagia (5%), tosse (4%), dor óssea (3%), edema (3%) e prurido (2%) (BANKS, 1990; JAFFE, 1990; LESTER & ULTMANN 1990; WEINSENBURGER, 1992).

A melhora da taxa de sobrevida em 5 anos é em torno de 50% entre os pacientes com linfomas não-Hodgkin em comparação com os dados do ano de 1970 (BORING, SQUIRES, TONG, 1991; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1991; ZHENG et al., 1992).

## **CLASSIFICAÇÃO DOS LINFOMAS NÃO-HODGKIN**

É interessante, a esta altura, nos referirmos aos pontos mais importantes da evolução de nossos conhecimentos sobre o assunto. Em meados do século passado, VIRCHOW criou os termos linfoma e linfossarcoma para as alterações sarcomatosas do tecido linfóide, diferenciando-os das leucemias. BILLROTH, em 1871, foi o primeiro a usar o termo "linfoma maligno". Em 1916, GHON & ROMAN descreveram alterações dos tecidos linfóides, abrangendo a maioria dos casos sob o diagnóstico reticulossarcoma. Reconheceram também a categoria dos linfomas foliculares. Nos anos de 1913 e 1914, EWING reconheceu estas alterações como entidades nosológicas

(LUKES & COLLINS, 1975; BANKS, 1990; LESTER & ULTMANN, 1990).

BRILL, em 1925, e SYMMERS, em 1927, descrevem a "hiperplasia folicular gigante", que denominaram "linfoma folicular ou nodular" (LUKES & COLLINS, 1975; BANKS, 1990; LESTER & ULTMANN, 1990).

Em 1927, ARESU e SCALABRINO identificaram a presença de fibras reticulares nos processos identificados como "reticulossarcoma". OBERLING, em 1928, denominou como "reticulossarcoma" tumores ósseos ou de medula óssea e dos linfonodos. Robb-Smith, em 1937, mudaram a designação do "reticulossarcoma linfoblástico" para "linfossarcoma linfoblástico" (LUKES & COLLINS, 1975; BANKS, 1990; LESTER & ULTMANN, 1990).

Em 1938, SHLESTRON descreveu o reticulossarcoma polimorfo celular, com aumento das células gigantes. GALL & MALLORY descreveram em 1947 os linfomas de células precursoras linfóides e os linfomas de células mais diferenciadas, designando-os de linfoma clasmatócitos. Entre 1930 e 1932, ROULET fez a primeira sistematização dos reticulossarcomas (LUKES & COLLINS, 1975; BANKS, 1990; LESTER & ULTMANN, 1990).

Em 1939, ROSSLE apresentou a primeira revisão sistematizada das alterações linfóides neoplásicas e observou que ocorriam em todas as idades, e com igual incidência entre homens e mulheres. Observou, ainda, que os sítios mais acometidos eram os linfonodos da cadeia cervical, atingindo até o anel de Waldeyer, mediastino, linfonodos abdominais e axilares. Observou que outras cadeias de linfonodos eram menos frequentemente acometidas (LUKES & COLLINS 1975; BANKS 1990; LESTER & ULTMANN 1990).

RAPPAPORT, em 1956, apresentou uma classificação dos linfomas não-Hodgkin, tendo sido o primeiro cientista que conseguiu uniformizar a sua nomenclatura, finalizando-a dez anos após, em 1966 (BANKS 1990).

Nos anos 70, novas classificações foram apresentadas, baseadas em novos conceitos de

imunologia. Destas, as duas mais importantes são a de LUKES-COLLINS (LUKES & COLLINS, 1975) e a de LENNERT, também conhecida como classificação de Kiel (LENNERT, STEIN & KAISERLING, 1975).

A classificação de Kiel separa os linfomas não-Hodgkin em alto e baixo grau de malignidade, através da observação histológica (LENNERT, 1978).

Em 1982, o Instituto Nacional do Câncer, dos Estados Unidos, realizou um estudo com os mais importantes sistemas de classificação existentes (Rappaport, WHO, Dorfmann, Lukes-Collins, Kiel), como tentativa de homogeneizar a nomenclatura dos linfomas não-Hodgkin. Propuseram uma formulação de trabalho para uso clínico (Working Formulation for Clinical Usage) para o diagnóstico dos linfomas não-Hodgkin. Os autores afirmaram que esta sistematização não era uma nova classificação mas sim, uma tentativa de se estabelecer relações entre os vários sistemas de classificação dos linfomas não-Hodgkin (ROSENBERG et al., 1982).

## **AS BASES IMUNOLÓGICAS DAS CLASSIFICAÇÕES MODERNAS DOS LINFOMAS NÃO-HODGKIN**

Relatos de estudos da resposta imune no tecido linfóide trouxeram um maior conhecimento da biologia dos linfócitos. As reações imunológicas possibilitam a diferenciação dos linfócitos e à formação de células especializadas em compartimentos especiais do tecido linfóide.

As células precursoras dos linfócitos B e T originam-se de uma célula precursora comum hematopoiética da medula óssea. Estas células precursoras linfóides ganham a circulação sanguínea e a seguir migram para os órgãos linfóides periféricos (linfonodos, baço) onde se diferenciam em células maduras e funcionais do sistema imune. A maturação dos linfócitos T ocorre na medula óssea (pré-tímicas) e no timo. A transição de linfócito T precursor para linfócito T periférico é caracterizada por meio da expressão de CD4 (linfócitos auxiliares e indutores) ou

CD8 (linfócitos citotóxicos e supressores) e as células denominadas de "natural killer" (NK). Quando há um estímulo antigênico, os linfócitos T periféricos são transformados, nos órgãos linfóides periféricos, em células chamadas de imunoblastos T e destas originam-se os linfócitos T de memória. As células efectoras da linhagem T sintetizam as citocinas.

Na medula óssea as células linfóides B imaturas (pré-B) apresentam três estágios de desenvolvimento: em um primeiro estágio, expressam cadeia pesada  $\mu$  em seu citoplasma; em um estágio mais diferenciado, célula pré B, expressam IgM em seu citoplasma, nas células B imaturas expressam tanto IgM quanto IgD em sua superfície. Os linfócitos B periféricos (B1) apresentam IgM de superfície. Após a estimulação antigênica, as células transformam-se em imunoblastos B ou formam os centros germinativos. Os centros germinativos apresentam células ativadas, os centroblastos, que se diferenciam em centrocitos, estes em linfócitos B de memória. A diferenciação final dos linfócitos B dá-se nas células plasmocitárias, que sintetizam as imunoglobulinas.

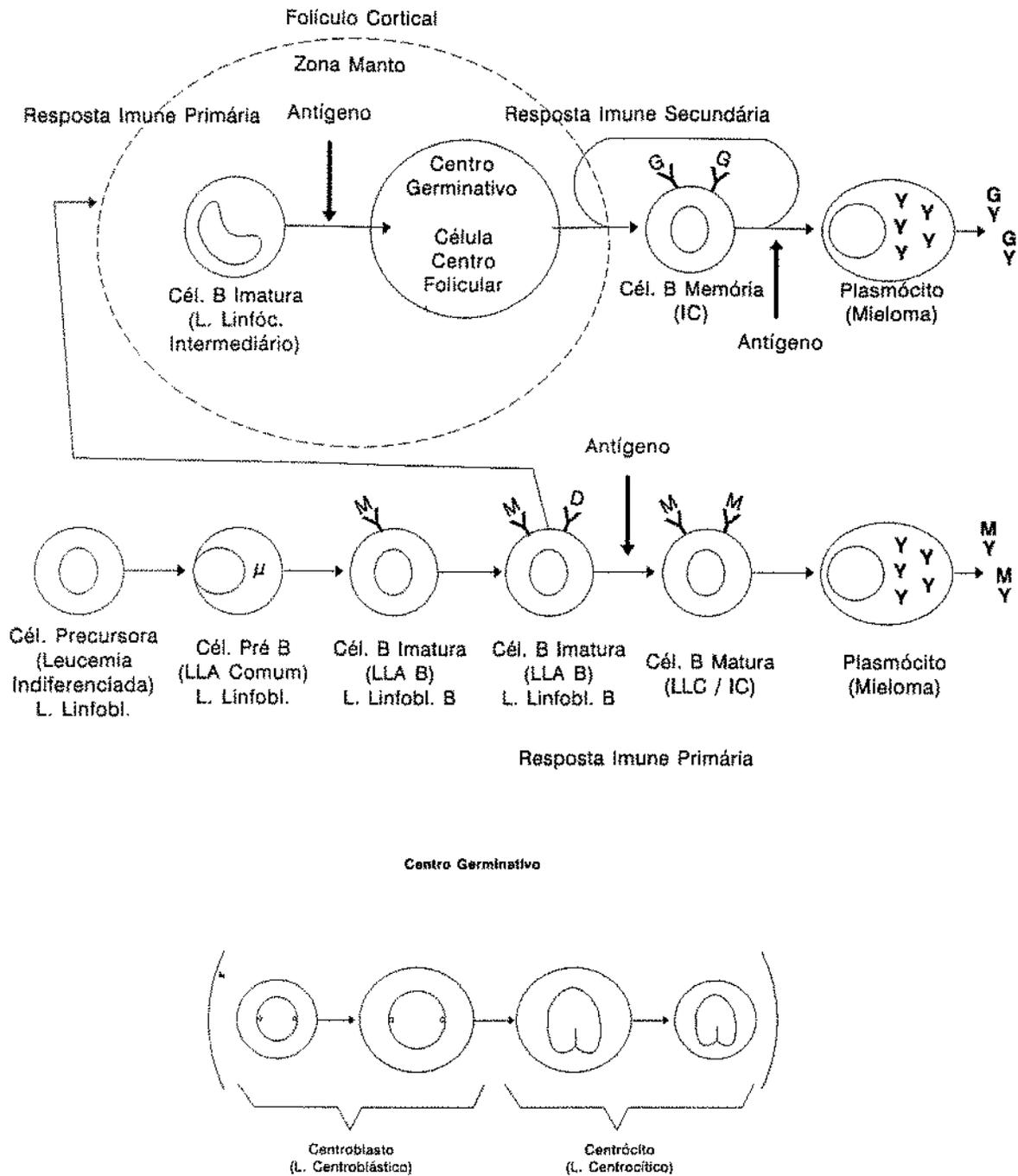
Os linfócitos, quando diferenciados, permanecem nestes órgãos linfóides, enquanto que uma porção retorna ao sangue periférico, fenômeno denominado como recirculação linfocitária.

Os linfomas não-Hodgkin originam-se destas células transformadas, acreditando-se que surjam por um mecanismo que provoca inibição em uma fase qualquer do processo de ativação dos linfócitos (CATOVVISKY, 1990; HALUSKA, TSUJIMOTO & CROCE, 1990; UCKUN, 1990; MAGRATH, 1990).

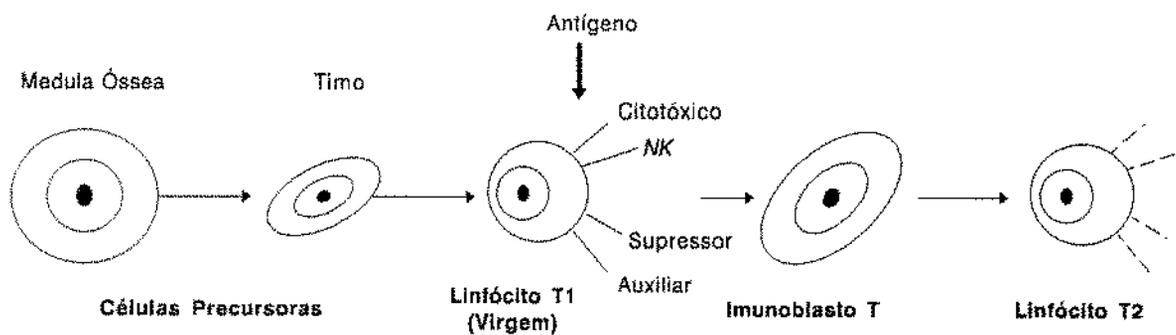
Os marcadores imunológicos definem a linhagem dos linfócitos B e T e também seu estado de diferenciação. Normalmente, são identificados na superfície celular. Na maioria das vezes, correspondem a receptores para antígenos: para o fragmento Fc das imunoglobulinas, para os fragmentos dos componentes do complemento, mitógenos, eritrócitos, vírus e para vários outros componentes. Outros marcadores são as moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (CMH) e outros são receptores de superfície e moléculas identificadas por anticorpos

monoclonais, cujas funções não são totalmente conhecidas. Em resumo, os receptores antigênicos funcionam como marcadores dos linfócitos B e T e também identificam-nos em suas diferentes fases de diferenciação (Figuras 1 e 2) (KLEIN I, 1990; KLEIN II, 1990; FREEDMAN, NADLER, 1991).

Para que possamos estabelecer um diagnóstico mais confiável dos linfomas não-Hodgkin, não podemos mais nos basear apenas na morfologia convencional. Devemos ter nos laboratórios de Anatomia Patológica de maior porte, o arsenal exigido pela técnica da imuno-histoquímica, com a qual é possível definir a linhagem celular de praticamente 95% dos casos de linfomas não-Hodgkin (LENNERT, STEIN & KAISERLING, 1975; ZAHM et al., 1990; JAFFE, 1990; SEGAL et al., 1991).



**Figura 1.** Representação esquemática da ontogenia dos linfócitos B, onde: cel. = célula; L. = linfoma; IC = imunocitoma, LLC = leucemia linfóide crônica; LLA = leucemia linfóide aguda; linfobl. = linfoblástico. Reproduzido e modificado de *Wensenburger DD, Linder J; Daley DT, Armitage JO, 1987*



**Figura 2.** Representação esquemática da ontogenia das células T, onde:  
*NK* = linfócito *Natural Killer*.  
 Reproduzido de *Lennert K, Feller AC, 1992*.

## **OBJETIVOS**

Uma adequada classificação histológica dos linfomas não-Hodgkin permite, além de uma conduta terapêutica mais adequada para um paciente individual, também a comparação dos resultados obtidos sobre respostas terapêuticas, intercorrências e sobrevida dos pacientes atendidos por diversos grupos médicos. São escassas as publicações em nosso meio que utilizam as classificações modernas dos linfomas não-Hodgkin e, mesmo assim, não fazem uso das mais recentes aquisições dos métodos imuno-histoquímicos, nem abordam os linfomas de células T em suas casuísticas (MACHADO, 1978). Objetivamos, portanto, fazer a revisão histológica dos casos de linfomas não-Hodgkin diagnosticados em nosso serviço entre janeiro de 1978 a dezembro de 1986, utilizando a classificação de Kiel e reações imuno-histoquímicas para fenotipagem dos linfomas em tecidos incluídos em parafina. Pretendemos, com o presente trabalho, obter informações e experiência para que futuros estudos clínico patológicos comparativos possam ser desenvolvidos e, com estes, obter o contínuo aprimoramento do diagnóstico e da terapêutica destes pacientes.

Um segundo objetivo, é um levantamento das características clínicas como a idade e o sexo e também a localização dos sítios primários dos linfomas-não Hodgkin extra-nodais.

## **CASUÍSTICA E MÉTODOS**

Por meio da revisão dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica da FCM - UNICAMP, nos anos de 1978 a 1986, foram levantados todos os casos diagnosticados como linfoma não Hodgkin.

Os dados clínicos, idade e sexo dos pacientes, foram retirados dos laudos das respectivas biópsias.

Os locais dos sítios primários dos linfomas não-Hodgkin estudados por nós também foram levantados dos laudos das respectivas biópsias, assim separamo-os em nodais e extra-nodais.

Todo material examinado havia sido enviado ao Departamento de Anatomia Patológica FCM - UNICAMP fixado em formalina a 10%, sendo submetido aos procedimentos para inclusão em parafina.

Foram feitas lâminas com cortes de biópsias de gânglios em torno de 5 micrômetros. Cada corte histológico recebeu as seguintes colorações: Hematoxilina e Eosina, Giemsa, reação do ácido Periódico de Schiff (PAS), e a impregnação argêntica para fibras reticulínicas pelo método de Gomori (LUNA, 1968).

Durante o período de estudo foram diagnosticados 191 casos de linfomas não-Hodgkin nesse departamento. Esta nossa revisão dos subtipos histológicos dos linfomas não Hodgkin ficou restrita a 98 casos (51,3%) de localização nodal. 73 casos (38,2%) eram linfomas não-Hodgkin extra-nodais (Tabela 1), sendo, 31 (42,5%) na medula óssea, 16 (21,8%) na pele, sete (9,6%) no trato-gastro intestinal, cinco (6,9%) na órbita ocular, três (4,1%) nos testículos, três (4,1%) no palato e oito (11%) em outras localizações. Além disto, 20 casos (10,5%) foram retirados do trabalho por não terem sido encontrados os blocos de parafina e as lâminas no arquivo do Departamento de Anatomia Patológica.

Dos 98 casos de linfomas não-Hodgkin linfonodais, nove casos (9,2%) foram excluídos por problemas técnicos: não foram encontrados os blocos de parafina e as lâminas destes casos eram

de péssima qualidade. Restaram, portanto, 89 casos de linfomas não-Hodgkin que foram avaliados e diagnosticados com a utilização dos métodos convencionais nos laboratórios de Anatomia Patológica: Hematoxilina-Eosina, Giemsa, reação de PAS e impregnação pela prata. Somente em 63 casos (71%) destes 89 realizamos o estudo imuno-histoquímico com os anticorpos monoclonais (DAKO) L-26 (CD20) e UCHL-1 (CD45RO), anticorpos monoclonais pan B e pan T, respectivamente. Em 26 casos (29%) não foi possível a localização dos blocos de parafina e, portanto, não foi realizado o estudo de imunoperoxidase (Tabela 1).

Cada corte histológico recebeu, ainda, as colorações pela técnica de imunoperoxidase pelo método da avidina biotina conjugada, descrita a seguir.

### **TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA**

A pesquisa dos antígenos de superfície dos linfócitos foi realizada segundo os procedimentos de imuno-histoquímica, por meio da técnica da avidina biotina-peroxidase, descrita por Hsu, Raine & Fanger em 1981.

A demonstração de antígenos em tecidos e células com a reação da imunoperoxidase é um processo que utiliza um anticorpo primário contra o antígeno a ser identificado e a visualização desta reação se faz por meio de um anticorpo secundário, via sistema enzimático cromogênico. Uma substância formadora de cor é adicionada e reage com a enzima peroxidase, precipitando-se no local da reação. A intensidade de coloração é proporcional à quantidade de antígeno presente. Os demais componentes tissulares serão visualizadas pela contra-coloração, normalmente com a hemotoxilina, que evidencia os núcleos celulares. Utilizamos três reagentes: os anticorpos específicos primários monoclonais CD20 (L26) e CD45R0 (UCHL-1), para identificar os antígenos de superfície dos linfócitos B e T, respectivamente; um anticorpo secundário capaz de ligar-se ao anticorpo monoclonal primário, sendo este anticorpo conjugado à biotina e ao complexo de peroxidase conjugado à avidina e biotina.

**Tabela 1.** Casuística geral dos 191 casos de linfomas não Hodgkin identificados no período do estudo.

	<b>% do N</b>	<b>Número de casos (%)</b>
<b>LNH Linfonodais</b>	<b>51,3%</b>	<b>98 (100)</b>
Retirados por Problemas Técnicos		9 (9,2)
Casos Restantes Avaliáveis		89 (90,8)
Casos com Imunoperoxidase		63 (71)
<b>LNH Extranodais e Casos Retirados do Estudo</b>	<b>48,7%</b>	<b>93</b>
Extra-Nodais	38,2%	73
Blocos ou Lâminas não encontrados	10,5%	20

LNH = Linfoma não-Hodgkin

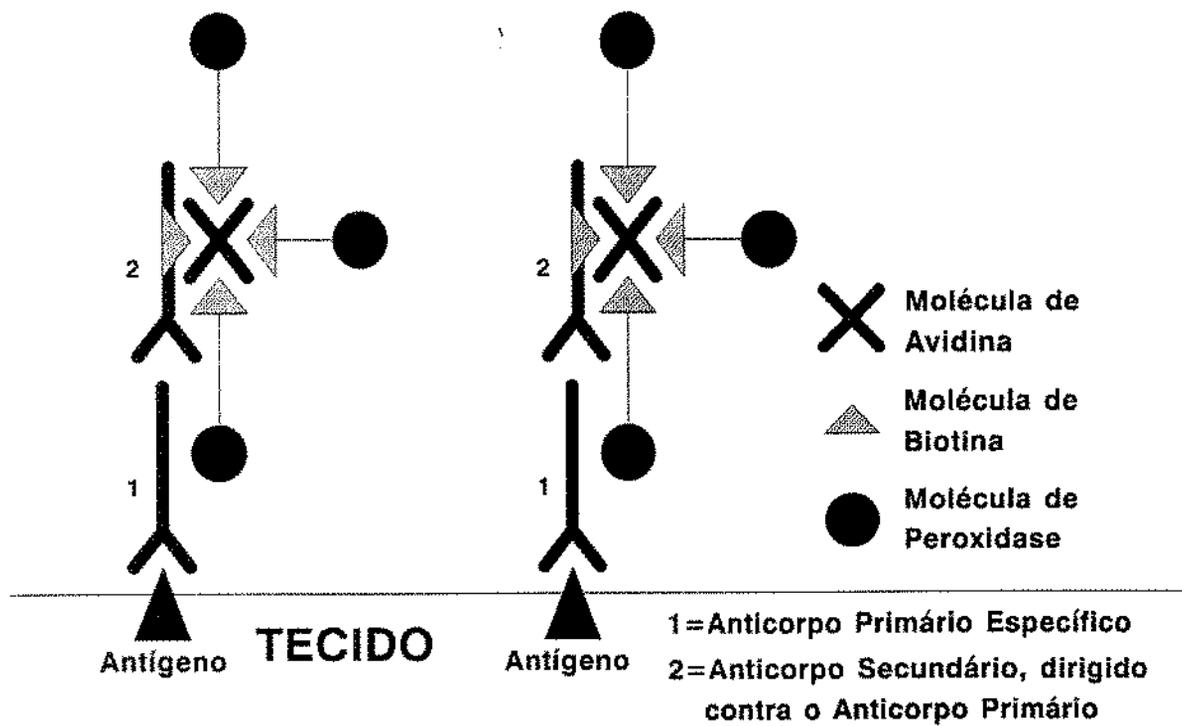
N = número total de casos

A avidina contém quatro sítios para ligação com a biotina, sendo que um deles vai ser ocupado pela biotina ligada ao anticorpo secundário e os outros três sítios serão acoplados ao complexo biotina-peroxidase da solução ( TAYLOR, 1978; HSU, RAINE, FANGER, 1981; FALINI & TAYLOR 1983;).

A reação de imuno peroxidase por meio do método da avidina biotina está representada esquematicamente na figura 3.

Sumariamente, assim procedemos à imuno-histoquímica:

- Cortes histológicos de 5 micrômetros foram colocados em lâminas desengorduradas e tratadas com solução aquosa de cola branca comum. As lâminas com cortes foram deixadas em estufa a 60<sup>o</sup> C, para melhor adesão dos mesmos, por 24 horas.
- Desparafinização dos cortes em banho de xilol a 60<sup>o</sup> C durante 15 minutos e dois banhos de xilol à temperatura ambiente durante 10 minutos cada banho.
- A hidratação foi feita em gradiente decrescente de álcoois à temperatura ambiente. Três banhos em álcool absoluto; um banho em álcool 80%; e um último banho em álcool 50%; a duração de todos banhos foi de dois minutos.
- Lavagem em água corrente por dois minutos e passagem em água destilada.
- A inibição da peroxidase endógena foi realizada por meio de um banho de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol, durante 15 minutos, à temperatura ambiente, seguindo-se lavagem em água corrente e água destilada e incubação em tampão PBS (Phosphate Buffer Saline, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,01M; NaCl 0,1M, pH 7,6).
- Exposição dos antígenos: por meio de dois banhos em tampão citrato pH 6, em forno de microondas a 70<sup>o</sup>C, por 5 minutos cada.
- Bloqueio das reações inespecíficas : O soro normal utilizado foi o de cavalo diluído a 1:10 e incubação durante 20 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. A seguir, retirou-se



**Figura 3.** Representação esquemática da reação de imunoperoxidase por meio do método da avidina biotina.

o excesso de soro normal, sem lavagem posterior.

- Reação antígeno-anticorpo primário: para identificação do antígeno específico. Foi realizada incubação com os anticorpos primários L26 e UCHL-1 (Dakopatts - Denmark, códigos M 755 e M 742, monoclonais, produzidos em camundongo), diluição 1:100 em BSA 0,1% (soro albumina bovino). Incubação durante duas horas à temperatura ambiente em câmara úmida. A seguir, foi retirado o excesso do anticorpo primário com três lavagens em PBS durante cinco minutos cada, à temperatura ambiente.
- Reação com o anticorpo biotilado, contra a cadeia pesada do anticorpo primário. Fez-se a incubação com anticorpo secundário durante 30 minutos em câmara úmida, à temperatura ambiente (anti-IgG de camundongo produzido em cavalo, Kit Vector, Vectastain, mouse, cod. PK 4002 - diluição 1:200 em tampão PBS).
- Três lavagens em PBS para retirada do excesso do anticorpo secundário biotilado, com duração de cinco minutos cada, à temperatura ambiente.
- Reação com o complexo avidina biotina peroxidase (complexo ABC) por meio da incubação com complexo ABC (Kit ABC Vector - Vectastain, anti mouse IgG - cód PK 4002 - diluição 1:200 em tampão PBS), durante 30 minutos em câmara úmida, à temperatura ambiente.
- Três lavagens em PBS, com duração de cinco minutos cada banho.
- A coloração foi realizada em solução de 40 mg de 3,3 tetra-hidroclorato de diaminobenzidina (DAB, Sigma nº. D 5637). em 100 ml de tampão PBS e 20 microlitros de peróxido de hidrogênio a 30% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).
- Lavagem em água corrente, seguida de passagem em água destilada.
- Contra coloração com hematoxilina de Mayer, durante um minuto à temperatura ambiente. Seguiu-se de lavagem em água corrente com cinco gotas de amoníaco para evidenciar a contra coloração (contraste). A seguir, lavagem em água corrente e passagem em água destilada.

- Desidratação dos cortes em gradiente crescente de álcoois, banhos de xilol e montagem dos cortes com laminulas de vidro aderidos com Entellan.

## **RESULTADOS**

Dos 89 casos de linfoma não-Hodgkin nodais estudados, diagnosticamos 49 (55%) e 40 (45%) casos como linfoma não-Hodgkin de alto e baixo grau de malignidade, respectivamente. A mediana das idades para os linfoma não-Hodgkin de alto e baixo grau de malignidade foi de 46 e 60 anos respectivamente. A relação entre sexo masculino e feminino foi de 1,5:1 para os linfomas não-Hodgkin de alto grau de malignidade e de 1,4:1 entre os linfomas não-Hodgkin de baixo grau de malignidade.

Dos 89 casos avaliados pelos métodos habitualmente utilizados pelos laboratórios de Anatomia Patológica e com as reações de imunoperoxidase obtivemos 72 casos (80,9%) diagnosticados como linfoma não-Hodgkin de células B e 12 casos (13,5%) como linfoma não-Hodgkin de células T. Os cinco casos (5,6%) restantes não puderam ser classificados como linfoma não-Hodgkin B ou T e foram considerados indeterminados quanto à sua origem celular.

Com o acréscimo da reação da imunoperoxidase às colorações habituais dos laboratórios de patologia, conseguimos definir a origem celular do linfoma não-Hodgkin em onze casos (12,4%). Em resumo: conseguimos definir 68 dos casos (76,4%) como provavelmente B ou T somente com as colorações habituais e 79 casos (88,8%) associando a estas colorações especiais, as reações de imunoperoxidase. Portanto, com esta técnica, conseguimos uma performance de 12,4% a mais nos diagnósticos dos linfomas não-Hodgkin (Tabela 2).

Dos 63 casos (70,8%) que foram submetidos ao estudo imuno-histoquímico, 46 (73%) revelaram-se positivos para o anticorpo monoclonal pan B CD-20 (L-26), seis (9,5%) revelaram-se positivos com anticorpo monoclonal pan-T CD-45RO (UCHL-1) e em 11 (17,5%) não houve reação com nenhum destes anticorpos. Os 11 casos, que não apresentaram reação com os anticorpos monoclonais, foram submetidos pelo menos duas vezes ao estudo imuno-histoquímico, sem resultados. O Gráfico 1 apresenta os casos positivos, negativos com as reações de imunoperoxidase para os dois anticorpos monoclonais, em relação a todos os casos estudados por nós.

**Tabela 2.** Frequência dos resultados obtidos com a Reação de Imunoperoxidase em 63 casos de linfoma não-Hodgkin (LNH)

	LNH B (72)	LNH T (12)	LNH I (5)
<b>LNH BG (40)</b>			
IMPX + (20)	LNH B = 19	LNH T = 1	
IMPX - (7)	LNH B = 5	LNH T = 1	provavelmente provavelmente
<b>LNH AG (49)</b>			
IMPX + (32)	LNH B = 27	LNH T = 5	
IMPX - (5)	LNH B = 3	LNH T = 1	provavelmente provavelmente
	LNH I = 1		

Os números entre parênteses representam o número de casos.

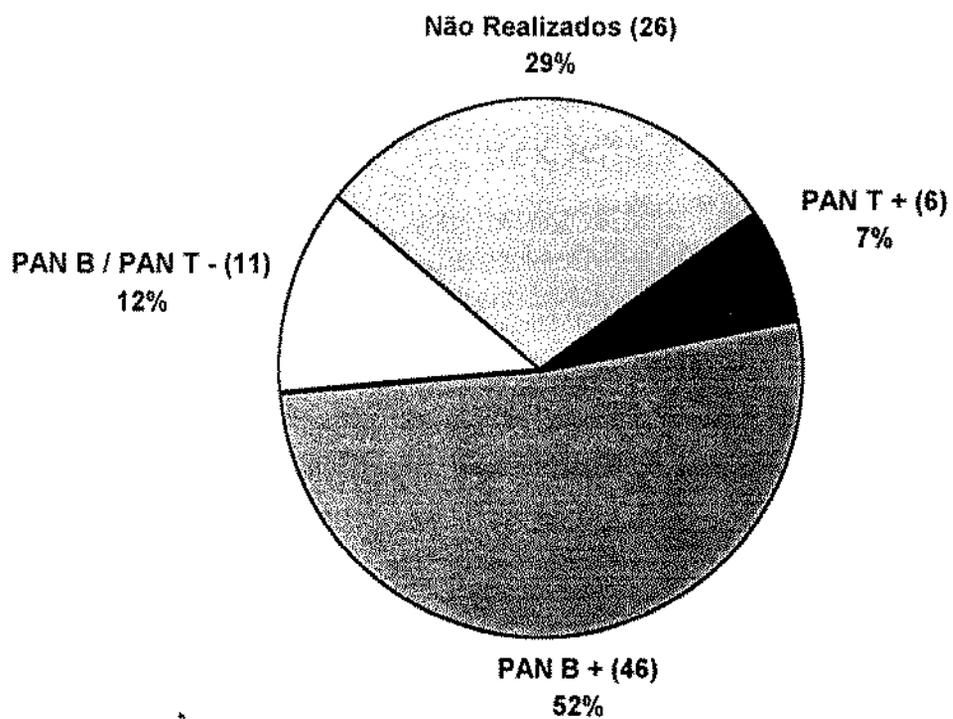
LNH = Linfoma não-Hodgkin

BG = Baixo Grau; AG = Alto Grau;

B,T,I = Linhagem B,T e Indeterminada

IMPX - = imunoperoxidase, sendo: + = reação positiva

- = reação negativa



**Gráfico 1.** Representação gráfica dos resultados da imunohistoquímica em relação aos 89 casos.

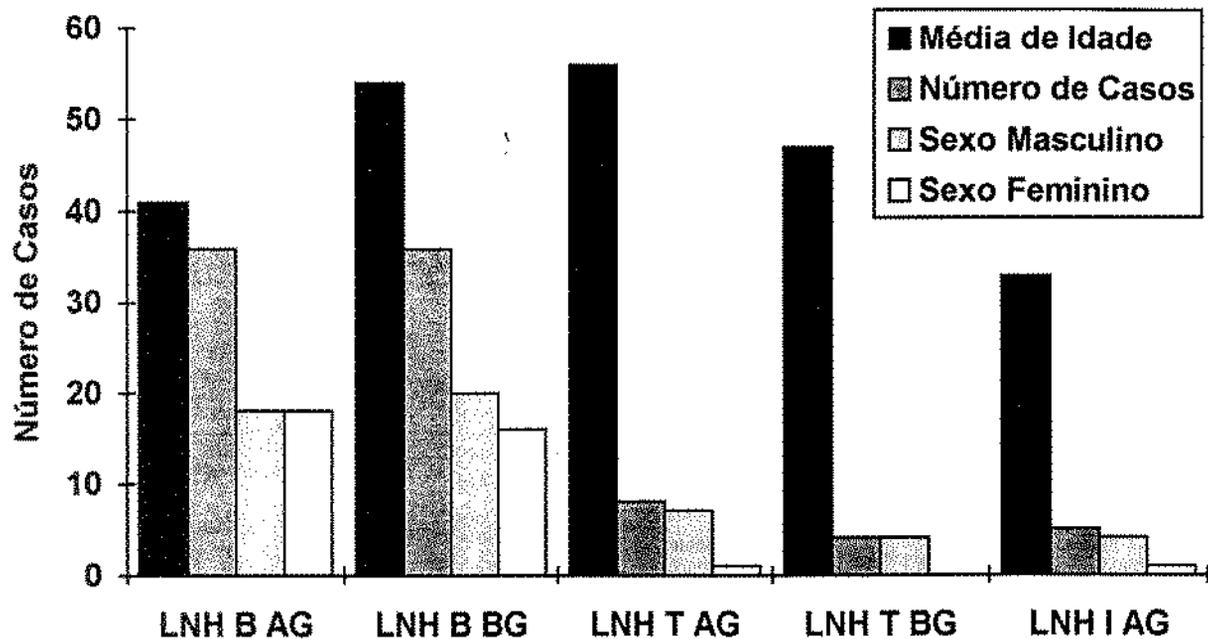
Entre os 11 casos que foram negativos para os dois anticorpos monoclonais, fizemos uma sugestão da origem, baseados apenas na morfologia: oito casos de linfomas provavelmente B, sendo três casos de alto grau de malignidade, dois definidos como centroblastico, um como imunoblastico provavelmente de origem B e cinco de baixo grau de malignidade, quatro definidos como imunocitoma, um como LLC de origem B. Houve dois casos de linfomas de provável origem T: um caso como T de baixo grau de malignidade e um como de alto grau. Um caso não foi definido como linfoma B ou T, denominado de indeterminado quanto à origem celular, e foi diagnosticado como linfoblástico.

Em 26 casos não realizamos as reações de imunoperoxidase; foram subclassificados quando possível somente pela morfologia. Obtivemos 14 casos de linfoma não-Hodgkin de baixo grau de malignidade. Deste 12 foram classificados como de origem B, 2 de origem T. Houve 12 casos de linfomas não-Hodgkin de alto grau de malignidade, sendo diagnosticados como de origem B 6 casos, de origem T 2 casos e 4 não foi possível determinar a linhagem do linfoma não Hodgkin.

Entre os 72 casos de linfomas não-Hodgkin B, 39 ocorreram em pacientes do sexo masculino e 33 em pacientes do sexo feminino. Dos 72, 36 casos (50%) foram de linfomas alto grau de malignidade, com uma mediana de idade de 46 anos e uma relação entre o sexo masculino e feminino de 1,3:1 e 36 casos (50%) de linfomas de baixo grau de malignidade, com uma mediana de idade de 61 anos. A relação entre os pacientes dos sexos masculino e feminino foi de 1,1:1 (Gráfico 2).

Diagnosticamos 12 casos de linfomas não-Hodgkin T com uma idade média de 50 anos, sendo 11 casos do sexo masculino e um caso do sexo feminino. Destes, quatro casos (33,4%) foram de linfomas de baixo grau com uma mediana de idade de 58 anos, todos do sexo masculino, oito casos (66,8%) foram de linfomas de alto grau com uma mediana de idade de 47 anos, sendo que sete ocorreram em pacientes do sexo masculino e um do sexo feminino (Gráfico 2).

Dos cinco casos indeterminados quanto à origem celular, quatro ocorreram em pacientes do sexo



LNH B AG = linfoma não-Hodgkin de alto grau de malignidade B

LNH B BG = linfoma não-Hodgkin de baixo grau de malignidade B

LNH T AG = linfoma não-Hodgkin de alto grau de malignidade T

LNH T BG = linfoma não-Hodgkin de baixo grau de malignidade T

LNH I AG = linfoma não-Hodgkin de alto grau de malignidade indeterminado

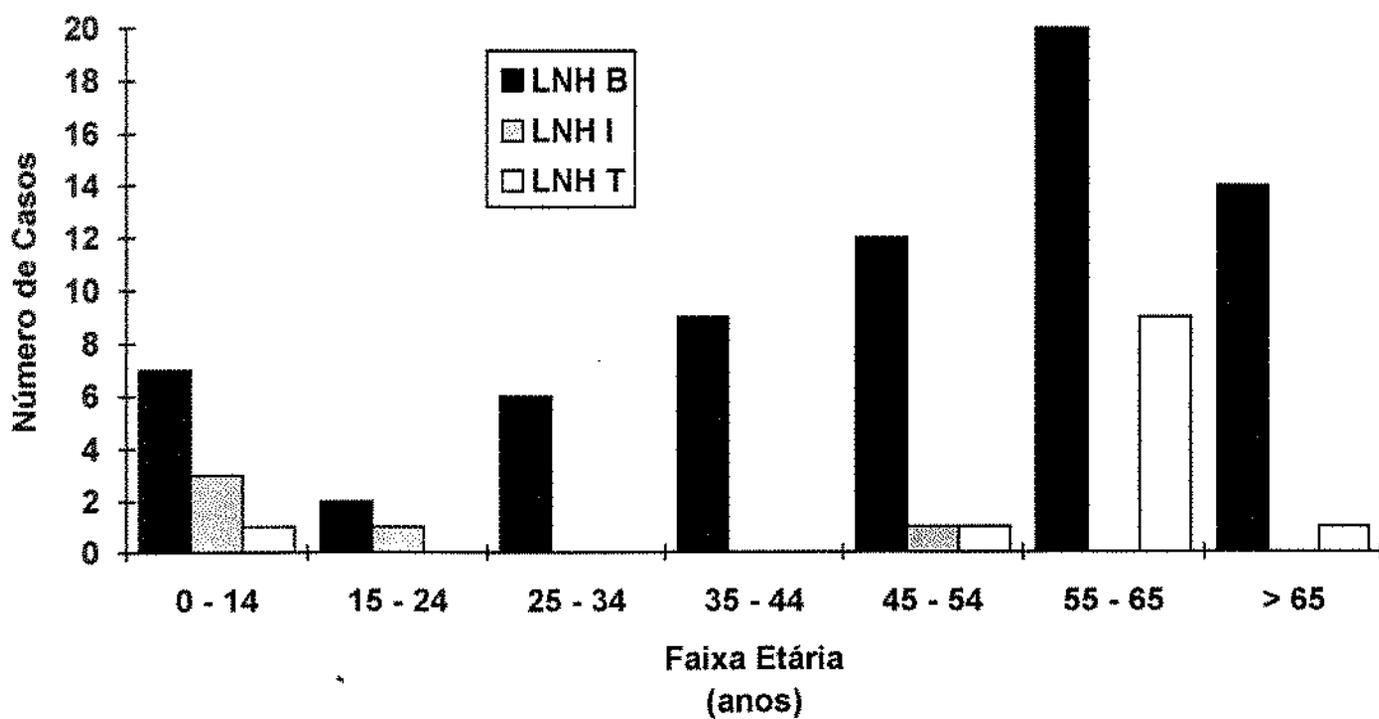
**Gráfico 2.** Distribuição das frequências dos linfomas não-Hodgkin de acordo com o grau de malignidade, a provável origem B ou T, a idade e o sexo em 87 casos estudados.

masculino e um em paciente do sexo feminino, com uma mediana de idade de 14 anos, todos casos foram de linfomas de alto grau de malignidade, classificados como linfoblástico (Gráfico 2).

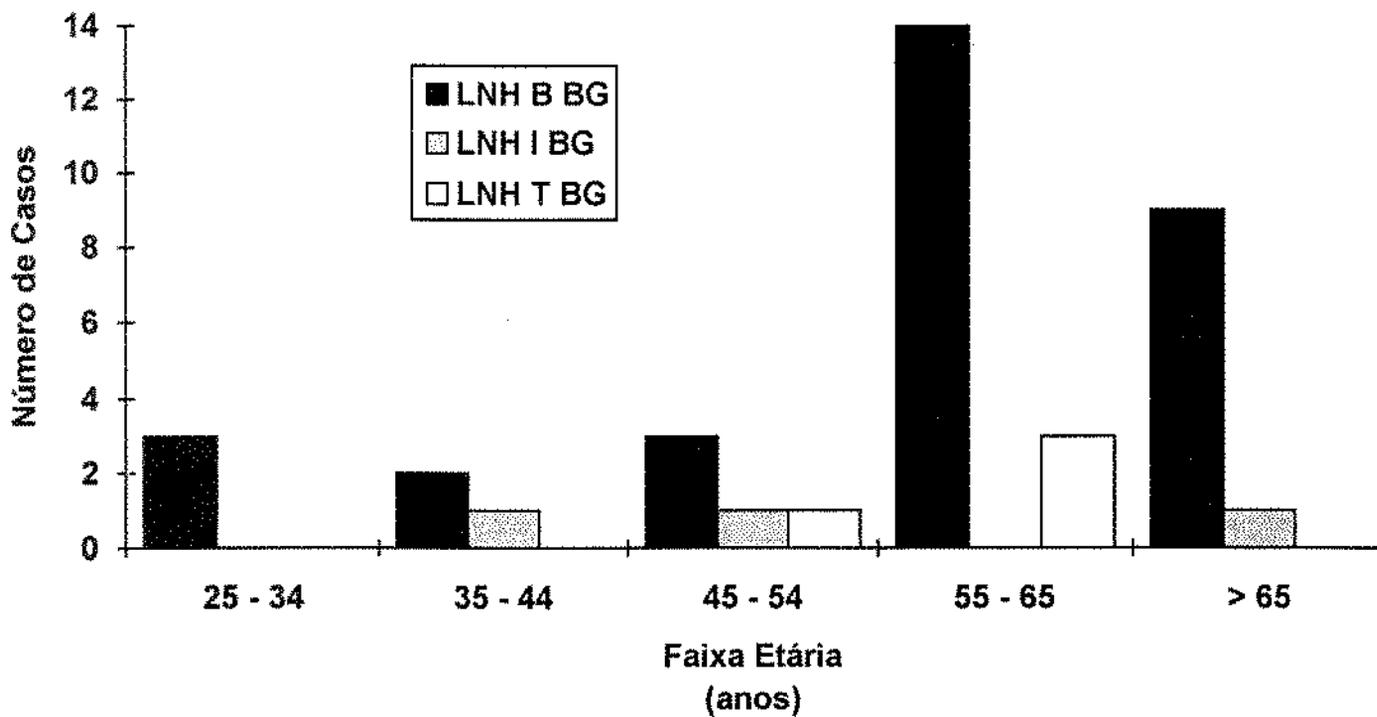
Dos 89 casos, em dois não havia referência à idade. Distribuímos os 87 casos restantes em sete faixas etárias, com extensão variável: 1) de 0 a 14 anos com 11 casos, sendo sete casos de linfomas não-Hodgkin B, um caso de linfoma não-Hodgkin T e três casos de linfomas não-Hodgkin indeterminados. Todos os 11 casos eram de alto grau de malignidade; 2) de 15 a 24 anos com três casos, sendo dois de células B e um caso de linfoma não-Hodgkin indeterminado. Os três casos foram de alto grau de malignidade; 3) de 25 a 34 anos com seis casos, todos de células B, dos quais três casos de alto grau e três de baixo grau de malignidade; 4) de 35 a 44 anos com nove casos, sendo nove de células B, dos quais seis de alto grau e três de baixo grau de malignidade; 5) de 45 a 54 anos com 14 casos, sendo 12 de células B, dos quais quatro de baixo grau de malignidade e oito de alto grau malignidade, um de células T de baixo grau de malignidade e um caso indeterminado de alto grau de malignidade; 6) de 55 a 65 com 29 casos, sendo 20 linfoma não-Hodgkin B, dos quais seis foram de alto grau de malignidade e 14 de baixo grau de malignidade, 9 casos de linfoma não-Hodgkin de células T, dos quais seis de alto grau e três de baixo grau de malignidade; 7) acima de 65 anos com 15 casos, sendo 14 de células B, dos quais dez de baixo grau de malignidade e quatro de alto grau de malignidade, um caso de linfoma de célula T de alto grau de malignidade (Gráficos 3,4,5).

Quando classificamos os 40 casos (45%) de linfomas não-Hodgkin de baixo grau de malignidade em subtipos, obtivemos os seguintes resultados: linfoma linfocítico (LLC): nove casos (22,5%), com uma idade média de 54 anos, cinco casos (55,7%) definidos como B e quatro casos (44,3%) como provável origem B. Deste nove casos, obtivemos cinco casos (55,6%) com reação positiva para o anticorpo monoclonal pan B; em dois casos (22,2%) as reações de imunoperoxidase foram negativas e em dois casos (22,2%) não foram realizadas (Tabela 3 e Figura 4).

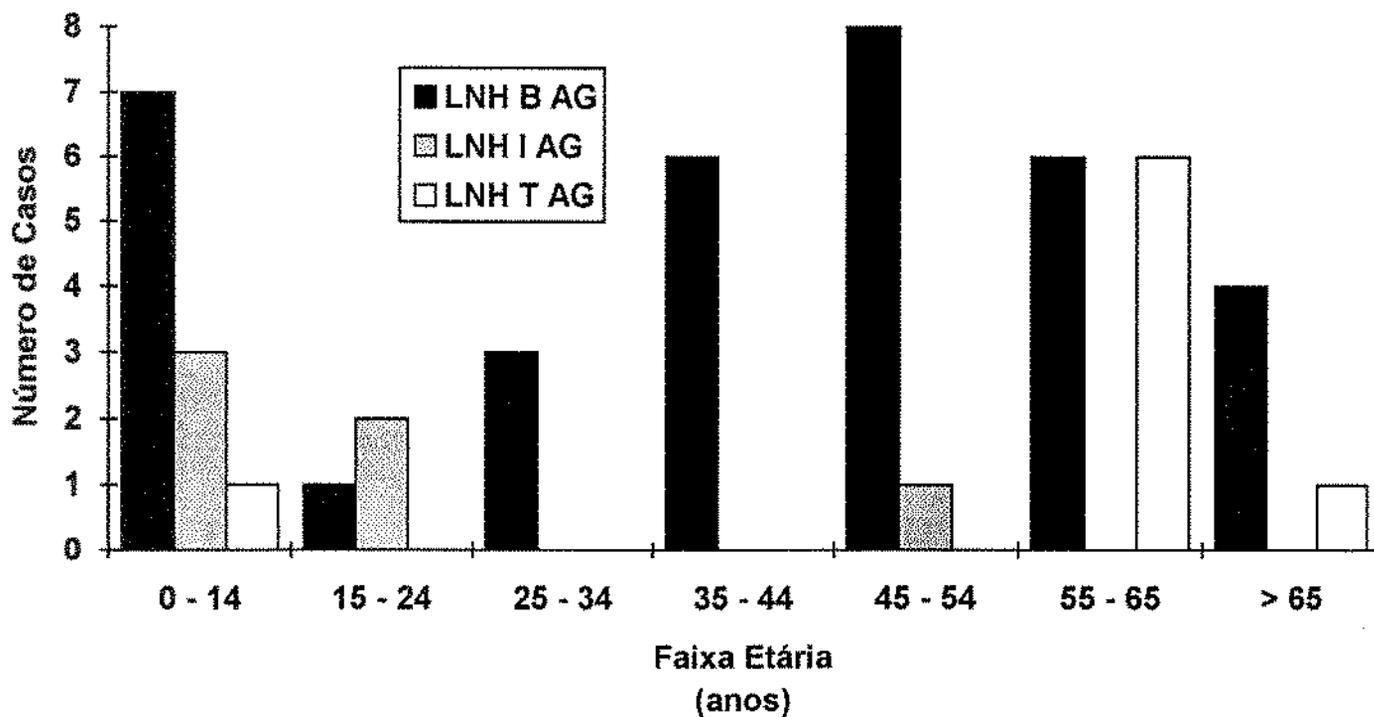
Diagnosticamos 13 casos (32,5%) de imunocitoma (IC); com a idade média de 59 anos. Destes, seis casos (46,2%) foram positivos para o anticorpo monoclonal pan B, em quatro casos (30,8%)



**Gráfico 3.** Distribuição das frequências de linfomas não-Hodgkin de provável origem B (LNH B), T (LNH T), indeterminado (LNH I) de acordo com a faixa etária em 87 casos estudados.



**Gráfico 4** Distribuição das frequências de linfomas não-Hodgkin de baixo grau de malignidade (LNH BG) de provável origem B, T ou indeterminado (I), de acordo com a faixa etária, em 87 casos estudados.



**Gráfico 5.** Distribuição das frequências de linfomas não-Hodgkin de alto grau de malignidade (LNH AG) de provável origem B, T ou indeterminado (I), de acordo com a faixa etária, em 87 casos estudados.

as reações de imunoperoxidase foram negativas e em três casos (23%) não as realizamos. Os linfomas não-Hodgkin imunocíticos foram classificados como linfoplasmocítico em quatro casos (30,8%), linfoplasmocitóide em cinco casos (38,4%), polimórfico em três casos (23,1%) e em um caso (7,7%) não conseguimos chegar à subclassificação (Tabela 3).

Com o diagnóstico de linfoma não-Hodgkin centroblástico-centrocítico (CB-CC) tivemos 12 casos (30%), com mediana da idade de 47 anos. Destes, oito casos (66,7%) foram positivos para o anticorpo monoclonal pan B e em quatro casos (33,3%) não realizamos as reações de imunoperoxidase. Entre estes, tivemos 10 casos foliculares e dois com crescimento nodular e difuso, sendo um destes com predomínio de centroblastos. Obtivemos dois casos diagnosticados como linfoma não-Hodgkin centrocítico difuso (CC/5%), com idade média de 60 anos; em nenhum destes casos as reações de imunoperoxidase foram realizadas (Tabela 3)

Identificamos, ainda, um caso (2,5%) de linfoma de baixo grau de malignidade de origem T em paciente com idade de 53 anos. As reações de imunoperoxidase não foram realizadas e também não conseguimos definir o subtipo do linfoma. Obtivemos dois casos (5%) de micose fungóide, com idade média de 60 anos; em um caso houve reação positiva ao anticorpo monoclonal pan T e em outro, não foram realizadas as reações de imunoperoxidase. Um caso de linfadenopatia angio imunoblástica (2,5%) em paciente com idade de 57 anos foi diagnosticado, sendo as reações de imunoperoxidase negativas (Tabela 3).

Quando classificamos os 49 casos (55%) de linfomas de alto grau de malignidade em subtipos, obtivemos os seguintes resultados: 23 casos (46,9%) definidos como linfomas centroblásticos, com uma mediana de idade de 48 anos, dos quais 16 (69,7%) com reação positiva para o anticorpo monoclonal pan B; em dois (8,7%) as reações imuno-histoquímicas foram negativas e em cinco casos (21,6%) não foram realizadas. Foram subclassificados histologicamente como polimórficos em 14 casos (60,9%), monomórficos em cinco (21,7%), centrocitóides em dois casos (8,6%). Em um caso (4,3%) definimos o linfoma centroblástico como multilobulado (Figura 5) e em outro (4,3%) como "de células em anel de sinete" (Figura 6 e Tabela 4).

Identificamos três casos (6,1%) como linfomas não-Hodgkin imunoblásticos, com mediana de idade de 57 anos. Um caso como de linhagem B, positivo para o anticorpo monoclonal pan B. Dois casos de origem provável B, um não apresentou positividade para as reações de imunoperoxidase e em outro não as realizamos (Tabela 4).

Diagnosticamos nove casos de linfomas não-Hodgkin linfoblásticos (18,4%), com mediana de idade de 16 anos. Destes obtivemos três casos de origem B (33,3%), um caso (11,1%) origem T e em cinco casos (55,6%) não foi possível determinar a linhagem. Entre os casos de linhagem não determinada não foram realizadas as reações de imuno-histoquímica em quatro casos e em um caso elas foram negativas para ambos anticorpos (Figura 7 e Tabela 4).

Obtivemos seis casos (12,2%) de linfomas não-Hodgkin, do tipo Burkitt, com mediana de idade de 28 anos. Todos os casos foram positivos para o anticorpo monoclonal pan B. Identificamos um caso de linfoma não-Hodgkin anaplásico B, em paciente de cinco anos de idade, com reação positiva ao anticorpo monoclonal pan B (Tabela 4).

Identificamos sete casos (14,3%) de linfoma T de alto grau malignidade. Destes, dois foram definidos como linfomas de alto grau pleomórficos, com idade de 62 anos. Em um caso tivemos reação de imunoperoxidase para o anticorpo monoclonal pan T positiva, em outro, não foram realizadas. Não subclassificamos morfológicamente cinco casos de linfoma de alto grau T (10,2%). Destes, obtivemos três (60%) positivos para a reação com anticorpo monoclonal pan T, em um (20%) as reações de imunoperoxidase foram negativas e em um outro (20%) elas não foram realizadas (Figura 8 e Tabela 4).

**Tabela 3.** Distribuição das frequências dos subtipos de linfomas não-Hodgkin de baixo grau de malignidade de acordo com os resultados obtidos com as reações imuno-histoquímicas realizadas.

Sub-Tipo	N (%)	PANB+	PANT+	PANB/T-	NR	Média de Idade
LLC	9 (22,5)	5	0	2	2	54
Imunocitoma	13 (32,5)	6	0	4	3	59
Centroblástico-						
Centrocitico	12 (30)	8	0	0	4	47
Centrocitico	2 (5)	0	0	0	2	60
Linfoma T de						
Baixo Grau	1 (2,5)	0	0	0	1	53
Micose Fungóide	2 (5)	0	1	0	1	60
LAAI	1 (2,5)	0	0	1	0	57
Total	40	19	1	7	13	

- PANB+ = Casos positivos com anticorpo monoclonal pan B (L-26)
- PANT+ = Casos positivos com anticorpo monoclonal pan T (UCHL-1)
- PANB/T - = Casos negativos com anticorpo monoclonal pan B e pan T
- NR = Casos em que não foram realizadas as reações de imunoperoxidase
- LLC = Leucemia Linfóide Crônica
- LAAI = Linfadenopatia Angioimunoblástica

**Tabela 4.** Distribuição das frequências dos subtipos de linfomas não-Hodgkin de alto grau de malignidade de acordo com os resultados obtidos com as reações imuno-histoquímicas realizadas.

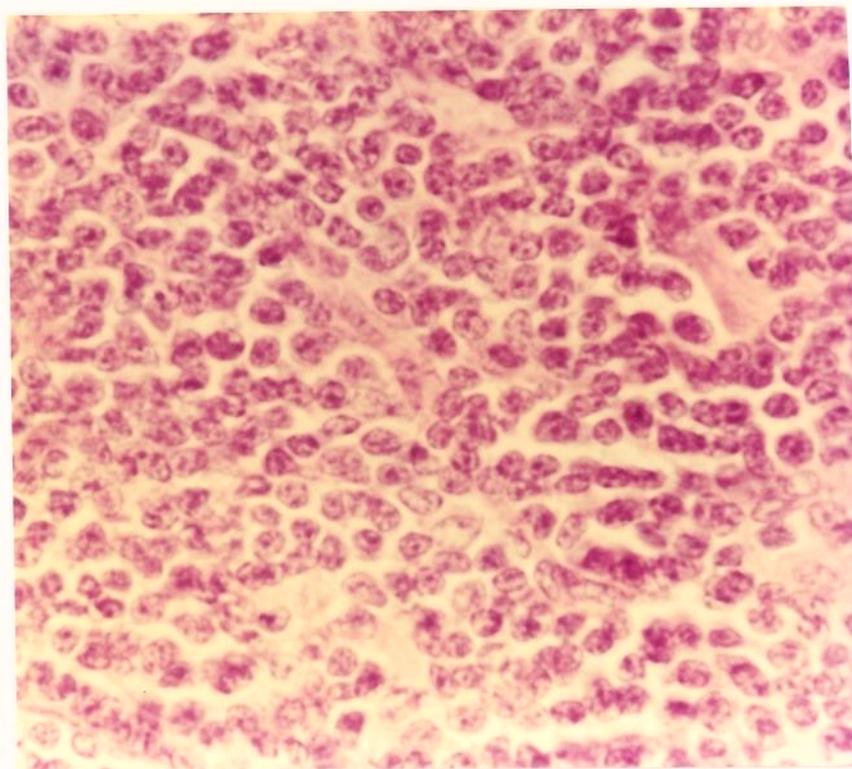
Sub-Tipo	N (%)	PANB+	PANT+	PANB/T	NR	Média de Idade
Centroblástico	23 (46,9%)	16	0	2	5	48
Imunoblástico	3 (6,1%)	1	0	1	1	57
Linfoblástico	9 (18,4%)	3	1	1	4	16
Burkitt	6 (12,2%)	6	0	0	0	28
Anaplástico	1 (2,0%)	1	0	0	0	5
Linfoma T						
Pleomórfico	2 (4,0%)	0	1	0	1	62
Linfoma T de						
Alto Grau	5 (10,2%)	0	3	1	1	52
Total	49	27	5	5	12	

PANB+ = Casos positivos com anticorpo monoclonal pan B (L-26)

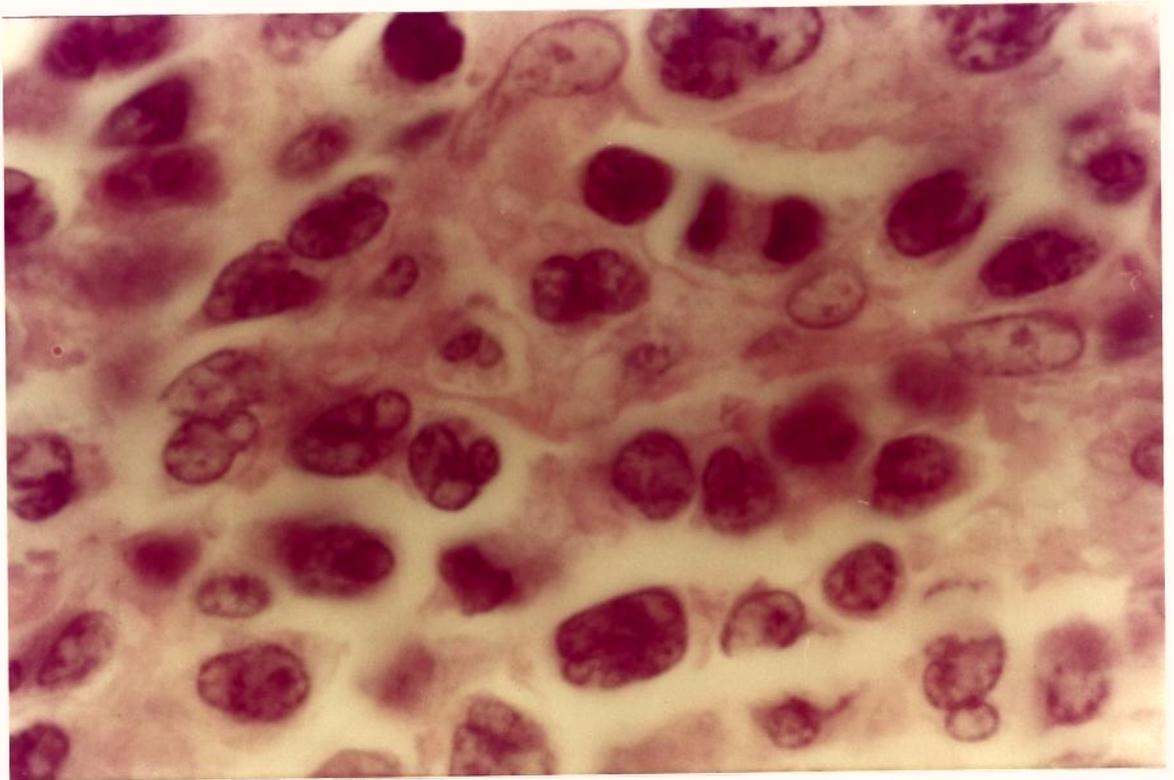
PANT+ = Casos positivos com anticorpo monoclonal pan T (UCHL-1)

PANB/T - = Casos negativos com anticorpo monoclonal pan B e pan T

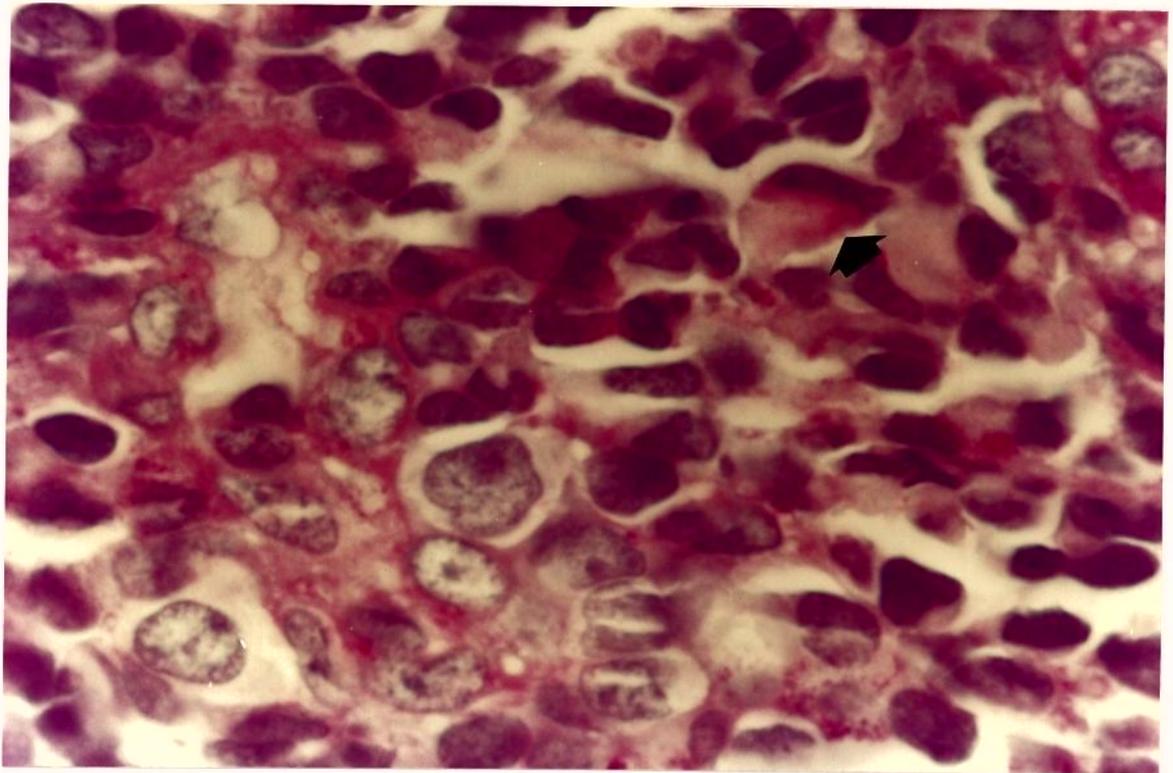
NR = Casos em que não foram realizadas as reações de imunoperoxidase



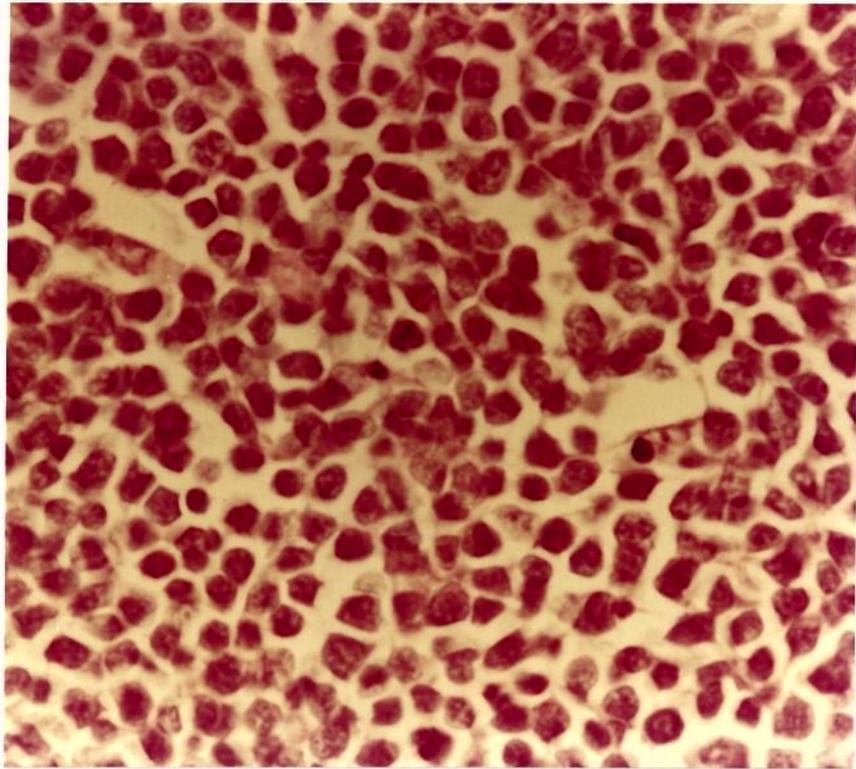
**Figura 4.** Linfoma linfocítico / Leucemia linfóide crônica. (HE, 528 x).



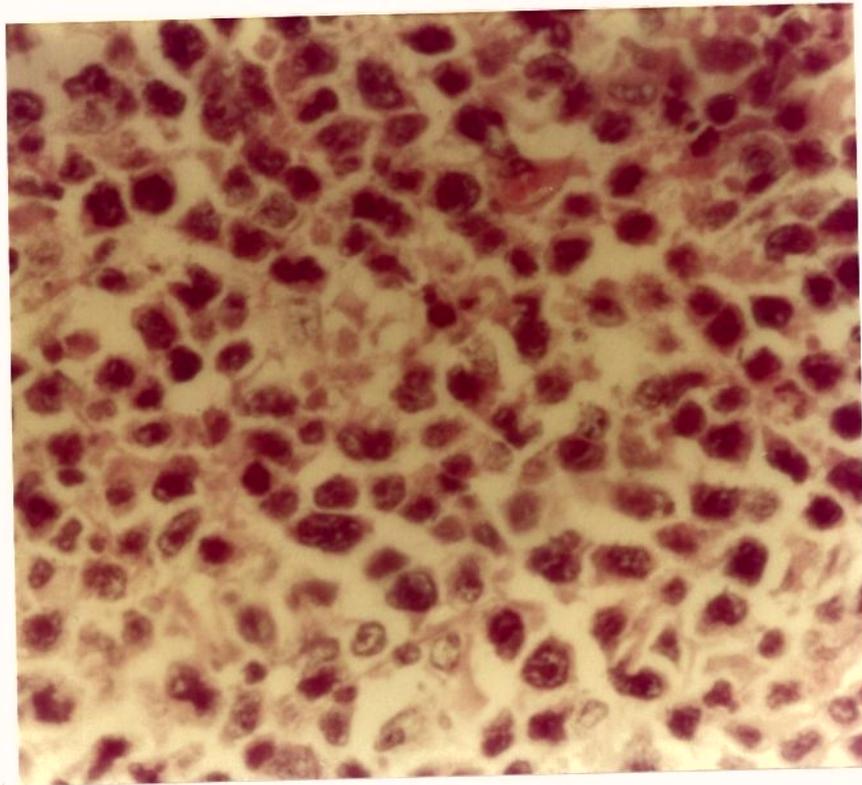
**Figura 5.** Linfoma centroblástico de células multilobadas. (HE, 1320 x).



**Figura 6.** Linfoma centrolástico com células em anel de sinete. (PAS, 1320 x).



**Figura 7.** Linfoma linfoblástico. (HE, 528 x).



**Figura 8.** Linfoma de alto grau de malignidade, de células T. (HE, 528 x).

## **DISCUSSÃO**

## CLASSIFICAÇÃO DOS LINFOMAS NÃO-HODGKIN

O problema da classificação dos tumores linfóides preocupa tanto os patologistas quanto os clínicos desde muito tempo. A razão por não se conseguir uniformizar sua nomenclatura reside nas divergências localizadas principalmente em quatro áreas apontadas por Willis desde 1948: na histogênese, no grau de diferenciação, na dificuldade em reconhecer a origem linfóide ou epitelial de uma neoplasia indiferenciada e, por fim, nas dificuldades em diagnosticar como processo neoplásico ou reacional (LAUDER, 1988).

Uma classificação ideal dos linfomas não-Hodgkin deveria separá-los em grupos cujos integrantes apresentassem semelhanças biológicas, morfológicas (citológica e histológica) e clínicas. As semelhanças dos elementos de um mesmo grupo deveriam proporcionar uma identificação segura aos patologistas e a evolução clínica deveria ser semelhante. Estas condições ideais tornariam possível um planejamento terapêutico mais adequado a cada grupo. As tentativas de se aproximar deste ideal são múltiplas e se traduziram por várias classificações que vêm se sucedendo desde o século passado, desenhando uma tendência cada vez maior de aproximação à real histogênese dos linfomas não Hodgkin. Porém, estas classificações acabam por contornar os problemas sem conseguir afastar as dificuldades que impedem a consecução do objetivo ideal.

A maioria das classificações propostas têm se baseado na provável origem histológica dos linfomas não Hodgkin. Em 1956, RAPPAPORT apresentou uma primeira proposta de classificação dos linfomas não Hodgkin baseada na citologia e na histologia. Propunha a separação dos linfomas não Hodgkin em linfocíticos e histiocíticos. Separava-os também em um grupo de bom prognóstico e outro de mau prognóstico. Os de bom prognóstico seriam de origem celular linfocítica, nodular e bem diferenciados. Os de mau prognóstico seriam os histiocíticos, de crescimento difuso e pouco diferenciados. As células pequenas eram denominadas linfocíticas e as células grandes eram denominadas histiocíticas (RAPPAPORT, WINTER & HICKS, 1956;

RAPPAPORT, 1966; BROWN et al., 1975; NATHAWANAMI, KIM & RAPPAPORT, 1976; MUSSHOF et al., 1981 ). A classificação de Rappaport tem sido utilizada por mais de 30 anos. Quando foi proposta teve uma grande aceitação pela contribuição que prestou à clínica e pela facilidade de reprodutibilidade que apresentava aos patologistas. RAPPAPORT sempre insistiu na importância prognóstica dos linfomas nodulares e linfomas difusos. Os linfomas não Hodgkin com padrão nodular, como se sabe, apresentam melhor prognóstico que os de crescimento difuso. Vale a pena lembrar que em 1938 ROBB-SMITH já havia reconhecido a existência destes dois modelos de arquitetura nos linfonodos dos linfomas não Hodgkin. Tem-se demonstrado que os linfomas não-Hodgkin histiocíticos de RAPPAPORT englobam neoplasias linfóides heterogêneas e vários tipos celulares com grande núcleo. Estas falhas explicam a constatação de comportamentos clínicos diferentes para entidades incluídas num mesmo grupo (LUKES & COLLINS, 1975; KRÜGER et al., 1981; MUSSHOF et al., 1981; ERSBOLL et al., 1985; LENNERT & FELLER, 1992).

Nos anos 70, os estudos da resposta imune, observada no tecido linfóide, levaram a um maior conhecimento da biologia dos linfócitos. As reações imunológicas propiciam uma diferenciação dos linfócitos e a formação de células especializadas (linfócitos B e T) que se localizam em regiões específicas dos tecidos linfóides denominados como "Homing" destas células linfóides B e T.

Os linfomas não Hodgkin relacionam-se com uma proliferação destes linfócitos transformados. Durante a ativação dos linfócitos haveria uma inibição dos linfócitos, em uma fase qualquer deste processo, provocada por um mecanismo denominado "switch-on" (LUKES & COLLINS, 1975; LENNERT, 1978; LUKES et al., 1978; JAFFE, 1990).

Os novos avanços da imunologia tornaram evidente que os linfomas histiocíticos da classificação de RAPPAPORT eram, na realidade, linfócitos transformados. Esta classificação ignora a heterogeneidade do sistema imune. Ela se impôs por muitos anos, mas com as novas perspectivas surgidas com os processos imunológicos, que permitem uma acuidade científica maior, novas classificações se tornaram mais atraentes, embora ainda distantes da classificação ideal.

Entre as novas classificações apresentadas as mais aceitas foram de LUKES & COLLINS (1974), e a chamada classificação de Kiel, elaborada por LENNERT e colaboradores (1974) (GERARD-MARHANTE et al., 1974 LENNERT, STEIN & KAISERLING, 1975; LUKES & COLLINS, 1975).

A classificação de LUKES & COLLINS foi a primeira baseada nos novos conceitos funcionais do sistema imune. Baseia-se na experiência morfológica com os linfomas não Hodgkin e nas novas teorias sobre a transformação linfocítica, de acordo com o sistema de células linfóides B e T.

Esta classificação reúne os linfomas não Hodgkin em quatro grupos: 1) linfoma não Hodgkin de células indefinidas que não apresentam marcadores imunológicos ou citoquímicos; 2) linfoma não Hodgkin de células T; 3) linfoma não Hodgkin de células B; 4) linfoma não Hodgkin histiocítico. Em uma categoria à parte, agrupam-se os linfomas inclassificáveis.

Há vários pontos de diferença entre a classificação de RAPPAPORT e de LUKES & COLLINS. Na primeira não há separação dos sistemas de células B e T, qualquer tipo citológico é classificado como nodular ou difuso e não há nenhuma menção quanto à origem celular do linfoma folicular. Já na classificação de LUKES & COLLINS é demonstrado que todos linfomas não Hodgkin com crescimento nodular são linfomas compostos pelas células dos centros foliculares precursoras dos plasmócitos e portanto de origem linfóide B. Estes centros foliculares são um dos locais em que se processam a transformação de células B normais. Pode haver linfomas de células do centro foliculares com crescimento difuso. Os tipos celulares que compõem o centro folicular são as células não clivadas pequenas ou grandes e ainda as células clivadas pequenas ou grandes.

Continuando a análise das diferenças entre estas duas classificações, observamos que os linfomas histiocíticos de RAPPAPORT incluem todos os tipos de linfoma de grandes células da classificação de LUKES & COLLINS, ou seja, os linfomas centro-foliculares de células clivadas grandes, linfomas de células não clivadas grandes, linfoma imunoblástico de origem celular B ou T e o verdadeiro linfoma histiocítico. Os linfomas linfocíticos pouco diferenciados incluem três ou

mais tipos, como os linfomas linfocíticos convolutos, os linfomas dos centros foliculares de pequenas células clivadas e alguns casos de linfomas dos centros foliculares de grandes células clivadas. Alguns autores incluem ainda os linfomas dos centros foliculares de pequenas células não clivadas.

O linfoma indiferenciado de RAPPAPORT inclui mais de um subtipo, que são os linfomas de células indiferenciadas, os linfomas linfocíticos convolutos e os linfomas dos centros foliculares de pequenas células não clivadas. O linfoma linfocítico bem diferenciado e o linfoma linfocítico pouco diferenciado inclui vários tipos de células, o linfoma linfocítico (LLC) e o linfoma do centro folicular de pequenas células clivadas.

O linfoma misto de RAPPAPORT, composto por células pequenas e grandes (linfocítico e histiocítico), e a sua correspondência com a classificação de LUKES & COLLINS depende muito do observador, como sabemos as células histiocíticas definidas por RAPPAPORT são linfócitos ativados, ou podendo ser definidas como células do centro germinativos clivadas (LUKES & COLLINS, 1975; LUKES, PARKER et al., 1978).

Em 1974, LENNERT publicou a sua classificação conhecida como classificação de Kiel, baseada na morfologia, valendo-se também dos novos conceitos imunológicos. Esta classificação dividia os linfomas em dois grandes grupos: os linfomas de baixo grau de malignidade e os de alto grau de malignidade. A finalidade era separar os linfomas de acordo com a biologia dos tumores, ou seja, levando em conta a dinâmica celular. Esta separação tinha bases histológicas, pois os linfomas de baixo grau de malignidade abrigavam células de volumes aproximado ao dos linfócitos pequenos, com reduzido número de mitoses, denominadas de "citos", enquanto os de alto grau de malignidade apresentavam células neoplásicas grandes, com grande número de mitoses, denominadas "blastos".

Um dos pontos da classificação de Kiel que a diferencia das outras situa-se no conceito de que todos os linfomas não Hodgkin de alto grau de malignidade podem ser primários ou secundários,

com exceção do linfoma linfoblástico. Esta classificação também faz a separação dos linfomas não Hodgkin em linfomas de células B e linfomas de células T. É uma classificação que não oferece dificuldades aos patologistas, quando estes dispõem de bons cortes histológicos realizados com boa técnica e, além disso, tem valor prático e teórico tanto para os patologistas quanto para clínicos e está de acordo com os atuais conhecimentos imunológicos. Porém, em alguns casos, são necessários estudos imuno-histoquímicos para subclassificá-los em linfomas de células B ou T (GERARD-MARCHANT et al, 1974; LENNERT et al.,1975; LENNERT, STEIN & KAISERLING, 1975; LENNERT, 1978; MACHADO, 1978; GLIMELIUS, HAGBERG & SUNDSTRÖM, 1983; LEONARD et al., 1983; PORWIT-KSIAK & MIODUSZEWSKA, 1983; LIEBERMAN et al., 1986; BANKS, 1990; LENNERT & FELLER; 1992).

Em 1987 foi publicada uma revisão da classificação de Kiel. Além da inclusão de novas categorias de linfomas, constatou-se que alguns casos não podiam ter sua origem celular determinada, nem com a imuno-histoquímica. Nestes raros casos, técnicas de biologia molecular são necessárias (SUCHI et al., 1987; STANFELD, DIEBOLD & KAPANCI, 1988; ERSBOLL & SCHULTZ, 1989; LENNERT & FELLER, 1992).

A classificação de Kiel revista inseriu as seguintes modificações: entre os linfomas de origem B foi introduzido o linfoma anaplástico de grandes células, o linfoma tipo Burkitt foi separado dos linfomas linfoblásticos e o linfoma B-monocitóide foi retirado da lista dos tipos raros para lista principal. Os linfomas linfoblásticos foram colocados como uma categoria separada, uma vez que representam neoplasia de células precursoras linfóides. Todos os outros tipos de linfomas não Hodgkin B são derivados dos linfócitos periféricos e de suas formas ativadas ou em proliferação. Em relação ao linfoma imunocítico o subtipo pleomórfico passa a ser classificado como centroblastico ou imunoblástico (LENNERT & FELLER, 1992).

A exemplo do que foi comentado em relação à classificação de LUKES & COLLINS, a tradução entre as classificações de RAPPAPORT e a de KIEL é quase impossível de se realizar (KRÜGER et al., 1981; MUSSHOF et al., 1981).

Já as classificações de KIEL e LUKES & COLLINS apresentam muitos aspectos comuns: são baseadas nos conceitos imunológicos e respeitam a idéia da correspondência com a linfopoesse (LUKES & COLLINS, 1975; LENNERT, 1978; LUKES et al., 1978; ERSBOLL et al., 1985; LIEBERMAN et al., 1986). As maiores diferenças entre elas consistem no fato de que na classificação de LUKES & COLLINS as células são denominadas como descrições citológicas, perdendo sua identidade (exemplo: célula pequena clivada, não clivada, etc). O ponto de maior divergência é em relação à linfopoesse das células do centro germinativo. LUKES E COLLINS acreditam que quando há apresentação antigênica às células do centro germinativo, primeiramente ocorrem um predomínio de células pequenas ou grandes clivadas (centrocitos) e com o tempo aparecem as células pequenas ou grandes não clivadas (centroblastos).

A teoria da classificação de Kiel explica de modo diferente, quer por meio de estudos imunológicos, quer por observação morfológica: as primeiras células a responderem a um estímulo antigênico são os centroblastos e depois aparecem os centrocitos, células mais diferenciadas. Parece-nos que esta explicação é mais plausível pois acompanha um paradigma da biologia: todos os elementos celulares partem das formas mais jovens para as formas mais diferenciadas.

Após estas novas classificações utilizando os conceitos recentes de imunologia, várias classificações foram propostas, como de DORFMANN, World Health Organization, British, não resolvendo um grande problema: os resultados não eram comparáveis, pois cada centro usava um sistema classificatório, dificultando comparações terapêuticas e de sobrevida.

Em 1982 foi apresentado o resultado de um estudo multicêntrico, com os responsáveis pelas seis classificações mais importantes e utilizadas mundialmente (RAPPAPORT, LUKES & COLLINS, Kiel, World Health Organization, British e DORFMANN) e com a participação de patologistas com renome mundial e não comprometidos com nenhuma destas classificações. Desenvolveram um sistema de classificação, na tentativa de facilitar as comparações clínicas e homogenizando a nomenclatura. Assim, surgiu a "Working Formulation of Non-Hodgkin's Lymphoma for Clinical Usage" (LENNERT, 1978; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1991).

Foi um estudo de grande porte e custo, porém pouca informação nova sobre os linfomas não-Hodgkin surgiu deste trabalho, deixando claro que qualquer classificação adotada mantém o mesmo valor preditivo enquanto prognóstico e reprodutibilidade. Além disto, não estavam preocupados com a histogênese dos linfomas não-Hodgkin (LAUDER, 1988). Separaram os linfomas não-Hodgkin em três grupos, alto, intermediário e baixo grau de malignidade, a divisão relaciona-se com as curvas de sobrevida e não, como na classificação de LENNERT, onde a separação entre alto e baixo grau de malignidade é dada pelo aspecto histológico (LENNERT, 1978).

Desta forma, decidimos utilizar a classificação de Kiel por acreditarmos em uma classificação que pode ser facilmente reproduzida entre hematopatologistas treinados, que utiliza os novos conhecimentos imunológicos, portanto, conseguindo aproximár-se da histogênese do linfoma não-Hodgkin.

## **REAÇÃO DE IMUNOPEROXIDASE**

A introdução da reação de imunoperoxidase representa um importante avanço diagnóstico em Anatomia Patológica, principalmente em tumores indiferenciados, de origem celular incerta, onde normalmente a morfologia não é suficiente para o diagnóstico. Uma das grandes vantagens desta técnica é poder ser utilizada em tecidos previamente fixados e incluídos em parafina (NORTON & ISAACSON I, 1989).

Os métodos de detecção indireta são mais sensíveis, quando comparados com os métodos diretos. Com o método direto a enzima é conjugada diretamente ao anticorpo primário; pelo método indireto há ampliação da demonstração da reação do anticorpo primário e do antígeno a ser estudado (TAYLOR, 1978; BANKS, 1979; HSU, RAINE & FANGER, 1981; FALINI & TAYLOR, 1983).

Nos casos de neoplasias malignas indiferenciadas, há disponibilidade de um amplo painel de anticorpos para a definição de linhagem em: carcinoma, carcinoma neuroendócrino, sarcomas (miogênicos, neurogênicos), melanona e linfomas. Estes últimos, por sua vez, podem ser subtipados, através de um painel de anticorpos monoclonais (MANSON & GATTER, 1987).

Somente com a utilização criteriosa de uma combinação de anticorpos poderemos fazer uma classificação adequada de uma neoplasia indiferenciada e de um linfoma maligno, obtendo-se assim, maior probabilidade de acerto. A escolha de um painel de anticorpos pressupõe o conhecimento dos graus de especificidade e de sensibilidade de cada um deles, sendo que, de outra forma, corre-se o risco de uma decisão diagnóstica imprecisa (CARTUN, COLES & PASTUSZAK, 1987; PALLESEN, 1988).

Em centros do terceiro mundo, a escolha racional de painéis para neoplasias indiferenciadas e para a subtipagem de linfoma é crítica, pois muitas vezes implica na escolha de um número reduzido de anticorpos (THOMAS et al., 1991; DAVEY et al., 1987).

Desta forma, na subtipagem de linfomas não-Hodgkin, acreditamos ser de grande utilidade a aplicação de um painel tão reduzido quanto foi utilizado neste estudo, o CD20 (L26) e o CD45RO (UCHL-1). Aliás, mesmo em um país de primeiro mundo, em um estudo epidemiológico de linfomas não-Hodgkin (Nebraska, EUA) este painel mínimo foi utilizado. Outros estudos também foram realizados utilizando-se estes dois anticorpos monoclonais, por vezes associados a mais um marcador linfóide de células T (ISHII et al., 1984; STANFELD, 1985; LINDER et al., 1987; NORTON & SAACSON I, 1987; LINDER et al. 1988; NGAN et al., 1989; MANSON et al., 1990; ZAHM et al., 1990; SEGAL et al., 1991; BLUTH, CASEY & MacCURLEY, 1993). Em um país africano, os anticorpos utilizados foram o CD20 (L26) e o CD3 policlonal como marcador pan T. Neste estudo, foi alegado que o padrão de reação do CD45RO não fora tão adequado quanto o CD3 (THOMAS et al., 1991). Em nossa experiência, porém, não obtivemos tão bons resultados com o CD3 como com o CD45RO: se o primeiro é mais específico como marcador T, é menos sensível que o segundo.

O anticorpo monoclonal L26 (CD20) é um excelente marcador pan B, utilizável em material fixado e incluído em parafina, com alta especificidade e positividade em torno de 85 a 90% em linfomas não-Hodgkin de origem B (ISHII et al., 1984; STANFELD, 1985; CARTUN, COLES & PASTUSZAK, 1987; DAVEY, GATTER & RALFKIAER, 1987; NORTON & ISAACSON I, 1987; NORTON & ISAACSON II, 1987; LIPPMAN et al, 1988; NGAN et al., 1989; NORTON & ISAACSON I, 1989; NORTON & ISAACSON II, 1989; MANSON et al., 1990). Apresenta reação mais intensa com células de centro germinativo. Raramente marca linfócito T, mas pode apresentar reação positiva em células de Reed-Sternberg na Doença de Hodgkin clássica (DAVEY et al., 1987; NORTON & ISAACSON I, 1987; LINDER et al., 1988; HAMITON-DUTOIT & PALLESEN, 1989; NORTON & ISAACSON I, 1989). Sua reatividade não é tão marcada para as células mais indiferenciadas (linfoblasto) ou mais diferenciadas (plasmócitos), bem como para imunoblastos ( CARTUN, COLES & PASTUSZAK, 1987; DAVEY et al., 1987; MANSON et al., 1990;ELGHETANY et al., 1991). Segundo alguns autores, sua especificidade gira em torno de 83% e sensibilidade está pelos 97% (ELGHETANY et al., 1991).

O anticorpo monoclonal L26 reconhece um antígeno de localização intracelular. Este antígeno apresenta duas cadeias polipeptídicas com peso molecular de 30 e 33 kilodaltons (KD), à semelhança dos reconhecidos por outros anticorpos monoclonais anti-CD20. O antígeno reconhecido por este anticorpo surge mais tardiamente na diferenciação linfóide B que outros antígenos (CD19 e CD22, ver esquema no capítulo de anexos). É por esta razão que os linfomas linfoblásticos B não são tão frequentemente marcados pelo CD20 ( CARTUN, COLES & PASTUSZAK, 1987; MANSON et al., 1990).

O anticorpo monoclonal UCHL-1 (CD45RO) é um dos bons marcadores pan T utilizados em cortes de tecido parafinado. A positividade nos linfomas não-Hodgkin de células T varia, nos estudos, entre 50 a 86% (TUBBS et al., 1983; WARNKE & ROUSE, 1985; NASH, 1986; NORTON et al., 1986; NORTON & ISAACSON, 1986; DAVEY et al., 1987; LINDER et al. II, 1987; NORTON & ISAACSON III, 1987; WILLIAMS & SWERDLOW, 1990; CLARK,

HASTRUP et al., 1991; CHADBURN, HUSAIN & KNOWLES, 1992; BRUIN et al., 1993; MONTALBAN et al., 1993). Marca mais intensamente células T periféricas, raramente células B e, por vezes, apresenta reatividade para células monocíticas, macrófagos e granulócitos (STANFELD, 1985; HORMING et al., 1986; LINDER et al., 1986; NORTON 1986; SMITH et al., 1986; DAVEY et al., 1987; NORTON & ISAACSON I, 1989; NORTON & ISAACSON II, 1989). A exemplo do anticorpo L26, sua positividade não é tão frequente em células mais indiferenciadas (linfoblastos T), células tímicas e ativadas (imunoblastos) (STEIN et al., 1984; NORTON, 1986; NORTON & ISAACSON, 1986; DAVEY et al., 1987; LINDER et al. II, 1987; NORTON & ISAACSON III, 1987; NORTON & ISAACSON I, 1989; CLARK, WILLIAMS & SWERDLOW, 1990; CHADBURN, HUSAIN & KNOWLES, 1992).

O grupo de antígenos leucocitários comuns, designados como CD45 é constituído por glicoproteínas de alto peso molecular, de localização transmembrana citoplasmática de leucócitos. Não são expressos em plaquetas e eritrócitos. O antígeno leucocitário comum apresenta quatro isoformas antigénicas, com 180, 190, 205 e 220 KD. As células tímicas imaturas e as T de memória expressam as isoformas de maiores pesos moleculares (200 a 220 KD). Todas as isoformas são codificadas em um único gene, o qual apresenta três exons variáveis, codificando diversos RNA-mensageiros, surgindo, então, as várias proteínas com os diferentes pesos moleculares. Estes antígenos apresentam uma sequência homóloga de aproximadamente 705 aminoácidos localizada na face citoplasmática e uma sequência variável com 400 a 550 aminoácidos na parte distal da porção extra-celular, local onde estão as diferentes isoformas do antígeno leucocitário comum. Os anticorpos monoclonais que reconhecem somente uma destas cadeias polipeptídicas são designadas como CD45R (restrito), que é o caso do UCHL1 (CD45RO), que reconhece uma isoforma de 180 KD (WARNKE et al, 1983; NORTON et al., 1986; SMITH et al., 1986; BARCLAY, RALPH et al., 1987; MANSON & GATTER, 1987; van EYKEN et al., 1987; WILLIS & WILLIAMS, 1987; SERRA et al., 1988; THOMAS, 1989).

Em nossa casuística, definimos melhor a linhagem do linfoma em 12,7% dos casos, o que não

havia sido feito apenas com os métodos morfológicos tradicionais. A necessidade de se realizar a reação de imunoperoxidase na classificação dos linfomas não-Hodgkin ocorre em 10 a 15% dos casos (LENNERT & FELLER, 1992).

Por outro lado, em 11 casos não foi possível determinar a linhagem, mesmo após estudo imuno-histoquímico (18%). Esta porcentagem é um pouco maior que a referida em outros estudos, de 3 a 13% (ELGHETANY et al., 1991; TABRIZCHI, GUPTA & RAFFI, 1991; LENNERT & FELLER, 1992). A falta de reatividade destes casos pode ser atribuída principalmente a artefatos técnicos, de má fixação dos tecidos.

Em nosso trabalho, obtivemos 80% de positividade para CD20 nos casos morfológicamente diagnosticados como linfoma B. A sensibilidade menor de nossa amostra em relação aos 97% em relação a ELGHETANY et al., 1991, por exemplo, pode estar refletindo problemas com a preservação antigênica por má fixação de nossos tecidos.

A comparação da frequência dos vários subtipos de linfoma não-Hodgkin do presente estudo é apresentada na Tabela 5. Para realizarmos a correspondência dos subtipos em estudos em que a classificação de Kiel não foi utilizada, baseamo-nos nas tabelas dadas por LENNERT & FELLER, 1992 (ver anexos).

Na comparação feita na Tabela 5, chamam a atenção as baixas incidências de linfomas foliculares centroblástico-centrocito na Nigéria e a baixa incidência de linfomas imunoblásticos B em nosso material, fatos para os quais não temos uma explicação verossímil. A alta incidência de linfoma centrocito na casuística de LUKES & COLLINS deve-se, muito provavelmente, à diferença de critérios diagnósticos. Os critérios da classificação de Kiel são estritos, não podendo haver blastos no linfoma centrocito, enquanto na de LUKES & COLLINS, o predomínio das pequenas células clivadas já leva à inclusão no grupo dos centrocíticos. Outra frequência que reflete diferenças entre as classificações de LUKES & COLLINS e Kiel é a do grupo dos linfomas linfoblástico B, T, não classificados e o tipo Burkitt.

**Tabela 5.** Comparações das frequências (%) dos vários subtipos dos LNH

	Unicamp	Kiel	Nigéria	Machado	Reino Unido	Lukes
<b>Baixo Grau</b>	<b>45</b>	<b>63,4</b>	<b>42</b>	<b>34,4</b>	<b>72</b>	<b>65,5</b>
B	90	86	81	76,2	84,9*	90,2
Leucemia Linfóide Crônica	22,5	17,3	28,6	23,8	21,1	16,6
Imunocitoma	32,5	19,4	28,6	42,9	4,1	12,3
Centroblástico-Centroclítico	30	32,1	14,3	0	57,3	6,5
Centroclítico	5	8,6	7,1	0	11,8	30,1
T	10	14	19	23,8	15,1**	9,8
Micose Fungóide	5	1,5	2,4	23,8	3,8	
Linfoadenopatia						
Angioimunoblástica	2,5	5,6	4,8	0	0	
Linfoma T de Baixo Grau	2,5	0	0	0	0	
<b>Alto Grau</b>	<b>49,4</b>	<b>31,6</b>	<b>58</b>	<b>65,6</b>	<b>28</b>	<b>34,5</b>
B	73,5	73,9	84,5	77,5	54,8	
Centroblástico	46,9	43,4	29,3	57,5	49,4	19,4
Imunoblástico	6,1	13,6	8,6	20	7	12,1
Anaplástico	2	0,25	3,5	0	0	0
Linfoblástico	6,1	2,7	5,2	0	20	23,4
Burkitt	12,2	8,1	37,9	0	0	0
T	16,3	26,1	6,9	0	45,2	
Linfoma T Pleomórfico	4	8,4	3,6	0	0	0
Linfoma T de Alto Grau	10,2	0	0	0	0	0
Linfoblástico	2	10,1	3,6	0	8,2	33
Linfoblástico (Não B / Não T)	10,2	6,7	8,6	42,3	4,7	44,4
Indeterminado. Global	5,6	5	5	22,5	1,3	15,3

\* Porcentagem total dos LNH B

\*\* Porcentagem total dos LNH T/ Foi impossível conseguirmos separá-los em alto ou baixo grau de malignidade na maioria dos casos

Já em relação ao linfoma de Burkitt, nota-se muito maior frequência na África, onde este tumor é endêmico e associado ao vírus do Epstein-Barr. Nossa frequência aproxima-se mais à casuística de Kiel (THOMAS, 1991).

Fato curioso, que reflete muito provavelmente problemas de amostragem, é termos um linfoma com morfologia anaplásico e de imunofenótipo B entre nossos casos. Na casuística de LENNERT-FELLER (1992) os linfomas anaplásicos são mais frequentemente T. Seria necessário aumentar o tamanho da amostra de estudo para avaliarmos com segurança a real frequência relativa dos linfomas anaplásicos e seu imunofenótipo em nosso material.

Em nosso trabalho não incluímos para a subclassificação e para a realização da imunofenotipagem nos casos extra-nodais, pois estes apresentam, em alguns casos, uma biologia tumoral própria e com características morfológicas distintas dos linfomas nodais (LENNERT, 1978). Além do mais, não podíamos assegurar em quais casos o acometimento dos órgãos extra-nodais era primário ou secundário (DEVESSA & FEARS, 1992).

A incidência que encontramos de linfomas não Hodgkin extranodais foi de 38,2%, compatível com o encontrado na literatura, que varia de 25% a 47% (JAFFE, 1990; BRIZCHI, GUPTA & RAFFI, 1991; OHSAWA et al., 1992; WEINSENBURGER, 1992; ). Em nossa casuística consideramos dentre os extranodais os casos diagnosticados na medula óssea, pois não encontramos nenhuma biópsia de gânglio correspondente a eles. Muitos destes casos podem corresponder a linfoma linfocítico/leucemia linfóide crônica, nos quais não era rotina a realização da biópsia de gânglio. Os diagnósticos foram realizados somente com a biópsia e citologia da medula óssea e hemograma. Acreditamos ser por isto que temos uma incidência tão alta de linfoma não Hodgkin na medula óssea (42,5%). Há poucos anos, tornou-se rotina, na Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), fazer biópsia de gânglio para o diagnóstico de qualquer doença linfoproliferativa.

Na literatura a maior incidência de linfomas não-Hodgkin extra-nodais são os de estômago, em

torno de 20%, e de intestino (14%). Portanto, a incidência em todo trato gastro intestinal é em torno de 34%. Enquanto isto, em nossa casuística encontramos somente a incidência de 10%. Acreditamos que esta diferença se deva a dificuldades particulares em nosso hospital de realizarmos diagnósticos em trato gastro-intestinal nos anos em que fizemos este levantamento. Não podemos afastar com segurança tratar-se de diferenças regionais.

Em seguida, o local mais acometido é a pele com uma percentagem de 16,8%. Em nosso trabalho, a pele foi o segundo lugar mais acometido com 21,8% dos linfomas não Hodgkin extra-nodais. Uma diferença importante é o aparecimento do testículo em nossa lista, em quinto lugar, com 4,1%. Na literatura são conhecidos apenas relatos esporádicos de linfomas primários de testículo. Nossos casos, provavelmente, correspondem a biópsias de testículos para estadiar as leucemias linfóides agudas. Como normalmente as requisições de onde foram retiradas as informações são incompletas, não há referências sobre a doença de base do paciente e, conseqüentemente, o diagnóstico é dado como linfoma linfoblástico, cujas células são indistinguíveis da leucemia linfóide aguda (JAFFE, 1990).

Encontramos uma porcentagem de 55% e 45%, idade média de 41 e 54 anos e uma relação entre os sexos feminino e masculino 1,5 e de 1,4, de linfoma não-Hodgkin de alto e baixo grau de malignidade, respectivamente. Estas nossas observações estão dentro do observado na literatura mundial (ANDERSON et al., 1982; LENNERT & FELLER, 1992; NGENDAHAYS & SCHAUZ, 1992; O'REILLY & CONNORS, 1992; ZHENG et al. 1992; OSTERMAN et al., 1993).

Em relação à distribuição etária, conforme o esperado na literatura, não ocorreu nenhum caso de linfoma não-Hodgkin de baixo grau de malignidade antes dos 24 anos, sendo seu pico de incidência em torno da sexta e sétima década de vida (LENNERT & FELLER, 1992). Enquanto isto, os linfomas não-Hodgkin de alto grau de malignidade apresentam dois picos de incidência, um na faixa pediátrica e o segundo em torno da quinta década de vida (ROSENBERG et al., 1982; LENNERT & FELLER, 1992).

A identificação dos linfomas não Hodgkin quanto à origem celular B ou T nos parecem importante, não se tratando apenas uma questão somente acadêmica. Apresenta valor prognóstico relevante, uma vez que os linfomas não Hodgkin de células T são acompanhados de quadros clínicos mais graves, com altas taxas de recidiva e pior prognóstico em relação aos linfomas não-Hodgkin de células B (COSMANN, JAFFE & FISCHER, 1984; GROGAN et al, 1985; HORMING et al., 1986; COIFFER et al., 1988; LIPPMAN et al., 1988; BROWN et al., 1989; COIFFER et al., 1990; THOMAS et al, 1991; LEITH et al., 1992;).

As porcentagens de linfoma não-Hodgkin de origem B, T e de origem indeterminada encontrada por nós com os métodos tradicionais e associados à imunoperoxidase foram 80,9%, 13,5% e 5,6%, respectivamente. Diferem dos países onde os linfomas não Hodgkin T, positivos para o HTLV-1 são endêmicos, apresentando uma incidência em torno de 60%. Também diferem discretamente dos países do primeiro mundo, onde os linfomas de origem T apresentam uma incidência 18 a 20%. A frequência dos linfomas não-Hodgkin de origem B correspondem ao encontrado na literatura (TUBBS et al., 1983; STANFELD, 1985; WARNKE & ROUSE, 1985; NASH, 1986; KRAJEWSKI et al., 1988; LIPPMAN et al., 1988; ELGHETANY et al., 1991; THOMAS et al., 1991; LENNERT & FELLER, 1992; NGENDAHAAYS & SCHAUZ, 1992; JAFFE et al., 1992; ZHENG et al., 1992; ). Nossa porcentagem levemente mais baixa de linfomas de células T pode dever-se a variações geográficas. Pode também ser por problemas técnicos, pois em alguns casos as reações de imuno-histoquímica foram insatisfatórias.

## **CONCLUSÕES**

1- Nossos subtipos histológicos e imunofenotípicos de linfomas não-Hodgkin equivalem em geral aos dados de países do 1º. mundo.

2- A reação de imunoperoxidase permitiu a fenotipagem correta de mais 11 casos (12%), onde a morfologia clássica foi insuficiente, mesmo utilizando-se um painel econômico de um marcador linfóide B (CD20/L26) e um T (CD45R0/UCHL1).

3- Encontramos uma maior frequência de linfomas não-Hodgkin B, dados compatíveis com a literatura mundial.

Observamos frequências semelhantes de linfomas não Hodgkin de alto e baixo grau de malignidade; a incidência de linfomas de alto grau de malignidade é maior em indivíduos mais novos, enquanto os linfomas de baixo grau de malignidade a incide mais em indivíduos mais velhos. As frequências foram semelhantes entre os sexos masculino e feminino.

4- A frequência dos linfomas não-Hodgkin extra nodais é compatível com a literatura. A grande incidência de casos em medula óssea deve, provavelmente, em muitos, casos corresponder ao linfoma linfocítico/leucemia linfóide crônica, quando não era rotina a realização da biópsia de gânglio nestes casos.

## RESUMO

Os linfomas não-Hodgkin englobam um conjunto de entidades nosológicas que apresentam características comuns quanto à clínica e à histologia, sendo genericamente divididos em alto e baixo graus de malignidade. Um grande problema tem sido a sistematização dos vários subtipos histológicos dos linfomas não-Hodgkin, tendo-se chegado a uma classificação mais adequada na década de 70, à luz dos novos conhecimentos da imunologia e melhor compreensão da fisiopatologia dos mesmos. Entre todas, escolhemos neste trabalho a classificação de Kiel, que está de acordo com os novos conceitos imunológicos, relaciona melhor os linfomas não-Hodgkin com a ontogenia dos linfócitos, apresenta uma boa reprodutibilidade entre os hemopatologistas, e apresenta também boa correlação clínica.

Estudamos 89 casos de linfomas não-Hodgkin diagnosticados no Departamento de Anatomia Patológica da UNICAMP, entre os anos de 1978-1986. Ao todo, diagnosticamos, utilizando a morfologia tradicional adicionada à imuno-histoquímica, 72 casos (80,9%) como linfoma não-Hodgkin de origem B, 12 casos (13,5%) como linfoma não-Hodgkin T. Cinco casos (5,6%) de linfoma linfoblástico não puderam ser classificados como linfoma não-Hodgkin B ou T e foram considerados como indeterminados.

Em 63 casos (71%) realizamos o estudo imuno-histoquímico com os anticorpos monoclonais L-26 (CD20) e UCHL-1 (CD45RO), respectivamente pan B e pan T. Com anticorpo monoclonal pan B, obtivemos 46 casos positivos (73%), com anticorpo monoclonal UCHL-1 seis casos positivos (9,5%). Em 11 casos (17,5%) não obtivemos nenhuma reação. Com o acréscimo da reação de imunoperoxidase às colorações habituais dos laboratórios de patologia, conseguimos definir a origem celular do linfoma não-Hodgkin em onze casos (12,7%), onde a impressão morfológica não fora suficiente.

Os subtipos histológicos e imunofenotípicos de linfomas não-Hodgkin de nossa casuística equivalem, globalmente, aos dados dos países do 1º mundo. Além do mais, mesmo a utilização de um painel imuno-histoquímico reduzido permitiu a fenotipagem de grande parte dos casos.

## SUMMARY

The non-Hodgkin lymphomas belong to a group of nosologic entities which present ordinary characteristics in relation to both clinical and histology, being in general divided into high and low levels of malignity.

The systematization of the many subtypes of the non-Hodgkin lymphomas has been a great problem. Only in the 70's, in the light of the immunological knowledge and due to a better understanding of their physiopathology, a more adequate classification was reached. Among all, Kiel classification was chosen, since it is in accordance of relationship between the non-Hodgkin lymphomas with the lymphocyte ontogenesis, as it presents a good receptivity among hemopathologists as well as presenting a good clinical correlation.

Eighty nine cases of non-Hodgkin lymphomas which were diagnosed at the Pathological Anatomy Department at UNICAMP, from 1978 to 1986 were studied. Only through the use of traditional morphology, 72 cases (80,9%) as non-Hodgkin lymphomas of B-cell origin and 12 cases (13,5%) as non-Hodgkin T-cell lymphomas. Five cases (5,6%) of lymphoblastic lymphoma could not be classified as non-Hodgkin lymphoma neither as B nor as T and were considered indeterminate.

In 63 cases (71%) the immuno-histochemical study with monoclonal antibodies L26 (CD 20) and UCHL-1 (CD45RO), pan B and pan T, respectively, was carried out: with the monoclonal antibodies pan B 46 positive cases (73%) were obtained; with the monoclonal UCHL-1 antibodies 6 positives cases were established; 11 cases (17,5%) presented no reaction.

With addition of immunoperoxidase reaction to the usual coloration of Pathology laboratory it was possible to define the cellular origin of the non-Hodgkin lymphoma in 11 cases (12,7%), where the morphological impression proved to be insufficient.

The histological and immunophenotypic subtypes of non-Hodgkin lymphomas in our registered cases are globally equivalent to the first world countries findings.

Furthermore, even the utilization of a reduced immuno-histochemical panel allowed the classification of phenotypes in the great majority of the cases.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ANDERSON, T; CHABNER, BA; YOUNG, RC; BERARD, C & GARVIN, AJ; SIMON, RM; De VITA, VT- Malignant lymphoma I. The histology and staging of 473 patients at the National Cancer Institute. **Cancer**, **50**:2699-2707, 1982.
- BANKS, PM- Diagnostic applications of an immunoperoxidase method in hematopathology. **J. Histochem. Cytochem.**, **27**:1192-1194, 1979.
- BANKS, PM- Histopathology of malignant lymphomas. In: Williams JW, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA, (Eds.) **Hematology**. 4th Ed, New York, McGraw-Hill Publishing Company:1031-1039, 1990.
- BARCLAY, AN; WILLIS, AC & WILLIAMS, AF- Lymphocyte specific heterogeneity in the rat leucocyte common antigen (T 200) is due to differences in polypeptide sequence near the NH<sub>2</sub>-terminus. **EMBO**, **6**:1259-1264, 1987.
- BLUTH, RF; CASEY, TT & McCURLEY, TL- Differentiation of reactive from neoplastic small-cell lymphoid aggregates in paraffin-embedded marrow particle preparations using L-26 (CD 20) and UCHL-1 (CD 45 RO) monoclonal antibodies. **Am J. Clin. Pathol.**, **99**:150-156, 1993.
- BORING, CC; SQUIRES, TS & TONG, T- Cancer statistics. **Cancer J. Clin.**, **41**:19-36, 1991
- BROWN, TC; PETERS, MV; BERGSAGEL, DE & REID J- A retrospective analysis of clinical results in relation to the Rappaport histological classifications. **Br. J. Cancer**, **31** (Suppl. II):174-186, 1975.
- BROWN, DC; HERYET, A; GATTER, KC; MANSON, RA- The prognostic significance of immunophenotype in high grade non-Hodgkin's lymphoma. **Histopathology**, **14**:621-627, 1989.
- BRUIN, PC; NOORDUYN, AL; van der VALK, P; van HEERDE, P; van DIEST, PJ; van de SANDT, M; OSSENKOPPELE, GJ.- Non-cutaneous T cell lymphomas. **Cancer**, **71**:2604-2612, 1993.
- BRUMINI, R (Ed.)- Câncer no Brasil: dados histopatológicos (1976-1980). Rio de Janeiro, Cia Nac. Combate Câncer, Min. Saúde, 1982.

- CARTUN, RW; COLES, FB & PASTUSZAK, WT- Utilization of monoclonal antibody L-26 in the identification and confirmation of B cell lymphomas. A sensitive and specific marker applicable to formalin and B5 fixed, paraffin embedded tissues. **Am. J. Pathol.**, 129:415-421, 1987.
- CATOVSKY D- Immunological markers. In: Catovsky D, Foa R, (Eds.) **The lymphoid leukaemias**. 1th Ed, London, Butterworths:2-31, 1990.
- CHADBURN, A; HUSAIN, S & KNOWLES, DM- Monoclonal antibody OPD4 detects neoplastic T cells but does not distinguish between CD4 and CD8 neoplastic T cells in paraffin sections. **Hum. Pathol.**, 23:940-947, 1992.
- CLARK, JR; WILLIAMS, ME & SWERDLOW, SH- Detection of B and T cells in paraffin-embedded tissue sections. Diagnostic utility of commercially obtained 4KB5 and UCHL-1. **Am. J. Clin. Pathol.**, 93:53-69, 1990.
- COIFFER, B; BERGER, F; BRYON, PA & MAGAND, JP- T cell lymphomas immunologic, histologic, clinical and therapeutic analyses of 63 cases. **J. Clin. Oncol.**, 6:1584-1589, 1988.
- COIFFER, B; BROWSE, N; PENCHMAUR, M; BERGER, F; BRYON, PA & DIEBOLD, J- Peripheral T cell lymphomas have a worse prognosis than B cell lymphomas: a prospective study of 361 immunophenotyped patients treated with the LNH-84 regimen. **Ann. Oncol.**, 1:45-50, 1990.
- COSMANN, J; JAFFE, ES & FISCHER, KI- Immunological phenotypes of diffuse, aggressive non-Hodgkin's lymphomas: correlation with clinical features. **Cancer**, 54:1310-1317, 1984.
- CUNNINGHAM-RUNDLES, C; SIEGAL, FP; CUNNINGHAM-RUNDLES, S & LIEBERMAN, P- Incidence of cancer in 98 patients with common variable immunodeficiency. **J. Clin. Immunol.**, 7:294-301, 1987.
- DAVEY, FR; GATTER, KC; RALFKIAER, E; PULFORD, KAF; KRISSENSSEN, GW & MANSON, DY- Immunophenotyping of non-Hodgkin's lymphomas using a panel of antibodies on paraffin-embedded tissues. **Am. J. Pathol.**, 129:54-63, 1987.
- DEVESSA, SS; SILVERMAN, DT; YOUNG, JL; POLLACK, ES; BROWN, CC; HORM, JW; PERCY, CL; MYERS, MH; NICKAY, FW & FRAUMARIJ, F- Cancer incidence and mortality trends among whites in the United State, 1947-1984. **J. Natl. Cancer Inst.**, 79:701-779, 1987.

- DEVESSA, SS & FEARS, T- Non-Hodgkin's lymphoma time trends: United States and international data. **Cancer Research**, **52** (suppl.): 5432s-5440s, 1992.
- ELGHETANY, MT; KUREC, AS; SCHUEHFER, MS; FORBES, BA; DUGGAN, DB & DAVEY, FR- Immunophenotyping of non-Hodgkin's lymphomas in paraffin-embedded tissue sections. A comparison with genotypic analysis. **Am. J. Clin Pathol.**, **95**:517-525, 1991.
- ERSBOLL, J; SCHULTZ, HB; HONGAARD, P; NISSEN, NI; HOU-JESEN, K.- Comparison of the Working Formulation of LNH with the Rappaport, Kiel, and Lukes & Collins Classification. Translational value and prognostic Significance Based on Review of 658 Patients Treated at a Single Institution. **Cancer**, **55**: 2442-2458, 1985.
- ERSBOLL, J & SCHULTZ, HB- Non-Hodgkin's lymphomas: Recent concepts on classification and treatment. **Eur. J. Haematol.**, **48**:15-29, 1989.
- FALINI, B & TAYLOR, CR- New developments in immunoperoxidase techniques and their applications. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, **107**:105-117, 1983.
- FILIPOVICH, AH; MATHUR, A; KAMAT, D & SHAPIRO, RS- Primary immunodeficiencies:genetic risk factors for lymphoma. **Cancer Research**, **52** (suppl.):5465-5467, 1992.
- FREEDMAN, AS & NADLER, LM- Immunologic markers in non-Hodgkin's lymphoma. In: James O. Armitage, MD, ed. **Non-Hodgkin's Lymphoma**. W. B. Saunders Company, London. Hematology/Oncology Clinics of North America, 5: 871-888, 1991.
- GERARD-MARCHANT; HAMLIN, I; LENNERT, K; RILKE, F; STANSFELD, AG & van UNNIK, JAM- Classification Of Non-Hodgkin's Lymphoma. **The Lancet**, **17**: 405, 1974.
- GLIMELIUS, B; HAGBERG, H & SUNDSTRÖM C- Morphological classification of non-Hodgkin malignant lymphoma. II. Comparison between Rappaport's classification and Kiel classification. **Scand. J. Haematol**, **30**:13-24, 1983.
- GROGAN, TM; FIELDER, K; RANGEL, C- Peripheral T-cell lymphoma: aggressive disease with heterogeneous immunotypes. **Am. J. Pathol.**, **83**: 279-288, 1985.
- HALUSKA, FG; TSUJIMOTO, Y & CROCE CM- The molecular genetics of non-Hodgkin's lymphoma. In: I. T. Magrath (Ed), **The Non-Hodgkin's Lymphomas**, 1 th Ed., Baltimore, Williams & Wilkins: 96-108, 1990.

- HAMILTON-DUTOIT, SJ & PALLESEN G- B cell associated monoclonal antibody L-26 may occasionally label T cell lymphomas. **APMIS**, **95**:1033-1036, 1989.
- HASTRUP, N; HAMITON-DUTOIT, SJ; RALFKISER, W & PALLESEN G- Peripheral T cell lymphomas: An evaluation of reproducibility of the updated Kiel classification. **Histopathology**, **18**:99-105, 1991.
- HOOVER R & FRAUMENI JF- Risk of cancer in renal transplant recipients. **The Lancet**, **1**:55-57,1973.
- HORMING, SJ; WEISS, LM; CRABTREE GS, WARNKE, RA- Clinical and phenotypic diversity of T-cell lymphomas. **Blood**, **67**:1578-1582, 1986.
- HSU, SM; RAINE, L & FANGER, H- A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **Am. J. Clin. Pathol.**, **75**:734-8,1981.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER- Cancer Incidence In Five Continents **IARC**, **4**, Lyon, 1982.
- ISHII, Y; TAKAMI, T; YNASA, H; TAKEI, T & KUKUCHI, K- Two distinct antigen system in human B lymphocytes:Identification of cell surface and intracellular antigens using monoclonal antibodies. **Clin Exp. Immunol.**, **58**:183-192, 1984.
- JAFFE, ES- The role of immunophenotypic markers in classification of non-Hodgkin's lymphomas. **Semin. Oncol.**, **17**:11-19, 1990.
- JAFFE, ES; RAFFELD, M; MEDEIROS, LJ & STETLER-STEVENSON M- An overview of classification of non-Hodgkin's lymphomas: An integration of mophorlogical and phenotypical concepts. **Cancer Research**, **52** (suppl):5447-5452, 1992.
- KINLEN, LJ- Immunossuppressive therapy and cancer. **Cancer Surv.**, **1**:565-583, 1982.
- KINLEN, LJ- Incidence of cancer in reumathoid arthritis and other disorders after immunossuppressive treatment. **Am J. Med.**, **78**(suppl. 1A):44-49,1985.
- KLEIN, J- Blood cells and their origin. In: Klein J (Ed.) **Immunology**. 1th ed, London, Blackwell Scientific Publications:8, 1990. (I)

- KLEIN, J- Lymphocytes and the rest. In: Klein J (Ed.) **Immunology**. 1th ed, London, Blackwell Scientific Publications:29, 1990. (II)
- KRAJEWSKI, AS; MYSKOW, MW; CACHIA, PG; SALTER, DM; SHEEHAN, T; DAWAR, AE- T-cell lymphoma: morphology, immunophenotype and clinical features. **Histopathology**, **13**:19-41, 1988.
- KRÜGER, GRF; BERGHOLZ, M; SCHWARZE, EW & BRITTINGER, G (Kiel Lymphoma Study Group)- Histopathological correlation of the Kiel with original Rappaport classification of malignant non-Hodgkin lymphoma. **Blut**, **43**:167-181, 1981.
- LAUDER, I- Classification and histological diagnosis of malignant lymphomas. In: Habeshaw JA, Lauder I (Eds.) **Malignant Lymphomas**. 1th, New York, Churchill Livingstone Inc:32-47, 1988.
- LEITH, C; SPIER, C; GROGAN, T; et al.- Diffuse small cleaved cell lymphoma: A heterogeneous disease with distinct biologic subsets. **J. Clin. Oncol.**, **10**:1259-1265, 1992.
- LENNERT, K; MOHRI, N; STEIN, H & KAISERLING, E- The Histopathology of malignant lymphoma. **Br. J. Haematol**, **31** (suppl):193-203, 1975. (II)
- LENNERT, K; STEIN, H & KAISERLING, E- Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata. **Br. J. Cancer**, **31** (suppl):29-43, 1975. (I)
- LENNERT, K- **Malignant Lymphoma Other Than Hodgkin's Disease**. 1th Ed, Berlin, Springer - Verlag, 1978.
- LENNERT K & FELLER AC **Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas** (Based on the Updated Kiel Classification) 2th Ed, Berlin, Springer- Verlag, 1992.
- LEONARD, RCF; CUZICK, J; MACKLENNON, ICM; VANHEGAN, RI; MACKIE, PH; MACORMICK, CV & Oxford Lymphoma Group- Prognostic factors in non-Hodgkin's lymphoma: the importance of symptomatic stage as an adjunct to the Kiel histopathological classification. **Br. J. Cancer**, **47**:91-102, 1983.
- LESTER, JE & ULTMANN, JE- Lymphoma. In: Williams JW, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA, eds. **Hematology**. 4th Ed, New York, McGraw-Hill Publishing Company:1067-1088, 1990

- LIEBERMAN, PH; FELLIPPA, DA; STRAUS DJ; THALER, HT; CIRINCIONE, C & CLARKSON, B- Evaluation of malignant lymphomas using three classifications and the Working Formulation. 482 cases with median follow-up of 11.9 years. **Am. J. Med.**, **81**:365-380, 1986.
- LINDER, J; YULING, YE, Y; HARRINGTON, DS; ARMITAGE, JO & WEISENBURGER, DD- Monoclonal antibodies reactive in routinely processed tissue sections of malignant lymphoma with emphasis on T cell lymphomas. **Human Pathol.**, **18**:808-814, 1987. (I)
- LINDER, J; YULING, YE; Y; HARRINGTON, DS; ARMITAGE, JO & WEISENBURGER, DD- Monoclonal antibodies marking T lymphocytes in paraffin-embedded tissue. **Am. J. Pathol.**, **127**:1-8, 1987. (II)
- LINDER, J; YULING, YE, Y; HARRINGTON, DS; ARMITAGE, JO & WEISENBURGER, DD- Monoclonal antibodies marking B cell non-Hodgkin's lymphoma in paraffin-embedded tissue. **Mod. Pathol.**, **1**:29-34, 1988.
- LIPPMAN SM; MILLER, TP; SPIER, CM; SLYNER, DJ & BROGAM, TM- The prognostic significance of the immunotype in diffuse large cell lymphoma: a comparative study of the T cell and B cell phenotype. **Blood**, **72**:436-441, 1988.
- LUKES, RJ & COLLINS, RD- New approaches to the classification of the lymphomata. **Br. J. Cancer**, **31** (suppl II):1-27, 1975
- LUKES, RJ; PARKER, TAYLOR, TINDLE, CRAMER, LINCOLN- Immunologic approach to non-Hodgkin lymphoma and related leukemias. Analysis of the results of multiparameter studies of 425 cases. **Seminars in Hematology**, **15**:322-351, 1978.
- LUNA, LG- **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3 ed. New York, MacGraw-Hill, 1968
- MACHADO, JC- Ocorrência dos linfomas Malignos não Hodgkin segundo a classificação de Lennert (Kiel) em São Paulo. **Rev. Bras. de Cancerologia**, **28**:11-17, 1978.
- MAGRATH, I- Lymphocyte ontogeny: a conceptual basis for understanding neoplasia of the immune system. In I. T. Magrath (Ed), **The Non-Hodgkin's Lymphomas**, 1th Ed, Baltimore, Williams & Wilkins:29-68, 1990.
- MAGRATH, I- Molecular basis of lymphomagenesis. **Cancer Research**, **52** (suppl):5529-5540, 1992.

- MANSON, DY & GATTER, KC- The role of immunocytochemistry in diagnostic pathology. **J. Clin. Pathol.**, 40: 1042-1054, 1987.
- MANSON, DY; CONIANS-BITTER, WM; CORDELL, JL; VERHOEVEN MAJ & VANDOUAGENT, JM- Antibody L-26 recognizes an intracellular epitope on the B-cell associated CD-20 antigen. **Am J. Pathol.**, 136:1215-1222, 1990.
- MONTALBAN, C; OBESO, G; GALLEGO, A; CASTRILLO, JM; BELLAS, C & RIVAS, C- Peripheral T cell lymphoma: A clinicopathological study of 41 cases and evaluation of the prognostic significance of the updated Kiel classification. **Histopathology**, 22:303-310, 1993.
- MORRELL, D; CROMARTIE, E & SWIFT, M- Mortality and cancer in 263 patients with ataxia telangectasia. **J. Natl. Cancer Inst.**, 77:89-92, 1986.
- MUSSHOFF, KV; STOTZIGEN, H; VOLLMER, S & UMBACH, H -Investigation results of a compararison made between the Kiel and Rappaport classifications of non Hodgkin's lymphomas, together with clinical data. **J. Cancer Research Clinical Oncology**, 100:167-204, 1981.
- NASH, JRG- An immunohistological study of non-Hodgkin's lymphomas: correlation of morphological appearances and immunophenotype in 148 cases. **Histopathology**, 10:793-813, 1986.
- NATHAWANAMI, BN; KIM, H & RAPPAPORT, H- Malignant lymphoma lymphoblastic. **Cancer**, 38:964-983, 1976.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE - (NCI) non-Hodgkin's classification project writing comminttee-classification of non-Hodgkin's lymphoma. Reproducibility of major classification systems. **Cancer**, 55:91-95, 1985.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE: (NCI) Cancer statistics review, 1973 -1988. In: National Cancer Institute eds. NHI publication. 1th Ed, Bethesa, MD National Cancer Institute:91-2789, 1991.
- NGAN, BY; PICKER, LJ; MEDEIROS, J & WARNKE, RA- Immunophenotypic diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma in paraffin sections. **Am. J. Clin. Pathol.**, 91:579-583, 1989.
- NGENDAHAAYS, P & SCHAUZ, R- Pattern of lymphomas in Rwanda. **Bull Cancer Paris**, 79:1087-1096, 1992.

- NORTON, AJ & ISAACSON, PG- An immunocytochemical study of T cell lymphomas using monoclonal and polyclonal antibodies effective in routinely fixed wax embedded tissues. **Histopathology**, 10:1243-1260, 1986.
- NORTON, AJ; RAMSAY, AD; SMITH, SA; BEVERLEY, PCL & ISAACSON, PG- Monoclonal antibody (UCHL-1) that recognizes normal and neoplastic T cells in routinely fixed tissues. **J. Clin. Pathol.**, 39:399-405, 1986.
- NORTON, AJ & ISAACSON, PG- Monoclonal antibody L-26: An antibody that is reactive with normal and neoplastic B lymphocytes in routinely fixed and paraffin wax embedded tissue. **J. Clin. Pathol.**, 40:1405-1412, 1987. (I)
- NORTON, AJ & ISAACSON, PG- Monoclonal antibody L-27: An antibody recognizing the CD 20 antigen which is reactive with normal and neoplastic B-lymphocytes in routinely fixed and wax-embedded tissues. **J. Pathol.**, 152:202-203, 1987. (II)
- NORTON, AJ & ISAACSON, PG- This immunocytochemical diagnosis of malignant lymphoma in routinely processed tissue. (letter to the editor) **J. Pathol.**, 151:240-242, 1987. (III)
- NORTON, AJ & ISAACSON, PG- Lymphoma phenotyping in formalin fixed and paraffin wax embedded tissues: II. Profiles of reactivity in various tumour types. **Histopathology**, 14:557-579, 1989. (I)
- NORTON, AJ & ISAACSON, PG- Lymphoma phenotyping in formalin fixed and paraffin patterns. **Histopathology**, 14:437-446, 1989. (II)
- O'REILLY, SE & CONNORS, JM- Non-Hodgkin's lymphoma I: characterisation and treatment. **BMJ**, 304: 1682-1686, 1992.
- OHSAWA, M; AOZASA, K; SAEKI, K; TSEYIMURA, T; TAMAI, M & KAWANO, K- Distribution of histologic subtypes and sex ratio in various primary sites of lymphocytic lymphoma. **J. Surg. Oncol**, 49:127-130, 1992.
- OSTERMAN, B; DIGE, U; RAOS, G; JONSSON, H & LEUVER, P- Non-Hodgkin's lymphoma in northern Sweden. A retrospective analysis of morphologic diagnosis in material from the Swedish Cancer Registry. **Acta Oncol.**, 32:393-398, 1993.
- PALLENSSEN, G- Immunophenotypic markers for characterizing malignant lymphoma, malignant histiocytosis and tumors derived from accessory cells. **Cancer Rev.**, 8:1-65, 1988.

- PERRY, GS; SPECTOR, BD; SCHUMAN, LM; MANDEL, JS; ANDERSON, V; MACHUGH, RB; HANSON, MR; FAHLSTROM, JM; KRIVIT, W & KERSEY, JH- The Wiskott-Aldrich syndrome in the United States and Canada (1982-1979). **J. Pediatr.**, **97**:72-78, 1980.
- PORWIT-KSIAK, A & MIODUSZEWSKA, O- Clinical significance of histologic (Kiel) classification combined with immunologic definition of malignant lymphoma. **Neoplasma**, **30**:173-180, 1983.
- RALPH, SJ; THOMAS, ML; MORTON, CC & TROWBRIDGE, IS- Structural variants of human T 200 glycoprotein (leukocyte common antigen). **EMBO**, **6**:1251-1257, 1987.
- RAPPAPORT, H; WINTER, WJ & HICKS, EB- Lymphoma Follicular. A re-evaluation of its position in the escheme of malignant lymphoma, based on a survey of 253 cases. **Cancer**, **9**:792-821, 1956.
- RAPPAPORT, H- Tumors of the hematopoietic system. In: **Atlas of Tumor Pathology**, Section 3, fascicle 8, pp 9-14. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1966.
- ROSENBERG, SA; BERARD, CW; BROWN, BW; BURKE, J; DORFMAN, RF; GLATSTEIN, E; HOPPE, RT & SIMON, R- National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphoma:summary and description of working formulation for clinical usage. **Cancer**, **49**:2112-2135, 1982.
- SEGAL, GH; STOLER, MH; FISHLEDER, AJ & TUBBS, RR- Reliable and cost-effective paraffin section immunohistology of lymphoproliferative disorders. **Am. J. Surg. Pathol.**, **15**:1030-1041, 1991.
- SERRA, HM; KROWKA, JP; LEDBETTER, J & PILARSKIL, M- Loss of CD45R (LP 220) represent a pos-thymic differentiation event. **J. Immunology**, **140**:1435-1441, 1988.
- SMITH, SH; BROWN, MH; ROWE, D; CALLARD, RE; BEVERLEY, PCL- Functional subsets of human helper-inducer cells defined by a new monoclonal antibody UCHL-1. **Immunology**, **58**:63-70, 1986.
- STANSFELD, AG- Non-Hodgkin's lymphomas: low grade B-cell lymphomas. In: Stanfeld A.G. eds. **Lymph node biopsy interpretation**. 1th Ed, Edinburgh, Churchill Livingstone:228-276, 1985.
- STANFELD, AG; DIELBOLD, J; KAPANCI, Y- Updated Kiel classification for Lymphomas. **Lancet**, **1**:292-293, 1988.

- STEIN, H; LENNERT, K; FELLER, AC & MASON, DY- Immunohistological analysis of human lymphoma: correlation of histological and immunological categories. **Cancer Res.**, 42:98-102, 1984.
- SUCHI, T; LENNERT, K; TU, LY; KIKUCHI, M; SATO, E; STANFELD, AG & FELLER, AC- Histopathology and immunohistochemistry of peripheral T cell lymphomas: a proposal for their classification. **J. Clin. Pathol**, 40:995-1015, 1987.
- TABRIZCHI, H; GUPTA, RK; RAFI, MR- A study of malignant lymphomas in Iran, based on updated Kiel classification. **Virchows Archiv. A Pathol. Anat.**, 419: 451-454, 1991.
- TAYLOR, CR- Immunoperoxidase technique: Practical and theoretical aspects. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, 102:113-121, 1978.
- THOMAS, ML; LEFRANÇOIS, L- Differential expression of leucocyte common antigen family. **Immunology Today**, 9:320-326, 1988.
- THOMAS, ML- The Leukocyte common antigen family. **Annu Rev. Immunology.**, 7:339-369, 1989.
- THOMAS, JO; RAFINDADI, A; HERYET, A; GATTER, KC; MASON, DY- Immunophenotyping of Nigerian cases of non-Hodgkin's lymphomas on paraffin sections. **Histopathology**, 18:505-510, 1991.
- TUBBS, RR; FISHELDER, A; WEISS, RA; SAVAGE, RA; SEBEK, BA & WEIK, JK- Immunohistologic cellular phenotypes of lymphoproliferative disorders. **Am J. Pathol.**, 113:207-215, 1983.
- UCKUN, FM- Regulation of human B-cell ontogeny. **Blood**, 76:1908-1923, 1990.
- VanEYKEN, P; DE WOLF-PEETERS, C; VAN DER OORD, J; TRICOT, G & DESMET, V- Expression of leucocyte common antigen in lymphoblastic lymphoma and small non-cleaved undifferentiated non-Burkitt's lymphoma: an immunohistochemical study. **J. Pathol.**, 151:257-262, 1987.
- WARNKE, RA; GATTER, KC; FALINI, B; HILDRETH, P; WOOLSTON RE; PULFORD, K; CORDELL, JL; COHEN, B; DE WOLF-PEETERS, C & MASON, DY- Diagnosis of human lymphoma with monoclonal antileukocyte antibodies. **N. Engl. J. Med.**, 309:1275-1281, 1983.

- WARNKE, RA; ROUSE RV- Limitations encountered in the application of tissue section immunodiagnosis to the study of lymphomas and related disorders. **Hum. Pathol.**, 16:326-331, 1985.
- WEINSENBURGER, DD- Pathological Classification of non-Hodgkin's lymphoma for epidemiological studies. **Cancer Research**, 52 (suppl): 5456-5464, 1992.
- WEINSENBURGER, DD; LINDER, J; DALEY, DT & ARMITAGE, JO- Intermediate lymphocytic lymphoma: an immunohistologic study with compararison to other lymphocytic lymphomas. **Hum. Pathol.**, 18: 781-790, 1987.
- ZAHM, SH; WEISENBURGER, DD; BABBIT, PA; SAAL, RC; VAUGHT JB; CANTOR, KP; BLAIR AA- A case control study of non-Hodgkin's lymphoma and the herbecide 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4 D) in Eastern Nebraska. **Epidemiology**, 1:349-356, 1990.
- ZHENG, T; MAYNE, ST; BOYLE, P; HOLFORD, TR; LIN, WL & FLANNERY, J- Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma in Connecticut. 1935-1988. **Cancer**, 70:840-849, 1992

**ANEXOS**

ANEXO I. Entidades da Classificação Kiel e seus equivalentes na Classificação de Rappaport

CLASSIFICAÇÃO KIEL	CLASSIFICAÇÃO RAPPAPORT
<b>Baixo Grau</b>	
Linfocítico <ul style="list-style-type: none"> <li>• LLC-B</li> <li>• LLC-T</li> <li>• Leucemia células cabeludas</li> <li>• Micose fungóide e Síndrome Sézary</li> </ul>	Linfoma linfocítico bem diferenciado difuso
Imunocitoma	Linfoma Linfocítico com disproteinemia
Plasmocítico	
Centrocítico	Linfoma linfocítico bem diferenciado nodular ou difuso Linfoma linfocítico pouco diferenciado nodular ou difuso
Centroblastico / Centrocítico <ul style="list-style-type: none"> <li>• Folicular ± difuso</li> <li>• Difuso</li> <li>• ± Esclerose</li> </ul>	Linfoma linfocítico bem diferenciado nodular ou difuso Linfoma linfocítico pouco diferenciado nodular ou difuso Linfoma misto nodular / histiocítico Linfoma histiocítico nodular ou difuso
<b>Alto Grau</b>	
Centroblastico	Linfoma histiocítico nodular ou difuso Linfoma indiferenciado
Linfoblástico <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tipo Burkitt</li> <li>• Tipo cél. convoluto</li> <li>• Não classificado</li> </ul>	Linfoma indiferenciado difuso Linfoma linfocítico pouco diferenciado difuso
Imunoblástico	Linfoma histiocítico difuso

**ANEXO 2.** Entidades da *Working Formulation* e sua equivalência na Classificação de Kiel

<b>WORKING FORMULATION</b>	<b>KIEL</b>
<b>Baixo Grau</b>	
A. Linfoma Maligno; Linfocítico <ul style="list-style-type: none"> <li>• Consistente com LLC</li> <li>• Plasmocitóide</li> </ul>	Linfoma linfocítico, LLC  Imunocitoma
B. Linfoma Maligno Folicular; célula clivada pequena <ul style="list-style-type: none"> <li>• Áreas difusas</li> <li>• Esclerose</li> </ul>	Linfoma Centroblastico/Centrocítico (célula pequena) folicular ± difuso
C. Linfoma Maligno Folicular; Misto, célula grande e pequena clivada <ul style="list-style-type: none"> <li>• Áreas difusas</li> <li>• Esclerose</li> </ul>	Linfoma Centroblastico/Centrocítico (célula pequena) folicular ± difusa
<b>Grau Intermediário</b>	
D. Linfoma Maligno Folicular, célula grande <ul style="list-style-type: none"> <li>• Áreas difusas</li> <li>• Esclerose</li> </ul>	Linfoma Centroblastico / Centrocítico (célula grande) folicular ± difusa Linfoma Centroblastico, folicular
E. Linfoma Maligno Difuso de Células clivadas pequenas <ul style="list-style-type: none"> <li>• Esclerose</li> </ul>	Linfoma Centrocítico (célula pequena)
F. Linfoma Maligno Difuso Misto, Célula grande e pequena <ul style="list-style-type: none"> <li>• Esclerose</li> <li>• Componente célula epitelióide</li> </ul>	Linfoma Centroblastico / Centrocítico Difuso Imunocitoma Polimórfico Linfoma Zona T
G. Linfoma Maligno Difuso de grandes Células <ul style="list-style-type: none"> <li>• Célula clivada</li> <li>• Célula não clivada</li> </ul>	Linfoma Centrocítico (célula grande) Linfoma Centroblastico, difuso

<i>WORKING FORMULATION</i>	<i>KIEL</i>
<b>Alto Grau</b>	
H. Linfoma Maligno de Células Grandes, imunoblástico <ul style="list-style-type: none"> <li>• Plasmocitóide</li> <li>• Célula clara</li> <li>• Polimorfo</li> <li>• Componente célula epitelial</li> </ul>	Linfoma Imunoblástico (B e T) Linfoma Linfoepitelióide Linfoma T Pleomórfico de Grandes Células
I. Linfoma Maligno, Linfoblástico <ul style="list-style-type: none"> <li>• Célula convoluta</li> <li>• Célula não convoluta</li> </ul>	Linfoma Linfoblástico
J. Linfoma Maligno de Célula não clivada pequena <ul style="list-style-type: none"> <li>• Burkitt</li> <li>• Área folicular</li> </ul>	Linfoma tipo Burkitt

**ANEXO 3. Entidades da Classificação Kiel e seu equivalente na Classificação Lokes-Collins**

<b>KIEL</b>	<b>LUKES-COLLINS</b>
<b>Linfomas Células B Baixo Grau</b>	
Linfocítico <ul style="list-style-type: none"> <li>• LLC</li> <li>• Leucemia Prolinfocítica (LPL)</li> <li>• Leucemia Células Cabeludas</li> </ul>	Linfócito B pequeno, LLC-B Linfócito B, Prolinfocítica Linfócito B, Leucemia Células Cabeludas
Imunocitoma	Linfocítico / Plasmocítico
Plasmocítico	
Centroblástico / Centrocítico	Célula Centro-Folicular pequena clivada
Centrocítico	Célula Centro-Folicular pequena clivada
Monocitóide	Linfócito B pequeno, monocitóide
<b>Linfomas Células T Baixo Grau</b>	
Linfocítico <ul style="list-style-type: none"> <li>• LLC</li> <li>• LPL</li> </ul>	Linfócito T pequeno, LLC Linfócito T pequeno, LPL
Célula pequena, cerebriforme (micose fungóide, Síndrome Sézary)	Cerebriforme T
Linfoepitelióide	Linfoepitelióide
Linfoadepatia angioimunoblástica	Linfoma Célula T como IBL
Linfoma Zona T	Sarcoma Imunoblástico T
Célula pequena, pleomófica	Sarcoma Imunoblástico T
<b>Linfomas Células B Alto Grau</b>	
Centroblástico <ul style="list-style-type: none"> <li>• Monomórfico</li> <li>• Polimórfico</li> <li>• Multilombado</li> <li>• Centrocitóide</li> </ul>	Célula Centro-Folicular, não clivada grande Célula Centro-Folicular, não clivada grande Célula Centro-Folicular, clivada grande Célula Centro-Folicular, clivada Grande
Imunoblástico	Sarcoma Imunoblástico B
Linfoma Burkitt	Célula Centro-Folicular, não clivada pequena Burkitt e não Burkitt
Anaplástico célula grande	
Linfoblástico	

KIEL	LUKES-COLLINS
<b>Linfomas Células T Alto Grau</b>	
Pleomófico, célula grande e média	Sarcoma Imunoblástico T
Imunoblástico	Sarcoma Imunoblástico T
Anaplástico célula grande	Sarcoma Imunoblástico T
Linfoblástico	Convoluta T

**ANEXO 4.** Anticorpos monoclonais e policlonais que reagem com tecidos fixado em formalina e parafina

<i>Cluster</i>	<b>Anticorpo</b>	<b>Especificidade Linfóide</b>
CD15	Leu-M1, Tü9	Células Mielóides / Reed-Sternberg
CD20	L26	Células B / Células Dendríticas Foliculares
CD30	Ber H2	Células T e B Ativadas / Histiócitos Ativados
CD43	MT1	Células T / Subpopulação B / Mielomonocíticas
CD45	2B11 + PD7/26	Antígeno Comum Leucocitário
CD45R	4KB5, MB1	Células B / Subpopulação T
CD45RA	MT2	Células B / T
CD45RO	UCHL1	Células T / Mielomonocíticas
CD45 Relacionado	Ki-B3	Células B / Subpopulação T / Mielomonocítica
CD 68	KP1	Macrófagos / Monócitos / Algumas Células B
CDW75	LN1	Células B
	IgM / G / A / E	Cadeias pesadas imunoglobulinas
	Igk / L	Cadeias leves imunoglobulinas
	KiM1p	Monócitos / Macrófagos / Células B Sinusoidais
	KiM4p	Células Dendríticas Foliculares
	Lisozima	Macrófagos / Mielóides / Monócitos
	CD3 policlonal	Células T

*Lennert, K. Feller AC, 1992*

**ANEXO 5. Reatividade dos anticorpos monoclonais T, em relação à ontogenia dos linfócitos T**

	Pró Timócito	Timócito Subcapsular	Timócito Cortical	Timócito Medular	e	Células T Periféricas
<b>CD 7</b>	[Barra contínua]					
<b>CD 2</b>	[Barra contínua]					
<b>CD 5</b>	[Barra contínua]					
<b>CD 3</b>	[Barra contínua]					
<b>CD 1</b>	[Barra contínua]					
<b>CD 8</b>	[Barra contínua]					
<b>CD 4</b>	[Barra contínua]					
<b>Transferrina</b>	[Barra contínua]					
<b>Tdt</b>	[Barra contínua]					
<b>Neoplasias</b>	LLA-T		LBL		LLC-T/MF/LTP/LTA/LAAI	

**ANEXO 6. Reatividade dos anticorpos monoclonais B, em relação à ontogenia dos linfócitos B**

