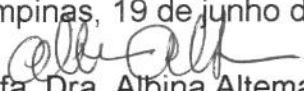


ANA CLÁUDIA PENTEADO BARBOSA KULKA

***CARACTERÍSTICAS DO LINFOMA NASAL DE CÉLULAS T/NK
ENTRE BRASILEIROS***

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas da aluna **Ana Cláudia P. B Kulka**.

Campinas, 19 de junho de 2002.


Prof. Dra. Albina Altemani
Orientadora

CAMPINAS

2002

i
UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

ANA CLÁUDIA PENTEADO BARBOSA KULKA

***CARACTERÍSTICAS DO LINFOMA NASAL DE CÉLULAS T/NK
ENTRE BRASILEIROS***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas.*

ORIENTADORA: PROF^a DR^a ALBINA MESSIAS ALTEMANI

CAMPINAS

2002

UNIDADE BE
Nº CHAMADA I/UNICAMP
K959c
V EX
TOMBO BCI 51296
PROC 16.837/02
C DX
PREÇO R\$ 11,00
DATA 24/10/02
Nº CPD

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

CM00175712-1

BIB ID 265421

K959c Kulka, Ana Cláudia Penteado Barbosa
Características do linfoma nasal de células t/nk entre brasileiros /
Cláudia Penteado Barbosa Kulka. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Albina Messias Altemani
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Linfoma. 2. Célula. 3. Nariz. I. Albina Messias Altemani. .II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

UNICAMP
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS MÉDICAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Banca examinadora da de Mestrado

Orientador : Prof. Dr. Albina Messias de Almeida Milani Altemani

Membros:

1. Profa. Dra. Albina Messias de Almeida Milani Altemani

2. Prof. Dr. José Vassallo

3. Profa. Dra. Celina de Paula Azevedo Sollero

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 19/06/02

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Claudionor e Cleusa, pelo apoio e educação,
os quais nunca me faltaram.*

*Ao meu esposo, **Maurício**, pelo incentivo,
compreensão e carinho.*

À Profª Drª Albina Messias Altemani, por sua orientação segura e objetiva na realização desta dissertação e seu exemplo de espírito científico, didático e humano.

Ao Prof. Dr. José Vassallo, pelo auxílio na elaboração do trabalho.

Ao biólogo Cristiano Aparecido Chagas do laboratório de imunoistoquímica, pela sua paciência e fundamental trabalho técnico de realização das reações imunoistoquímicas.

À secretária Maria do Carmo M. da Silva, pela assistência administrativa.

	<i>PÁG</i>
RESUMO.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO.....	18
3. OBJETIVOS DO TRABALHO.....	20
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	22
5. RESULTADOS.....	28
6. DISCUSSÃO.....	38
7. CONCLUSÕES.....	44
8. SUMMARY.....	46
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

BCIP-NBT	-	Bromo-cloro-indolilfosfato e nitroblue tetrazolium
BSA	-	"Bovine Serum Albumine"
CHOP-BLEO	-	Ciclofosfamida, Doxorubicina, vincristina, prednisona e bleomicina
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
EBER	-	"Epstein Barr Encoded RNA"
EBNA	-	"Epstein Barr Nuclear Antigens"
EBV	-	"Epstein Barr Vírus"
FCM	-	Faculdade de Ciências Médicas
HE	-	Hematoxilina –Eosina
IPI	-	Índice Prognóstico Internacional
LMP	-	"Latent Membrane Proteins"
LNH	-	Linfoma não Hodgkin
M/F	-	Masculino/Feminino
NK	-	"Natural Killer"
PBS	-	"Phosphate Buffered Saline"
REAL	-	"Revision Europe-América Lymphomas"
RXT	-	Radioterapia
TNF	-	"Tumor necrosis Factor"
VACOP-B	-	Vincristina, Adriamicina, Ciclofosfamida, Oncovin, Prednisona e Bleomicina

	<i>PÁG</i>
Tabela 1: Inunofenótipo e análise do EBV em linfomas comprometendo a região medial da face.....	30
Tabela 2: Aspectos clínicos dos pacientes.....	31

	PÁG
Figura 1: Curva de sobrevida dos linfomas T/NK e dos linfomas B da região medial da face.....	32
Figura 2: Linfoma nasal de células T/NK (HE x 330).....	33
Figura 3: Linfoma nasal de células T/NK (imunoistoquímica-técnica complexo avidina-biotina).....	34
Figura 4: Linfoma nasal de células T/NK (hibridização "in situ", sonda RNA EBV-EBER-1).....	35



RESUMO

Os linfomas de células T/NK são altamente associados ao EBV e mais freqüentes na Ásia do que no Ocidente. Na América Central e do Sul há raros estudos sobre o linfoma T/NK, os quais mostraram predominância acentuada deste fenótipo nos descendentes dos ameríndios, favorecendo a hipótese da predisposição racial para a doença. O presente trabalho estuda 25 linfomas não Hodgkin, que comprometiam a região medial da face. O linfoma de células T/NK (16/25) foi mais freqüentemente encontrado do que o linfoma de células B (9 casos, todos de grandes células B) e ocorreu predominantemente na cavidade nasal. Na análise imunoistoquímica, os linfomas de células T/NK foram positivos para CD3 e CD56 e apresentavam numerosas células linfóides EBER - 1 positivas. Embora a doença estivesse localizada em 61% dos casos no momento do diagnóstico, não foi observada nenhuma tendência para cura. A distribuição racial dos pacientes com linfoma de células T/NK foi semelhante àquela encontrada no linfoma de células B. Linfócitos EBV positivos foram encontrados mais freqüentemente na adenóide do que na amígdala, enquanto que as lesões inflamatórias do palato e nariz foram negativas. Na nossa amostra a freqüência relativa de linfoma sinonasal de células T/NK *versus* células B foi alta e semelhante àquela observada em outros países da América Latina. Entretanto, não encontramos qualquer associação racial com o fenótipo T/NK e o tumor apresentou comportamento agressivo semelhante ao que é descrito na Ásia. A alta freqüência de linfócitos EBV positivos no tecido linfóide da nasofaringe (adenóide) sugere que este tecido poderia servir de reservatório para o vírus.



1. INTRODUÇÃO

A porção medial da face, compreendendo cavidade nasal, palato, nasofaringe e seios paranasais pode ser acometida por lesões necrosantes e destrutivas, que constituem a síndrome clínica denominada de granuloma necrosante da linha média. Várias doenças (cerca de 40) podem causar este quadro, sendo que as mais importantes são: linfoma, granulomatose de Wegner, abuso de cocaína, lesão destrutiva idiopática da linha média e doenças infecciosas (mucormicose, lepra e sífilis) (MILLS e FECHENER, 1994).

A incidência dos linfomas que acometem esta região da face é variável entre as diferentes áreas geográficas (ARBER et al 1993). Os linfomas não Hodgkin sinonasais são mais freqüentes no Peru, China e Japão (6,7 a 8% de todos os linfomas) (HO et al 1984, MISSAD et al 1984, NG et al 1986) do que nos Estados Unidos, onde a incidência é de 1,5% (FRIERSON et al 1984). Em relação ao fenótipo destes linfomas sinonasais, também se observa a mesma variação geográfica. Nos Estados Unidos e Alemanha há predomínio da linhagem B, enquanto que no Peru, Guatemala, México e Ásia a maioria é T ou de células NK (natural killer) e freqüentemente apresentam crescimento angiocêntrico (NAVARRO-ROMAN et al 1994, ARBER et al 1993, JAFFE et al 1996, MOSQUETA-TAYLOR et al 1997). Na literatura, este linfoma T ou NK médio-facial tem recebido várias denominações: lesão imunoproliferativa angiocêntrica (graus 2 e 3), reticulose polimórfica, granuloma letal da linha média, reticulose maligna da linha média, linfoma de células T nasal, linfoma angiocêntrico e, mais recentemente, linfoma nasal T/NK (EICHEL et al 1966, KASSEL et al 1969, DE REMEE et al 1978, JAFFE 1984, JAFFE et al 1996, FERRY e HARRIS 1997).

Estes vários nomes que o linfoma nasal T/NK tem recebido tentam, na verdade, descrever as características da doença, ou seja, uma lesão freqüentemente agressiva, que causa destruição das estruturas médio-faciais, histologicamente constituída por infiltrado polimórfico, que freqüentemente tem crescimento angioinvasivo e destrutivo (JAFFE et al 1996, FERRY e HARRIS 1997). Linfoma T/NK, semelhante ao nasal, também pode ocorrer em outros sítios extranodais, tais como, pele, testículo, trato gastrointestinal e tecidos moles (SHNEIDER et al 1993, NAKAMURA et al 1995, JAFFE et al 1996, CHAN et al 1996, FERRY e HARRIS 1997).

Morfológicamente o linfoma T/NK nasal é caracterizado por um infiltrado misto, contendo quantidades variáveis de linfócitos pequenos com aparência normal, células linfóides atípicas grandes, médias e pequenas (que freqüentemente têm citoplasma claro), plasmócitos, histiócitos e eosinófilos (JAFTE et al 1996, FERRY e HARRIS 1997). Os casos que apresentam predomínio de células linfóides pequenas e médias são os mais difíceis de distinguir dos processos inflamatórios ou infecciosos que acometem a região médio facial (JAFTE et al 1996). Outras características deste linfoma são: invasão e destruição da parede dos vasos sangüíneos pelas células linfóides atípicas e necrose (FERRY e HARRIS 1997). Esta última está presente em virtualmente todos os casos e geralmente tem padrão zonal, sugerindo patogênese vascular (JAFTE et al 1996, FERRY e HARRIS 1997). Entretanto, como em alguns casos é possível observar necrose sem angioinvasão, também tem sido sugerido que esta poderia ser causada por produção aumentada de citocinas (tais como $TNF\alpha$) pelas células linfóides atípicas infectadas pelo vírus Epstein-Barr (EBV) (JAFTE et al 1996)

O **fenótipo antigênico** do linfoma T/NK nasal é característico. As células neoplásicas são freqüentemente positivas para CD 56, que é um marcador encontrado nas células NK, expressam alguns antígenos associados as células T, tais como CD45RO, CD2 e CD3 (este último apenas o componente citoplasmático em secções de parafina, pois o CD3 de superfície é geralmente negativo) e ocasionalmente podem ser positivas para CD7, CD4 e CD8 (KANAVAROS et al 1993, JAFTE et al 1996, FERRY e HARRIS et al 1997). Outros marcadores de células NK (CD16 e CD57) são negativos nas células tumorais, assim como outros anticorpos receptores de células T ($\beta F1 - TCR-\alpha\beta$, $TCR\delta 1 - TCR-\gamma\delta$) (NG et al 1988, JAFTE et al 1996, FERRY e HARRIS, 1997).

Quanto às **características genótípicas**, as células neoplásicas não mostram rearranjo clonal de genes receptores de células T ($TCR\beta$) e imunoglobulina (JAFTE et al 1996, FERRY e HARRIS, 1997).

Recentemente, tem-se demonstrado que o linfoma nasal T/NK é altamente associado ao EBV, ou seja seqüências do EBV são identificadas na maioria das células atípicas, em virtualmente todos os casos pela técnica de hibridização in situ, utilizando-se sondas para RNA EBER1/2 (MEDEIROS et al 1992, ARBER et al 1993, CHAN et al 1994, JAFTE et al 1996, FERRY e HARRIS et al 1997).

Quanto à **patogênese**, a distribuição geográfica variada dos linfomas T/NK aliada a sua associação constante com o EBV tem favorecido as seguintes hipóteses: predisposição racial para a doença e uma tendência destas populações mais afetadas estarem mais expostas ao EBV numa fase precoce da vida (ARBER et al 1993, JAFFE et al 1996, FERRY e HARRIS 1997).

VÍRUS EPSTEIN-BARR

O vírus Epstein-Barr (EBV) é um gama herpes vírus comum na população humana (HENLE et al 1968), que causa infecção assintomática na maioria dos casos (ZUR HANSEN et al 1970). Nos países subdesenvolvidos, a soroconversão ocorre geralmente na primeira década de vida, sendo que 90% da população já está infectada na vida adulta (ZUR HANSEN et al 1970).

Biologicamente, o EBV é um ativador celular linfotrópico que transforma linfócitos B em linhagens de células linfocitóides que se multiplicam indefinidamente *in vitro* (imortalização celular) (ANAGNOSTOPOULOS e HUMMEL 1996). O vírus penetra nas células linfóides susceptíveis via receptor do complemento CD3d (CD21). Esta molécula receptora isolada não necessariamente determina a infecção, visto que sua expressão numa variedade de tipos celulares permite a absorção viral, mas não infecção (ANAGNOTOPOULOS e HUMMEL, 1996), favorecendo a hipótese que moléculas acessórias ou fatores de transcrição também podem ser determinantes hospedeiros importantes.

Após a infecção das células linfóides susceptíveis, o DNA viral é transportado para o núcleo, onde persiste como uma molécula circular extra cromossômica (epissoma) (YATES et al 1985). O epissomo consiste de uma sequência longa e outra curta, separadas por uma grande sequência de repetições internas e franqueado por repetições terminais no final do genoma. As repetições terminais contém números variáveis de sequências de 500 pares idênticos de base, os quais servem como sítios de coesão durante o processo de circulização, permitindo a formação de um epissomo.

A célula linfoblastóide imortalizada pelo EBV expressa nove proteínas: 6 antígenos nucleares (EBNP) e 3 proteínas de membrana (LMP 1, LMP 2 e LMP 3) (KIEFF e LIEBOWITZ, 1990). Além destas proteínas, há dois RNAs codificados pelo EBV (EBER 1 e EBER 2), que são encontrados sob forma de numerosas cópias (acima de 10^6 moléculas de EBER) no núcleo das células infectadas latentes (LERNER et al, 1981). A função destas moléculas é desconhecida, porém elas tornam possível a demonstração da infecção pelo EBV, através da hibridização *in situ*, ao nível de uma única célula, em material fixado em formalina e incluído em parafina (WU et al, 1991).

A célula linfoblastóide imortalizada pelo EBV corresponde ao tipo de infecção denominado latente, isto é, aquela na qual não ocorre replicação do vírus e as células não são mortas. A base molecular da imortalização das células B pelo EBV é complexa (STRAUS et al, 1993). Aparentemente, diversos genes virais desregulam os sinais normais de proliferação e sobrevivência em células com infecção latente. A proteína de membrana latente 1 (LMP 1) impede a apoptose das células B através da regulação positiva da expressão do *bcl 2* e ativa vias de promoção do crescimento, que são normalmente deflagradas por sinais derivados das células T. Portanto, a LMP 1 pode induzir tanto o crescimento quanto a sobrevivência das células B infectadas. Além disso, o gene EBNA 2 codificado pelo EBV transativa vários genes do hospedeiro, incluindo ciclina D e membros da família *src* (KNECHT et al 1997), além de também ativar a transcrição da LMP 1.

O linfoma T/NK nasal apresenta numerosas células linfóides EBV positivas, que podem ser detectadas através da técnica de hibridização *in situ* com sondas de oligonucleotídeos para RNA EBV-codificado (EBER 1). Além do linfoma nasal T/NK, outros linfomas não Hodgkin sinonasais e, menos frequentemente, de outros locais do trato aerodigestivo superior podem também apresentar células EBER positivas. Contrastando com o linfoma T/NK nasal CD 56 positivo, que é 100% EBER positivo, apenas 44% dos linfomas T nasais CD 56 negativos e 10% a 60% dos linfomas B nasais/ nasofaríngeos tem sido relatados como EBER positivos (WEISS et al 1992, CHAN et al 1994). A positividade encontrada para o EBV nos linfomas não Hodgkin do anel de Waldeyer é ainda menor (0 a 20%) (WEISS et al 1992, CHAN et al 1994).

Outros tumores nos quais o EBV participa da patogênese são: a forma Africana do linfoma de Burkitt, os linfomas de células B em indivíduos imunossuprimidos (particularmente naqueles com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou submetidos a transplante de órgãos), alguns casos de doença de Hodgkin e carcinomas nasofaríngeos (linfoepitelioma nasofaríngeo). Além do carcinoma nasofaríngeo, também se tem demonstrado a presença do EBV em carcinomas que são morfológicamente semelhantes ao nasofaríngeo (linfoepitelioma – *símile*), porém se encontram em outros órgãos, tais como o estômago e timo.



2. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Os linfomas sinonasais representam um subtipo distinto de linfomas extranodais da cabeça e pescoço. Estes linfomas são subdivididos conforme o fenótipo em de células B, células T e, mais recentemente, células NK (natural killer). O linfoma B predomina nos Estados Unidos e Europa. O fenótipo T/NK é o linfoma sinonasal mais comum na Ásia e em áreas das Américas do Sul e Central, sendo que o Peru e a Guatemala mostram forte predominância deste fenótipo. Nestes dois países, foi relatado que a maioria dos pacientes com linfoma T/NK era descendente de ameríndios (população indígena endógena no Peru e descendentes dos Maias na Guatemala), o que apoia a hipótese de predisposição racial para essa doença. Além disso, recentemente, foi proposto que o linfoma T/NK nos países ocidentais poderia ser menos agressivo quando comparado com aquele da Ásia.

Os seguintes pontos estimularam-nos a determinar o imunofenótipo e os aspectos clínicos - patológicos dos linfomas que comprometem a região medial da face (incluindo nariz, seios paranasais, palato, orofaringe e nasofaringe) numa população brasileira:

- a) a população brasileira tem origem étnica diferente daquela de outros países latino-americanos
- b) a incidência do linfoma de células T/NK não tem sido estudada entre brasileiros
- c) o comportamento do linfoma T/NK não tem sido analisado na América Latina.



3. OBJETIVOS DO TRABALHO

- Determinar a frequência do linfoma de células T/NK na região medial da face
- Verificar o comportamento clínico do linfoma de células T/NK comparando-o com o linfoma de células B da mesma região
- Verificar a distribuição racial do linfoma de células T/NK comparando-o com o linfoma de células B da mesma região



4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

SELEÇÃO DOS CASOS

Os arquivos do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP foram revistos no período de 1988 - 1999, tendo sido separados todos os casos codificados como linfoma não Hodgkin ou granuloma letal da linha média ou reticulose polimórfica, que comprometiam a região medial da face, ou seja, nariz, seios paranasais, palato, orofaringe e nasofaringe. Estes casos foram revistos e classificados conforme as classificações Kiel e REAL para linfoma, bem como pelos critérios do Grupo de Estudo Internacional de Linfoma para os linfomas nasais de células T/NK (JAFJE et al, 1996).

Foram determinados os sítios anatômicos, tipo histológico e imunofenótipo do tumor e a origem racial dos pacientes. Os aspectos clínicos, estadiamento (realizado pela tomografia computadorizada da região facial e abdome, radiografia do tórax e biópsia da medula óssea) e resposta a terapia foram revisados. Foram determinados o estadiamento de acordo com a Ann Arbor Convention e o índice prognóstico internacional (IPI) (SHIPP, 1993). Todos os pacientes foram tratados no Centro de Hematologia da Universidade Estadual de Campinas, tendo sido usado os regimes: CHOP-Bleo ou o VACOP-B com ou sem radioterapia de campo envolvido (região sinonasal e anel de Waldeyer). Foram avaliados a presença de remissão completa e o tempo de sobrevida. A análise de sobrevida foi realizada pelo método de Kaplan-Meier.

Adicionalmente, também foram obtidos, do mesmo arquivo de patologia cirúrgica do mesmo hospital, blocos de parafina de biópsias de lesões não neoplásicas do nariz (6 casos) e do palato (6 casos), 50 adenóides e 25 amígdalas com a finalidade de investigar a frequência da presença de EBV nos linfócitos.

MICROSCOPIA ÓPTICA

Em todos os casos as lâminas coradas por hematoxilina e eosina de uma ou mais biópsias foram examinadas, assim como as lâminas das recidivas.

IMUNOISTOQUÍMICA

Em todos os casos foram realizadas colorações imunoistoquímicas para CD45RO (UCHL - 1, célula T, Dako Corp) e CD 20 (L -26, célula B, Dako Corp). Nos casos em que havia quantidade suficiente de tecido em parafina para outras colorações imunoistoquímicas foram usados os seguintes anticorpos: CD3 (T3e, célula T, Dako Corp), CD8 (T supressor-citotóxico, Dako Corp), CD56 (células NK, Novocastra, Newcastle), NK1 (símile célula natural Killer anti-humano, Dako Corp) e lisosima (Dako Corp). As colorações imunoistoquímicas foram realizadas conforme descrito previamente com o uso da técnica *en visiom* peroxidase, conforme descrito abaixo.

Conforme o seguinte protocolo.

1. Desparafinização dos cortes histológicos com 3µm de espessura, do material incluído em parafina e colocados em lâminas silanizadas (3-aminopropyl-triethoxy-silane-SIGMA), e deixados por 1 h em estufa a 100°C.
2. Passagem em xilol a 100°C
3. Duas passagens em xilol (60°C e temperatura ambiente).
4. Seis passagens em etanol (100%, 100%, 70%, 50%).
5. Lavagem das lâminas em água corrente e destilada.
6. Bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ a 10% (3x3 minutos).
7. Incubação em tampão citrato 10mM, pH 6,0 (microondas).
8. Lavagens das lâminas em água corrente e destilada.
9. Solução salina tamponada pH 7.6 com fosfatos (PBS).
10. Incubação com anticorpo primário, diluído em título estabelecido em tampão PBS contendo albumina bovina BSA a 1% (SIGMA), em câmara úmida (16 a 18 horas) a 4°C

11. Lavagem em tampão PBS.
12. Incubação das lâminas em solução *en visiom* (Dako K 1498).
13. Lavagem em tampão PBS.
14. Incubação das lâminas em solução substrato cromógeno:
3,3'Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) 60mg (SIGMA);
Dimetilsulfóxido (DMSO) 1ml; H₂O₂ a 30% (água oxigenada 20 volumes)
0.5ml, PBS 100ml (5min, 37⁰C, ao abrigo da luz).
15. Lavagem das lâminas em água corrente e destilada.
16. Contracorar com hematoxilina de Meyer.
17. Imersão em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio a 0.5%),
lavando em seguida em água corrente e destilada.
18. Desidratação das lâminas (3 passagens em etanol absoluto e passagens em xilol).
19. Montagem das lâminas.

HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

A hibridização *in situ* foi realizada em secções de parafina de tecidos fixados em formalina utilizando-se uma sonda de oligonucleotídeo para RNA EBV-codificado (EBER-1) (kit HIS sonda EBV, Novocastra) nos linfomas comprometendo a região medial da face, nas biópsias de lesões não neoplásicas do nariz e palato e no tecido linfóide das amígdalas e adenóide. A análise das células positivas foi semiquantitativa, sendo considerado: 0 = nenhuma célula reativa, + = < 20% de células positivas, ++ = 20 a 80% e +++ > de 80%.

A hibridização "in situ" foi realizada conforme o seguinte protocolo:

1. Desparafinização dos cortes em xilol, 2x3 minutos.
2. Hidratação em etanol 99%, 2x3 minutos.
3. Hidratação em etanol em 95%, 2x3 minutos.
4. Imersão em água por 3 minutos.
5. Incubação dos cortes em 100 µl de proteinase k em tampão Tris-HCL 0,05M pH 7,6, por 10 a 15 minutos a 37°C.
6. Imersão em água 2x3 minutos.
7. Desidratação em etanol 95% por 3 minutos.
8. Desidratação em etanol 99% por 3 minutos.
9. Secagem do corte ao ar.
10. Aplicação de 20 µl de sonda, cobrindo-se os cortes em lamínula, deixando-se por toda a noite a 37°C (cerca de 16 horas).
11. Retirada das lamínulas delicadamente com tampão.
12. Lavagem em tampão 0,05 M Tris-HCL-0,3 M NaCl, pH 7,6 (TBS), com 0,1% de Triton X-100, 3x3 minutos.
13. Aplicação de 100µl de tampão TBS, com soroalbumina bovina (BSA) a 3%, 0,1% de Triton X-100 e 20% de soro normal de coelho, por 10 minutos.
14. Retirada do excesso de soro normal e, sem lavagem, aplicação de anticorpo anti-fluoresceína diluído a 1:150 em tampão TBS com BSA 3% e Triton X-100 a 0,1%; incubação por 30 minutos.
15. Lavagem dos cortes em tampão TBS por 2x3 minutos.

16. Lavagem dos cortes em tampão do substrato da fosfatase alcalina pH 9,0 por 5 minutos.
17. Incubação com substrato da fosfatase alcalina (BCIP-NBT, 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate e nitroblue tetrazolium), preparado a 1:50 em tampão Tris-HCL 100 mM, mais $MgCl_2$ 50mM, NaCl 100mM, pH 9,0, mais 1µl de Levamisole (inibidor da fosfatase alcalina) para cada ml de substrato; incubar por toda noite (cerca de 16 horas) à temperatura ambiente.
18. Lavagem em água corrente por 5 minutos.
19. Contra-coloração com hematoxilina de Meyer por um minuto.
20. Passagem em água amoniacal por segundos
21. Montagem no meio aquoso.



5. RESULTADOS

Foram identificados nos nossos arquivos 28 linfomas não Hodgkin (LNH) comprometendo a região medial da face. Destes casos foram excluídos três pela quantidade insuficiente de material para permitir exame imunoistoquímico. Portanto, o presente estudo contém 25 pacientes, sendo que 16 apresentavam LNH de células T e 9 linfomas de células B (tabela 1). Os linfomas sinonasais foram os mais freqüentes - 14 casos (56%) e os restantes ocorreram no palato duro e mole (7- 28%), nasofaringe (3 - 12%) e orofaringe (1-4%). Todos os linfomas de células T (16 casos) eram pleomórficos de células médias e grandes, de acordo com a classificação de Kiel. Baseado no imunofenótipo e na associação com o EBV, 13 dos 16 casos foram diagnosticados como linfoma de células T/NK e 3 casos foram considerados consistentes com linfoma de células T/NK. Nestes últimos, a histologia era típica de linfoma de células T/NK e, adicionalmente, os antígenos de células T foram detectados nas secções de parafina (tabela 1). Os aspectos clínicos e a resposta a terapia estão descritos na tabela 2.

Tabela 1: Imunofenótipo e análise do EBV em linfomas comprometendo a região medial da face.

Linfomas	Nº	EBV	CD56	NK1	CD3	CD45RO	CD8	CD20	Tumor local
T	1	+++	+++	-	+++	++	++	-	Nariz
	2	+++	++	-	+++	++	-	-	Nariz
	3	+++	+	-	+++	++	+	-	Nariz
	4	+++	+++	-	+++	++	+	-	Nariz
	5	++	+	-	+	++	-	-	Palato
	6	++	+++	-	++	+++	+	-	Nariz
	7	++	++	-	++	+	+	-	Palato
	8	++	+++	-	+	++	+	-	Nariz
	9	++	+++	-	+++	+	++	-	Nariz
	10	+++	++	-	+++	+++	+	-	Palato
	11	+++	+++	-	++	++	-	-	Nariz
	12	+++	+++	-	+++	+	+	-	Nariz
	13	+++	+	-	++	++	-	-	*Faringe
	14	NF	NF	NF	NF	+++	NF	NF	Nariz
	15	NF	NF	NF	NF	+++	NF	NF	Palato
	16	NF	NF	NF	NF	+++	NF	NF	Nariz
B	17	-	-	-	-	-	-	+++	Seio Maxilar
	18	-	-	-	-	-	-	++	Seio Maxilar
	19	-	-	-	-	-	-	+++	Seio Maxilar
	20	-	-	-	-	-	-	++	*Faringe
	21	+++	-	-	-	-	-	++	*Faringe
	22	-	-	-	-	-	-	++	**Faringe
	23	-	-	-	-	-	-	++	Palato
	24	NF	NF	NF	NF	NF	NF	++	Palato
	25	NF	NF	NF	NF	NF	NF	+++	Palato

+ = <20% de células neoplásicas, ++ = 20 to 80% e +++ = >80%

NF – não feito * Nasofaringe ** Orofaringe

Tabela 2: Aspectos clínicos dos pacientes.

	T/NK	B
Idade (média)	49 (29-78)	56 (27-85)
Sexo (M/F)	9/4	3/6
Estadiamento de Ann Arbor		
I	8	2
II	0	3
III	3	2
IV	2	2
IPI		
Baixo risco	8	4
Intermediário baixo	4	4
Intermediário alto	1	1
Alto risco	0	0
Tratamento		
CHOP-bleo	6	5
VACOP-B	7	4
RXT	8	4

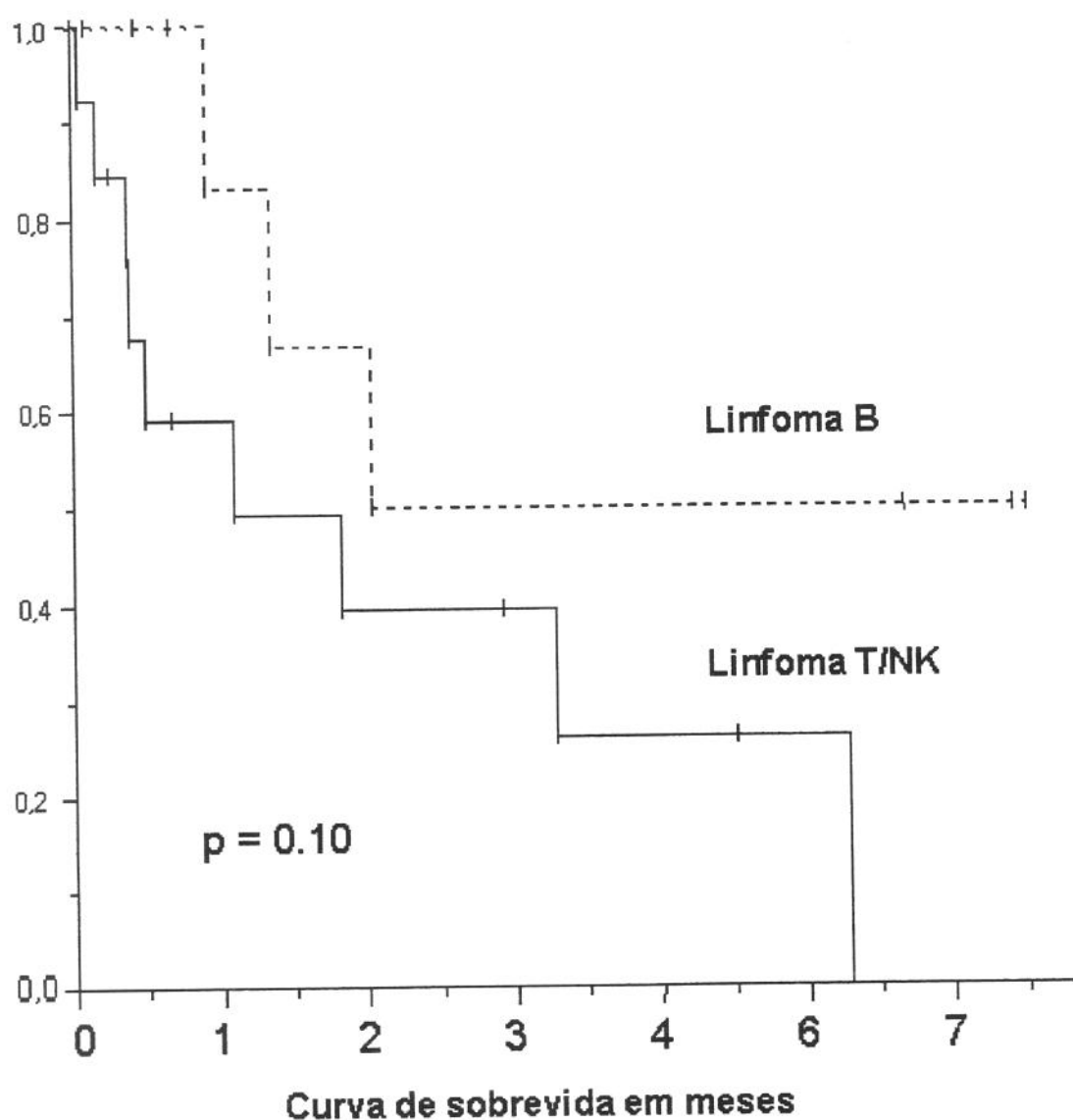


Figura 1: Curva de sobrevida dos linfomas T/NK e dos linfomas B da região medial da face.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

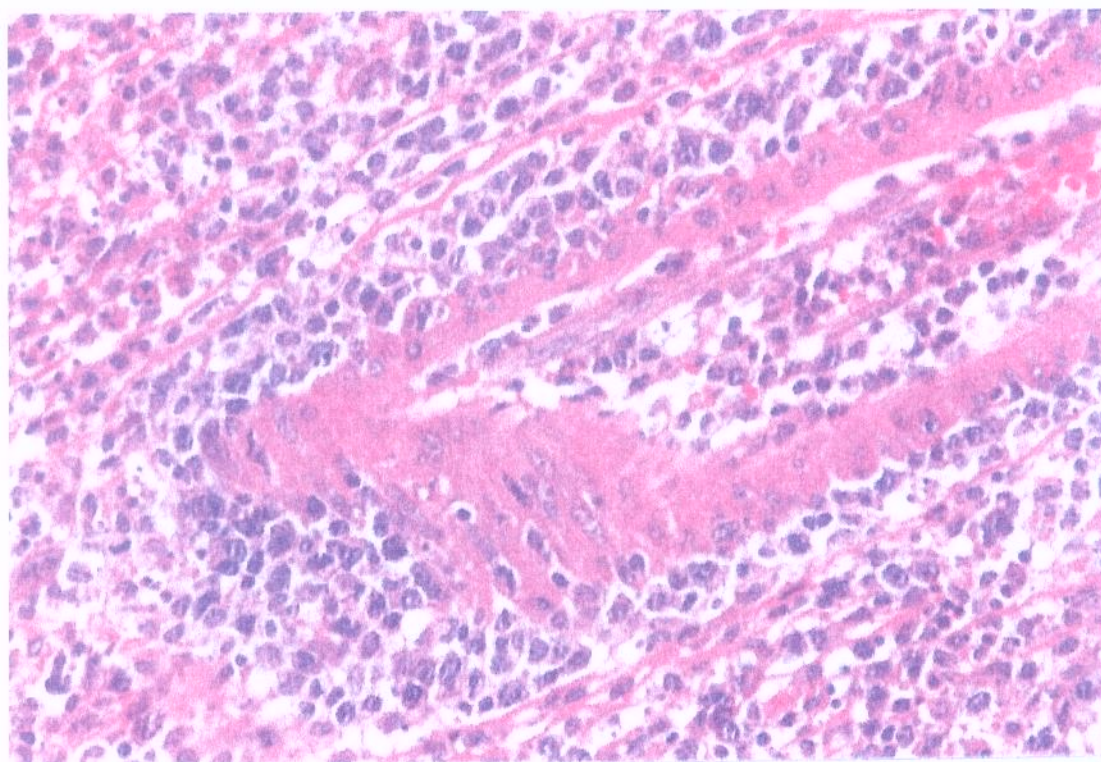


Figura 2: Linfoma nasal de células T/NK. Observar a invasão vascular pelas células linfóides atípicas (HE x 330).



Figura 3: Linfoma nasal de células T/NK. As células linfóides atípicas são CD 56 positivas (imunohistoquímica – técnica complexo avidina-biotina).

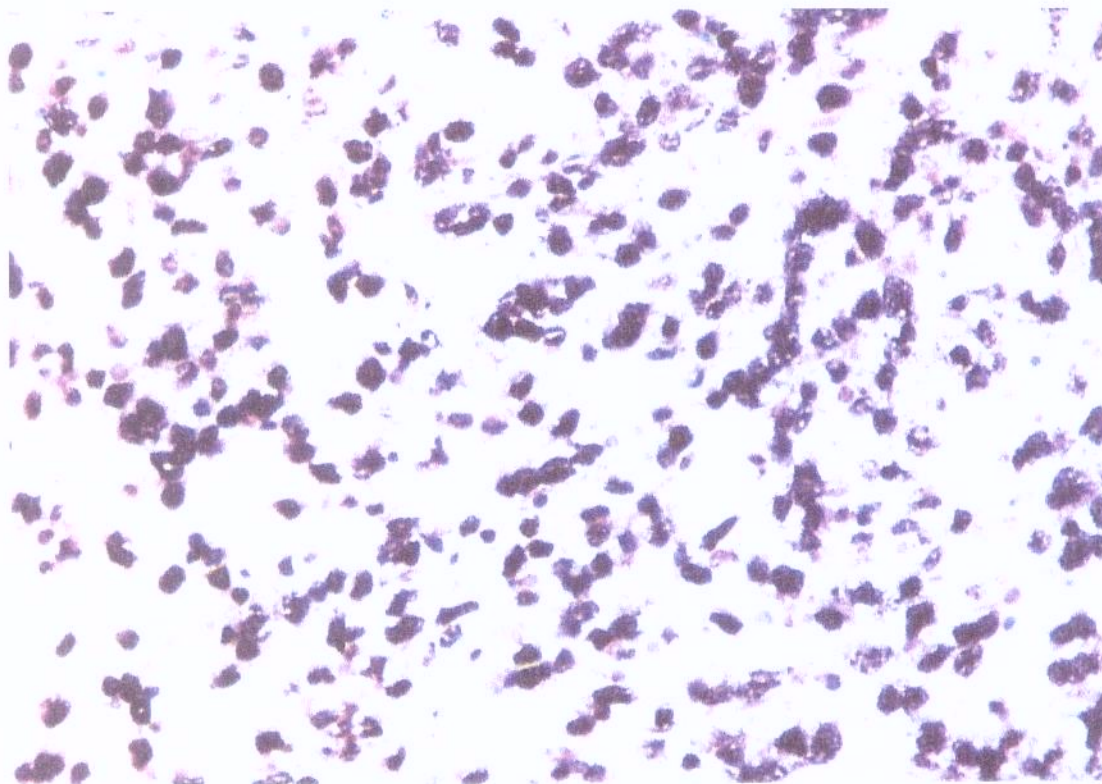


Figura 4: Linfoma nasal de células T/NK. Observar as numerosas células linfóides EBV positivas (hibridização "in situ", sonda RNA EBV-EBER-1).

LINFOMA DE CÉLULAS T / NK (16 CASOS)

O tumor estava localizado predominantemente na cavidade nasal em 11 casos e o restante no palato (4 casos) e nasofaringe (1 caso). Entre estes pacientes, 92% foram definidos como brancos, 1 como mestiço (pardo) e no restante esta informação não foi obtida.

Os aspectos clínicos foram avaliados em 13 pacientes. A idade média foi 49 anos e, de acordo com o estadiamento Ann Arbor, 8 pacientes apresentavam doença localizada. Os linfonodos estavam comprometidos em somente 1 caso, o baço aumentado em 2 casos e a medula óssea comprometida em 1 caso. A maioria dos pacientes apresentavam baixo risco conforme o IPI. Houve remissão completa após quimioterapia em 5/13 dos linfomas de células T/NK. A curva de sobrevida (Figura 1) não mostrou nenhuma tendência a cura quando comparado com o linfoma de células B, porém diferença não foi estatisticamente significativa. A pior sobrevida do linfoma de células T/NK foi principalmente devido a recidivas e resistência a quimioterapia.

Morfologicamente, todos os casos mostravam um infiltrado difuso constituído por uma população polimórfica de células neoplásicas. As células linfóides atípicas variaram de pequenas a células intermediárias e grandes, com núcleo indentado e citoplasma claro. A proporção de células pequenas, intermediárias e grandes variou de casos a caso e, de permeio às células neoplásicas, havia freqüentemente células inflamatórias, incluindo linfócitos, plasmócitos, histiócitos e neutrófilos. Em três casos, o infiltrado inflamatório era proeminente, de tal modo que o linfoma assemelhava-se a processo inflamatório crônico. Foram observados necrose focal ou confluyente em 14 casos (87,5%) e angioinvasão em 10 (62,5%) (Figura 2). Em 13 casos pode ser aplicado o painel imunoistoquímico e os resultados deste estudo imunofenotípico e da detecção do EBV pela hibridização *in situ* estão na tabela 1. Em todos os casos, as células neoplásicas foram positivas para CD45RO, CD3 e CD56 (Figura 3). CD8 foi positivo em 9 casos e NK1 foi negativo em todos. Em todos os 13 casos foi detectada uma grande proporção de células neoplásicas viáveis EBV positivas. (Figura 4).

LINFOMA DE CÉLULAS B (9 CASOS)

Entre os pacientes com linfoma de células B, 5 foram definidos como brancos e no restante essa informação não foi obtida.

A idade média foi de 52 anos e, comparados com o linfoma T/NK, o linfoma B apresentava doença mais avançada. O tumor estava localizado nos seios paranasais (3 casos), palato (3 casos), nasofaringe (2 casos) e orofaringe (1 caso). Outros locais do trato aerodigestivo estavam comprometidos em 3 casos, linfonodos em 2 casos e medula óssea em 1 caso. Remissão completa após quimioterapia foi obtida em 5/9 pacientes. Houve uma tendência para sobrevida longa em alguns pacientes, porém não foi sinificamente melhor do que aquela do linfoma de células T/NK (Figura 1).

Os linfomas de células B eram centrolásticos, conforme os critérios de Kiel, e difuso de grandes células B, pela classificação REAL. Todos os linfomas eram CD20 positivos e os pequenos linfócitos que o infiltravam em quantidades variáveis eram positivos para CD3, CD45RO ou CD8. Células EBV positivas foram encontradas em apenas 1 caso.

TECIDOS NÃO NEOPLÁSICOS

Entre os 25 casos em que as amígdalas foram examinadas, a idade média foi de 5,6 anos (2 - 14), para as 50 adenóides 6,6 anos (2 - 13) e para as 12 lesões inflamatórias do palato e nariz 42 anos (2 - 71). Nas amígdalas, o EBV foi detectado em alguns pequenos linfócitos (< 10% das células) em 10 casos (40%) e nas adenóides em 36 das 50 (72%), também em pequena quantidade de células (< 10%). Em nenhuma das biópsia de lesões inflamatórias do palato e nariz foram encontradas células EBV positivas.



6. DISCUSSÃO

No presente estudo foram encontrados dois fenótipos de linfomas envolvendo a região medial da face: linfoma de células T/NK, que foi o mais comum, e linfoma de grandes células B. O linfoma T/NK comprometeu predominantemente a cavidade nasal, enquanto que os linfomas de células B estavam localizados nos seios paranasais, palato, nasofaringe e orofaringe.

Atualmente, o linfoma T/NK nasal é considerado uma entidade distinta. No passado, os linfomas não B da cavidade nasal eram, simplesmente, considerados uma forma comum de linfoma T periférico. Estes linfomas também foram agrupados sob o conceito unificador de "lesão imunoproliferativa angiocêntrica" e considerados semelhantes à granulomatose linfomatóide pulmonar (que é atualmente admitida ser uma forma de linfoma B rico em células T e EBV positivo). Nas últimas duas décadas, os estudos sobre o "linfoma T nasal" mostraram suas características peculiares, tanto clínica (lesão destrutiva da região medial da face), como patológica (crescimento angiocêntrico, apoptose proeminente, necrose coagulativa), imunológica (CD3 de superfície negativo, CD3 citoplasmático positivo, CD 56 positivo) e molecular (genes TCR da linhagem germinativa e EBV positivo), o que determinou o reconhecimento do linfoma T/NK nasal como uma forma distinta de linfoma.

Histologicamente, no linfoma de células T/NK, o tecido mucoso apresenta-se freqüentemente ulcerado e com um infiltrado denso de células linfóides anormais. Grandes áreas de necrose são comuns e comprometem tanto o tecido tumoral como o normal (CHAN, 1998 ,CHAN et al, 1987 e CHAN , 2000). O espectro citológico do linfoma de células T/NK é amplo. Em alguns casos há predomínio de células pequenas, com núcleo irregular, contendo cromatina densa ou granular e nucléolo pouco evidente, enquanto que em outros predominam células de tamanho médio com núcleo irregular e nucléolo distinto ou são ricos em células grandes, com núcleo vesicular e nucléolo evidente ou podem ter população celular mista. Freqüentemente as células tumorais apresentam moderada quantidade de citoplasma claro e células inflamatórias e corpos apoptóticos são comuns de permeio a elas. O epitélio escamoso da superfície pode apresentar intensas alterações reacionais, como por exemplo, hiperplasia pseudocarcinomatosa exuberante, que deve ser diferenciada de carcinoma epidermóide. Além disso, as glândulas seromucosas da

região mostram-se com aspecto claro, provavelmente devido a efeitos citopáticos das moléculas citolíticas liberadas pelas células do linfoma. Tanto o epitélio da superfície como das glândulas são, não raro, infiltrados pelas células do linfoma. Outro aspecto comum neste tumor é o crescimento angiocêntrico e angioinvasivo, sendo que as células neoplásicas concentram-se em torno e dentro dos vasos sanguíneos, com infiltração e destruição de sua parede.

Entre os asiáticos e em certas áreas da América do Sul e Central, a grande maioria dos linfomas que comprometem a cavidade nasal são de células T/NK - Peru 78% (ARBER et al 1993), Guatemala 88% (VAN DE RIJIN et al 1997) e Asia 90% (NG et al 1986, LI et al 1998), enquanto que nos Estados Unidos e Europa a frequência é menor. Recentemente, em um estudo do Hospital Geral de Massachusetts, 58% dos linfomas nasais eram T/NK ou de linhagem T (QUADRA GARCIA, 1999). No nosso material encontramos 25 linfomas que comprometiam a região medial da face, sendo que 16 pacientes tinham linfoma de células T/NK e 9 linfoma de células B. Os 16 casos de linfoma T/NK apresentavam a seguinte distribuição, quanto ao sítio anatômico - 68,7% no nariz, 25% no palato e 6,2% no nasofaringe. Entretanto, quando consideramos apenas os linfomas originados na cavidade nasal, todos (100%) eram linfomas de células T/NK. Os linfomas de células B (9 casos) acometiam os seios paranasais (33% dos casos), palato (33%), nasofaringe (22%) e orofaringe (11%).

No Peru e Guatemala, países onde o linfoma de células T/NK é o fenótipo predominante na região sinonasal, o tumor acomete principalmente descendentes dos ameríndios e, mais raramente, os mestiços, sugerindo uma predisposição étnica para esta doença (ARBER et al 1993, VAN de RIJIN et al 1997). Em contraste, nos nossos casos, 92% dos pacientes com linfoma T/NK foram definidos como brancos e somente um como mestiço (pardo). Entretanto, é necessário ressaltar que o Brasil é uma das populações mais heterogêneas no mundo, como resultado de cinco séculos de cruzamentos inter-étnicos entre pessoas de três continentes, ou seja, colonizadores Europeus, escravos Africanos e Ameríndios (ALVES SILVA et al 2000). Um estudo recente mostrou que, no Brasil, entre pessoas que se autodefinem como brancas, a contribuição relativa de Europeus, Ameríndios/Asiáticos e Africanos são semelhantes (respectivamente 39%, 33%, 28%)

(ALVES SILVA et al 2000). Baseado nesses achados, é provável que a maioria dos nossos pacientes definidos como brancos seja, na verdade, mestiça Europeu com Ameríndio ou descendente Africano. Portanto, embora nossa população com linfoma de células T/NK tenha características raciais diferentes daquelas de outros países latino-americanos, a nossa frequência de linfoma T/NK na região sinonasal é alta (78,5% - 11/14) e semelhante àquela observada no Peru (linfoma T/NK 78.5%) e na Guatemala (linfoma sinonasal 52% e linfoma T/NK 88%) (ARBER et al 1993, VAN DE RIJIN et al 1997). Além disso, a distribuição racial dos nossos pacientes com fenótipo T/NK foi semelhante àquela encontrada no linfoma de células B. Estes nossos achados não apoiam a hipótese que, na nossa população, a origem étnica tenha um papel chave no desenvolvimento do linfoma T/NK nasal. Provavelmente, fatores não étnicos do hospedeiro e/ou ambientais, os quais poderiam estar ligados ao nível socio-econômico da população possam estar envolvidos na patogênese do linfoma de células T/NK nasal. Como virtualmente todos os linfomas de células T/NK nasal estão associados com o EBV, é possível que a alta frequência de infecções pelo EBV numa idade precoce em países menos desenvolvidos tenha papel na patogênese deste linfoma. Nestes países, a soroconversão geralmente ocorre na primeira década da vida, de tal modo que 90% da população jovem adulta já se encontra infectada (ANAGNOSTOPOULOS et al, 1996). Um achado interessante do nosso trabalho foi a detecção de células EBV positivas numa alta porcentagem de adenóides de crianças, sendo que esta frequência foi mais alta do que aquela observada em amígdalas num grupo etário semelhante. Estes achados estão de acordo com a observação que linfócitos B derivados de adenóides são infectados eficientemente pelo EBV e proliferam muito mais rapidamente do que qualquer outro tipo de célula B (ZEIDLER ET AL, 1996). Os linfócitos B da adenóide mostram altas concentrações de moléculas de adesão e CD 21 (receptor do EBV) e, portanto, podem servir como um reservatório para o vírus (ZEIDLER ET AL, 1996). Contrastando com as adenóides, não encontramos linfócitos EBV positivos nas lesões inflamatórias do nariz e palato. Neste contexto, a hibridização *in situ* com EBER 1/2 pode ser muito útil no diagnóstico diferencial entre lesão inflamatória nasal e linfoma de células T/NK (GAAL ET AL, 2000). No nosso meio, a leishmaniose mucocutânea (causada pela *Leishmania braziliensis*) é comum e os aspectos tanto clínicos como histológicos desta infecção podem ser muito semelhantes aos do linfoma de células T/NK nasal.

Quanto aos aspectos clínicos do linfoma T/NK, este tem sido descrito ocorrendo principalmente em adultos, com a idade média de 53 anos, preferencialmente em homens (relação M / F de aproximadamente de 3:1) e acometendo predominantemente a cavidade nasal ou nasofaringe e, mais raramente, outros sítios, tais como, palato, amígdalas, cavidade oral e língua (CHAN, 1998, CHEUNG et al, 1998, CHAN et al, 1987 e WONG et al, 1992).

Nos nossos casos, todos os pacientes eram adultos, com a idade média de 49 anos (29 - 78 anos) e a maioria homens - M/ : 9/4. Entretanto, quanto a localização, nos nossos casos, embora o sítio preferencial no nariz seja semelhante ao descrito, a ordem de acometimento dos outros locais foi diferente, sendo que o palato foi mais acometido do que o nasofaringe. O linfoma de células T/NK, além de comprometer a cavidade nasal, freqüentemente se estende, em intensidade variável, para os seios paranasais, órbita, cavidade oral, palato e orofaringe, formando grandes lesões ulcerativas e destrutivas, as quais foram anteriormente denominadas de "doença destrutiva médio facial" e "granuloma letal da linha média". Por esse motivo, nos casos mais extensos, torna-se difícil determinar o sítio de origem da neoplasia, provavelmente confundindo-se, por exemplo, as lesões que se iniciaram no nariz com aquelas do palato.

Nos casos relatados na Ásia a maioria dos pacientes encontravam-se nos estágios I/II da doença, a qual apresentava-se comportamento clínico variável, com alguns pacientes aparentemente curados pela radioterapia, porém outros com recaída precoce local ou sistêmica, apesar do tratamento agressivo (CHEUNG et al, 1998 e KWONG et al, 1997). A pele, fígado, trato gastrointestinal e testículo são os sítios preferenciais de disseminação sistêmica. A remissão completa é em torno de 55% e a sobrevida de 5 anos é somente de 30 a 40%. (CHEUNG et al, 1998 e KWONG et al, 1997). Entretanto, numa série recentemente relatada pelo Massachusetts General Hospital, os pacientes com linfoma de células T/NK apresentaram prognóstico relativamente bom, com 73% sem evidência de doença, tendo sido sugerido, pelos autores, que o linfoma de células T/NK poderia ter um comportamento menos agressivo no Ocidente (Quadra-Garcia 1999) do que no Oriente. Nos poucos estudos sobre o linfoma de células T/NK na América Latina não há referências sobre o comportamento clínico do tumor. (ARBER et al, 1993 e VAN de RIJIN et al, 1997). Os nossos achados sobre a evolução clínica do linfoma de células T/NK foram

semelhantes àqueles descritos na Ásia, mostrando ser esta neoplasia uma doença com comportamento agressivo. Embora em metade dos pacientes a doença estivesse localizada no momento do diagnóstico, a curva de sobrevida não mostrou nenhuma tendência a cura, quando comparada com a do linfoma de células B localizado na mesma região. Entretanto, deve-se ressaltar, que apesar desta tendência a um comportamento mais agressivo do linfoma de células T/NK em relação ao linfoma de células B, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Isto pode ser devido ao pequeno número de pacientes estudados na presente série.



7. CONCLUSÕES

- 1 - Na nossa população, o linfoma de células T / NK é o linfoma mais comum da região medial da face (64%), seguido pelo linfoma de grandes células B (36%) e corresponde a 78,5% dos linfomas sinonasais.
- 2 - O linfoma de células T / NK da região medial da face apresenta comportamento agressivo e semelhante ao que tem sido descrito na Ásia, com sobrevida pior que a do linfoma de células B da mesma região, embora a diferença não seja estatisticamente significativa.
- 3 - Não foi encontrada nenhuma associação racial clara com o linfoma de células T / NK, como tem sido reportado no Peru, Guatemala e EUA.



8. *SUMMARY*

Nasal T/NK-cell lymphomas are highly associated with Epstein-Barr virus (EBV). They are more frequent in Asia than in Western countries. In Central and South America there are few studies about nasal T/NK-cell lymphoma and they have shown a strong predominance of this phenotype in Native American descents, supporting the hypothesis of a racial predisposition for the disease. We studied the lymphomas involving midline facial region at a brazilian institution. T/NK cell lymphomas (16/25) were more frequently found compared to B lymphomas (9 cases, all B large cell). T/NK cell lymphomas involved predominantly the nasal region. Histologically they showed angioinvasion and necrosis. All of them were positive for CD3 and CD56 and showed numerous tumor cells labelled by EBER-1. Although disease was localized in 61% at diagnosis, there was no tendency to cure. The racial distribution of patients with T/NK-cell phenotype was similar to that found in B-cell lymphomas. EBV was more frequently found in adenoids than in palatine tonsils. In inflammatory lesions of the nasal and palatal regions EBV was not found. In the present study the relative frequency of T/NK versus B cell sinonasal lymphomas was high and similar to that observed in other Latin American countries. However, there was not any racial association with T/NK-cell phenotype and the tumor showed an aggressive behavior similar to that reported in Asia. The high frequency of EBV-positive lymphocytes in nasopharyngeal lymphoid tissue (adenoids) suggests that they could serve as a reservoir for the virus.



9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES-SILVA, J.; Silva-Santos, M.; Guimarães, P.E.M.; Ferreira, A.C.S.; Bandelt, H.J.; Pena, S.D.J.; Prado, V.F. – The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **Am. J. Genet.**, **67**: 444-461, 2000.
- ANGAGNOSTOPOULOS, I. & HUMMELI, M. – Epstein-Barr vírus in tumors. **Histopathology**, **29**: 297-315, 1996.
- ARBER, D.A.; WEISS, L.M.; ALBÚJAR, P.F.; CHEN, Y.Y.; JAFFE, E.S. – Nasal lymphomas in Peru. High incidence of T-cell immunophenotype and Epstein-Barr virus infection. **Am. J. Surg. Pathol.**, **17**: 392-399, 1993.
- CHAN, J.K. – Natural killer cell neoplasm. **Anat. Pathol.**, **3**: 77-145, 1998.
- CHAN, J.K.C.; YIP, T.T.C.; TSANG, W.Y.W.; ET AL. - Detection of Epstein-Barr viral RNA in malignant lymphomas of the upper aerodigestive tract. **Am. J. Surg. Pathol.**, **18**: 938-946, 1994.
- CHAN, J.K.; NG, C.S.; LAU, W.H.; LO, S.T. – Most nasal-nasopharyngeal lymphomas are peripheral T-cell neoplasms. **Am. J. Surg. Pathol.**, **11**: 418-29, 1987.
- CHAN, J.K. – **Tumors of the lymphoreticular system, including spleen and thymus.** In: Fletcher CDM, ed. *Diagnóstico Histopatologia de tumores*, ed. 2nd. London: Churchill livingstone, 1099-316, 2000.
- CHEUNG, M. M.; CHAN, J.K.; LAU, W. H.; FOO, W.; CHAN, P.T.; NG, C. S.; NAGAN, R. K. – Primary non-Hodgkin's lymphoma of the nose and nasopharynx: Clinical features, tumor immunophenotype, and treatment outcome in 113 patients. **J. Clin. Oncol.**, **16**: 70-77, 1998.
- DE REMEE, R.A.; WEILAND, L.H.; MCDONALD, T.J. - Polymorphic reticulosis, lymphomatoid granulomatosis: two diseases or one? **Mayo Clin. Proc.** , **53**: 643-40, 1978.
- FELLBAUM, C.; HANSMANN, M.L.; LENNERT, K. – Malignant lymphomas of the nasal cavity and paranasal sinuses. **Virchows Arch [A] Pathol. Anat. Histopathol.**, **414**:399-405, 1989.

- FERRY, J. & HARRIS, N. - **Atlas of lymphoid hyperplasia and lymphoma.** Philadelphia: W. B. Saunders: 138-144, 1997.
- FRIERSON, H.F.; MILLS, S.E.; INNES, D.J. - Non-Hodgkin's lymphomas of the sinonasal region: histologic subtypes and their clinicopathologic features. **Am. J. Clin. Pathol.**, **81**: 721-727, 1984.
- GAAL, K.; SUN, N.C.J.; HERNANDEZ, A.M.; ARBER, D.A. - Sinonasal NK/T-cell lymphoma in the United States. **Am. J. Surg. Pathol.**, **24**:1511-1517, 2000.
- HO, F.C.S.; TODD, D.; LOKE, S.L.; NG, R.P.; KHOO, R.K.K. - Clinico-pathological features of malignant lymphomas in 294 Hong Kong chinese patients, retrospective study covering an eight-year period. **Int J Cancer** **34**: 143-148, 1984.
- HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. - A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and avidin-biotin complex method for studing polipeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **Am. J. Clin. Pathol.**, **75**: 734-38, 1981.
- JAFFE, E.S. - Pathologic and clinical spectrum of post-thymic T-cell malignancies. **Cancer Invest**, **2**: 413-426, 1984.
- JAFFE, E.S.; CHAN, J.K.C.; SU, IJ.; FRIZZERA, G.; MORI, S.; FELLER, A.C.; HO, F.C.S. - Report of the worshop on nasal and related extra-nodal angiocentric T/NK cell iymphomas: definitions, differencial diagnosis, and epidemiology. **Am. J. Surg. Pathol.**, **20**: 103-111, 1996.
- KIEFF, E. & LIEBOWITZ, D. - Epstein-Barr virus and its replication. In Fields BN, Knipe DM ed. **Virology 2nd edn.** New York: Raven Press, 1889-1920, 1990.
- KNECHT, H.; BERGER, C.; al-HOMSI, A.S.; MCGUAIN, C.; BROUSSET, P. - Epstein-Barr virus oncogenesis. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, **26**: 177-35, 1997.
- KWONG, Y.L.; CHAN, A.C.; LIANG, R.; et al - CD56+ NK lymphomas: clinicopathological features and prognosis. **Br. J. Haematol.**, **97**: 821-829, 1997.

- LERNER, M.R.; ANDREWS, N.C.; MILLER, G.; STEITZ, J.A. - Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupuserythematosus. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **78**: 805-809, 1981.
- LIANG, R.; TODD, D.; CHAN, T.K. - Treatment outcome and prognostic factors for primary nasal lymphoma. **J. Clin. Oncol.**, **13**: 660-670, 1995.
- MACAK, J.; HABANECK, B.; FABIAN, P. - Detection of Epstein-Barr virus in Hodgkin's lymphoma. **Neoplasma**, **47**: 156-161, 2000.
- MILLS, S. & FECHENER, R. - The nose, paranasal sinuses and nasopharynx. In Sternberg Sed. **Diagnostic surgical pathology 2nd**. New York: Raven Press , 851-891,1994.
- MISSAD, O.; SOLIDORO, A.; QUIROZ, L.; OLIVARES, L. - An overview of lymphoreticular malignances in Peru. **Prog Cancer Res Ther**, **27**: 85-97, 1984.
- MOSQUETDA-TAYLOR, A.; MENESES-GARCIA, A.; ZARATE-OSORNO, A.; RUIZ-GODOY, R.L.M.; OCHOA-CARRIO, F.J.; MOHAR-BETANCOURT, A. - Angiocentric lymphomas pf the palate: clinico- pathological considerations in 12 cases. **J. Oral. Pathol. Med.**, **26**: 93-97, 2000.
- NAVARRO, R.L.; ZARATE, O.A.; MENESES, A. ET AL. - High grade AIL and Epstein-Barr virus infection in 22 cases from Mexico. **Mod. Pathol.**, **7**: 117A, 1994.
- NIEDOBITEK, G. - Epstein-Barr vírus: a group 1 carcinogen ? **Virchows Archow**, **435**: 79-86, 1999.
- NG, C.S.; CHAN, J.K.C.; LO, S.T.H.; POON, Y.F. - Immunophenotypic analysis of non-Hodgkin's lymphomas in Chinese. A study of 75 cases in Hong Kong. **Pathology**, **18**: 419-425, 1986.
- NG, C.S.; CHAN, J.K.C.; HUI, P.K.,ET AL. - Application of a T-cell receptor antibody β F1 for immunophenotypic analysis of malignant limphomas. **Am. J .Pathol.**, **132**: 367-371, 1988.

- QUADRA-GARCIA, I.; PROULX, G.M.; WU, C.L.; WANG, C.C.; PILCH, B.Z.; HARRIS, N.L.; FERRY, J.A. – Sinonasal lymphoma. A clinicopathologic analysis of 58 cases from the Massachusetts General Hospital. **Am. J. Surg. Pathol.**, **23**: 1356-1369, 1999.
- QUINTANILLA-MARTINEZZ, L.; FRANKLIN, J.L.; GUERREIRO, I.; KRENACS, L.; NARESH, K.N.; RAMA-RAO, C.; BHATIA, K.; RAFFELD, M.; MABRETH, I.T. – Histological and immunophenotypic profile of nasal NK/T-cell lymphomas from Peru: high prevalence of p53 over-expression. **Hum. Pathol.**, **30**: 849-855, 1999.
- SHIPP, M.A. – A predictive models for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. **N. Engl. J. Med.**, **329**: 987-994, 1993.
- SHNEIDER, B.; TOULOUKIAN, R.; HAIJAR, F.; ET AL. - Perianal ulceration. A novel manifestation of angiocentric lymphoma. **Dig. Dis. Sci.**, **38**: 1162-1166, 1993.
- STRAUS, S.E.; COHEN, J.I.; TOSATO, G.; MEIER, J. – Epstein-Barr virus infections: biology, pathogenesis and management. **Ann. Intern. Med.**, **118**: 45, 1993.
- VAN DE RIJN, M.; BHARGAVA, V.; MOLINA-KIRSCH, H.; CARLOS-BREGIN, R.; WARNKE, R.A.; CLEARY, M.L.; KAMEL, O.W. – Extranodal head and neck lymphomas in Guatemala: high frequency of Epstein-Barr virus-associated sinonasal lymphomas. **Hum. Pathol.**, **28**: 834-839, 1997.
- VIDAL, R.W.; DEVANEY, K.; FERLITO, A.; RINALDO, A.; CARBONE, A. – Sinonasal malignant lymphomas: a distinct clinicopathological category. **Ann Otol. Rhinol. Laryn.**, **108**: 411-419, 1999.
- WEISS, L.M.; GAFFEY, M.J.; CHEN, Y.Y.; FRIERSON, H.F.Jr. - Frequency of Epstein-Barr viral DNA in "Western" sinonasal and Waldeyer's ring non-Hodgkin's lymphomas. **Am. J. Surg. Pathol.**, **16**: 156-162, 1992.
- WONG, K.F.; CHAN, J.K.; NG, C.S.; LEE, K.C.; TSANG, W.Y.; CHEUNG, M.M. – CD 56 (NKH1)-positive hematolymphoid malignancies: na aggressive neoplasm featuring frequent cutaneous/ mucosal involvement, cytoplasmic azurophilic granules, and angiocentric. **Hum. Pathol.**, **23**: 798-804, 1992.

- WU, T.C.; MANN, R.B.; EPSTEIN, J.I., ET AL. - Abundant expression of EBER 1 small nuclear RNA in nasopharyngeal carcinoma. A morphologically distinctive target for detection of Epstein-Barr virus in formalin-fixed paraffin-embedded carcinoma specimens. **Am J Pathol.**, **138**: 1461-1469, 1991.
- YATES, J.L.; WARREN, N.; SUGGDEN, B. - Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. **Nature** **313**: 812-815, 1985.
- YUEN, A. & JACOBS, C. - Lymphomas of the head and neck. **Semin. Oncol.**, **26**: 338-345, 1999.
- ZEIDLER, R.; MEISSNER, P.; EISSNER, G.; LAZIS, S.; HANNERSCHMIDT, W. - Rapid proliferation of B cells from adenoids in response to Epstein-Barr virus infection. **Cancer Res.**, **56**: 5610-5514, 1996.