

FRANCISCO PIGNATARO LIMA

**LINFOMAS ÓSSEOS PRIMÁRIOS:
estudo comparativo com linfomas nodais e linfomas
ósseos metastáticos quanto à imunoexpressão de
proteínas relacionadas à apoptose, regulação do ciclo
celular e adesão celular**

CAMPINAS

Unicamp

2008

FRANCISCO PIGNATARO LIMA

**LINFOMAS ÓSSEOS PRIMÁRIOS:
estudo comparativo com linfomas nodais e linfomas
ósseos metastáticos quanto à imunoexpressão de
proteínas relacionadas à apoptose, regulação do ciclo
celular e adesão celular**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de doutor em Ciências Médicas,
área de concentração em Anatomia Patológica

ORIENTADORA: Eliane Maria Ingrid Amstalden

CO-ORIENTADOR: José Vassallo

CAMPINAS

Unicamp

2008

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

L6291 Lima, Francisco Pignataro
 Linfomas ósseos primários: estudo comparativo com linfomas nodais e linfomas ósseos metastáticos quanto à imunoexpressão de proteínas relacionadas a apoptose, regulação do ciclo celular e adesão celular / Francisco Pignataro Lima. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientadores : Eliane Maria Ingrid Amstalden, José Vassallo
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Linfoma difuso de grandes células. 2. Apoptose. 3. Moléculas de adesão. 4. Hibridização “in situ” fluorescente. I. Amstalden, Eliane Maria Ingrid. II. Vassallo, José. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Primary bone lymphomas: comparison of the immunoexpression of apoptosis related proteins and adhesion molecules with nodal lymphomas and lymphomas metastatic to bone

Keywords: • Lymphoma, Large-Cell, Diffuse
• Apoptosis
• Adhesion molecules
• Fluorescent “in situ” hybridization

Titulação: Doutor em Ciências Médicas
Área de concentração: Anatomia Patológica

Banca examinadora:

Profa. Dra. Eliane Maria Ingrid Amstalden
Profa. Dra. Maria Cláudia Nogueira Zerbini
Profa. Dra. Izilda Aparecida Cardinalli
Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima
Prof. Dr. Leandro Luiz Lopes

Data da defesa: 11 - 02 - 2008

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador : Profa. Dra. Eliane Maria Ingrid Amstalden

Membros:

1. Profa. Dra. Maria Cláudia Nogueira Zerbini

2. Profa. Dra. Izilda Ap. Cardinalli

3. Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima

4. Prof. Dr. Leandro Luiz Lopes de Freitas

5. Profa. Dra. Eliane Maria Ingrid Amstalden

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

Data: 11/02/2008

DEDICATÓRIA

A meus pais, Omir e Lúcia e a meus avós paternos, Francisco e Emília Pignataro (in memoriam), pela dedicação na minha educação e como exemplos de valores humanos

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, professora doutora Eliane Maria Ingrid Amstalden e professor doutor José Vassallo, pela confiança depositada em mim e orientação precisa na elaboração deste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Anatomia Patológica, pelo respeito, carinho e confiança desde o início da minha formação profissional.

Aos meus pais Omir e Lúcia, irmãs Jussara, Moema e Jurema e familiares.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro concedido à professora doutora Eliane Maria Ingrid Amstalden, processo número 04/14497-5.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida do programa PDEE, durante o meu estágio na França-Toulouse de janeiro a junho de 2007.

Ao professor doutor Pierre Brousset, chefe do serviço de Anatomia Patológica CHU-Purpan, Toulouse-França, por me aceitar em seu serviço, permitindo-me compartilhar dos seus ensinamentos e da sua valiosa contribuição neste trabalho.

Aos professores Cláudia Regina de Oliveira, chefe do laboratório de Anatomia Patológica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia-FMUSP e Fernando Augusto Soares, chefe do serviço de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer de São Paulo, pela colaboração na utilização dos arquivos dos seus departamentos.

Aos amigos Andresa, Catarina, Icléia, Mariana, Priscila, Tânia, Ana Flavia, Alexandre e Josemara, pela amizade e pelos bons tempos passados juntos nesses quatro anos de Pós-Graduação.

Aos colegas do laboratório de imunoistoquímica, Marisa, Glauce, Priscila, Júlio e Eduardo, pela experiência transmitida e importante ajuda na realização das reações de imunoistoquímica.

Aos amigos Geisilene e Nivaldo, pela força e amizade durante o estágio na França.

Aos amigos Jacélio e Joyce, pela amizade.

À professora Marisa, pela dedicação nas aulas de francês e sua amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica e de Citogenética CHU-Purpan.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia Patológica FCM-Unicamp.

À professora doutora Fátima Sonatti, coordenadora do curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas, pelo apoio durante o processo seletivo do programa PDEE.

	PÁG.
RESUMO.....	xxxiii
ABSTRACT.....	xxxvii
1- INTRODUÇÃO.....	41
1.1- Linfoma ósseo primário (LOP).....	43
1.2- Características imunofenotípicas e moleculares do LOP.....	45
1.3- Perfis imunofenotípico, citogenético e das moléculas envolvidas na apoptose, regulação do ciclo e adesão celular no linfoma difuso de grandes células B.....	46
1.4- Justificativa.....	52
2- OBJETIVOS.....	53
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	57
3.1- Seleção dos casos e revisão histopatológica.....	59
3.2- Método imunoistoquímico.....	60
3.2.1- Marcadores imunoistoquímicos.....	60
3.2.2- Técnica imunoistoquímica.....	63
3.2.3- Método de classificação nos grupos centro germinativo (CG) e pós-centro germinativo (pós-CG).....	65
3.3- Técnica do microarranjo matricial de tecidos (TMA, do inglês <i>tissue microarray</i>).....	66
3.3.1- Método de leitura das lâminas de TMA.....	68
3.4- Análise da hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH, do inglês <i>fluorescence in situ hybridization</i>).....	69

3.5- Interpretação dos achados do FISH.....	70
3.6- Aspectos éticos.....	73
3.7- Metodologia estatística.....	74
4- RESULTADOS.....	75
4.1- Resultados epidemiológicos.....	77
4.2- Revisão histopatológica e imunofenotipagem da linhagem B...	79
4.3- Resultados do estudo imunoistoquímico.....	80
4.3.1- Moléculas de adesão.....	80
4.3.2- Moléculas de apoptose e reguladoras do ciclo celular.....	87
4.3.3- Classificação molecular em subgrupos CG e pós-CG.....	101
4.3.4- Índice de proliferação celular.....	105
4.3.5- Imunofenotipagem.....	105
4.3.6- Subpopulações de células imunes infiltrantes.....	108
4.4- Resultados da análise citogenética pelo FISH.....	112
4.5- Principais resultados.....	115
5- DISCUSSÃO.....	117
6- CONCLUSÕES.....	141
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	145
8- APÊNDICE.....	159

LISTA DE ABREVIATURAS

Bcl-6	proteína Bcl-6
Bcl-2	proteína Bcl-2
CG	centro germinativo
CD	<i>cluster designation</i>
DAPI	coloração fluorescente <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> (Vysis/Abbott Laboratories)
FISH	hibridização <i>in situ</i> fluorescente
Foxp3	marcador molecular de linfócitos T reguladores (Treg)
HE	hematoxilina-eosina
IgH	cadeia pesada de imunoglobulina
IHQ	imunoistoquímica
LDGCB	linfoma difuso de grandes células B
LNH	linfoma não-Hodgkin
LOP	linfoma ósseo primário
MT	metastático
ND	nodal
pós-CG	pós-centro germinativo
pRB	proteína do retinoblastoma
p21	proteína p21
Spectrum Orange	coloração fluorescente (Vysis/Abbott Laboratories)
TMA	<i>tissue microarray</i>
Ki-67	proteína Ki-67

	PÁG.
Tabela 1- Percentual de casos que expressaram moléculas de adesão, apoptose e regulação do ciclo celular nos três grupos linfoma difuso de grandes células B.....	101
Tabela 2- Percentual da expressão dos marcadores de imunofenótipo nos três grupos de linfoma difuso de grandes células B.....	108
Tabela 3- Porcentagem de células imunes infiltrantes nos dois grupos de linfoma difuso de grandes células B (nodal e ósseo primário).....	112

	PÁG.
Figura 1- Aparelho de <i>tissue microarray</i> (TMA) da <i>Beecher Instruments Microarray Technology</i> demonstrando bloco receptor posicionado ao lado do bloco doador (Departamento de Patologia - Hospital AC Camargo)...	68
Figura 2- Sonda do tipo <i>dual-fusion</i>	72
Figura 3- Sonda do tipo <i>break-apart</i>	73
Figura 4- Percentual da distribuição dos casos de linfoma ósseo primário de acordo com sítio.....	77
Figura 5- Linfoma ósseo primário, infiltrando tecido ósseo trabecular (HE, 40X).....	79
Figura 6- Linfoma ósseo primário, demonstrando padrão difuso de grandes células. Observam-se células tumorais de padrão centroblastico, volumosas, irregulares e com núcleo vesicular (HE, 100X).....	80
Figura 7- Percentual da expressão do CD29 nos dois grupos (LOP, metastático) de linfoma difuso de grandes células B.....	81
Figura 8- Curva de sobrevida, demonstrando a relação da expressão da molécula CD29 com a sobrevida nos três grupos de linfoma difuso de grandes células B (ND: nodal, MO: metastático, LOP).....	82
Figura 9- Curva de sobrevida, demonstrando a relação da expressão da molécula CD62L com a sobrevida nos três grupos de linfoma difuso de grandes células B (ND: nodal, MO: metastático, LOP).....	83

Figura 10-	Imunoexpressão do CD44 na membrana citoplasmática das células de linfoma ósseo primário (100X).....	84
Figura 11-	Percentual da expressão do CD44 nos três grupos de linfoma difuso de grandes células B.....	84
Figura 12-	Curva de sobrevida demonstrando a relação da expressão da molécula CD44 com a sobrevida nos três grupos de linfoma difuso de grandes células B (ND: nodal, MO: metastático, LOP).....	85
Figura 13-	Percentual da expressão do CD51 nos grupos de linfoma difuso de grandes células B.....	86
Figura 14-	Curva de sobrevida, demonstrando a relação da expressão da molécula CD51 com a sobrevida nos três grupos de linfoma difuso de grandes células B (ND: nodal, MO: metastático, LOP).....	87
Figura 15-	Imunoexpressão da proteína Bax no citoplasma das células de linfoma ósseo primário (100X).....	88
Figura 16-	Percentual da expressão da proteína Bax nos grupos de linfoma difuso de grandes células B.....	89
Figura 17-	Curva de sobrevida, demonstrando a relação da expressão da molécula Bax com a sobrevida nos três grupos de linfoma difuso de grandes células B (ND: nodal, MO: metastático, LOP).....	90
Figura 18-	Imunoexpressão com padrão nuclear da proteína p21 nas células do linfoma ósseo primário (100X).....	91
Figura 19-	Figura 19: Percentual da expressão do p21 (WAF1) nos grupos de linfoma difuso de grandes células B.....	91

Figura 20-	Curva de sobrevida, demonstrando a relação da expressão da molécula p21 com a sobrevida nos três grupos de linfoma difuso de grandes células B (ND: nodal, MO: metastático, LOP).....	92
Figura 21-	Imunoexpressão de padrão nuclear da proteína Bcl-6 nas células do linfoma ósseo primário (100X).....	93
Figura 22-	Percentual da expressão do Bcl-6 nos grupos de linfoma difuso de grandes células B.....	93
Figura 23-	Curva de sobrevida, demonstrando a relação da expressão da molécula Bcl-6 com a sobrevida nos três grupos de linfoma difuso de grandes células B (ND: nodal, MO: metastático, LOP).....	94
Figura 24-	Imunoexpressão de padrão citoplasmático da proteína Bcl-2 nas células do linfoma ósseo primário (100X).....	95
Figura 25-	Percentual da expressão do Bcl-2 nos grupos de linfoma difuso de grandes células B.....	95
Figura 26-	Curva de sobrevida, demonstrando a relação da expressão da molécula Bcl-2 com a sobrevida nos três grupos de linfoma difuso de grandes células B (ND: nodal, MO: metastático, LOP).....	96
Figura 27-	Imunoexpressão de padrão nuclear da proteína p53 nas células do linfoma ósseo primário (100X).....	97
Figura 28-	Percentual da expressão do p53 nos grupos de linfoma difuso de grandes células B.....	97
Figura 29-	Curva de sobrevida, demonstrando a relação da expressão da molécula p53 com a sobrevida nos três grupos de linfoma difuso de grandes células B (ND: nodal, MO: metastático, LOP).....	98

Figura 30-	Imunoexpressão de padrão nuclear da proteína pRB nas células do linfoma ósseo primário (40X).....	99
Figura 31-	Percentual de expressão do WAF-1 (pRB) nos grupos de linfoma difuso de grandes células B.....	99
Figura 32-	Curva de sobrevida, demonstrando a relação da expressão da molécula pRB com a sobrevida nos três grupos de linfoma difuso de grandes células B (ND: nodal, MO: metastático, LOP).....	100
Figura 33-	Percentual dos subgrupos centro germinativo e pós-centro germinativo nos linfomas ósseos primários e nodais.....	102
Figura 34-	Curva de sobrevida, demonstrando a relação dos grupos centro germinativo / pós-centro germinativo com a sobrevida nos três grupos de linfoma difuso de grandes células B (ND: nodal, MO: metastático, LOP)..	103
Figura 35-	Linfoma ósseo primário, subgrupo centro germinativo, demonstrando imunoexpressão na membrana citoplasmática do CD10 das células linfomatosas (100X).....	104
Figura 36-	Linfoma ósseo primário do subgrupo pós-centro gerrminativo demonstrando, imunoexpressão de padrão nuclear do MUM1 (100X).....	104
Figura 37-	Imunoexpressão do padrão nuclear da proteína BOB1 em linfoma ósseo primário (100x).....	107
Figura 38-	Imunoexpressão do padrão em membrana citoplasmática da molécula CD20 em linfoma ósseo primário (100x).....	107

Figura 39-	Linfócitos T infiltrantes, expressando as moléculas CD3 (20X) e CD4 (100X) em amostras de linfoma ósseo primário.....	110
Figura 40-	Linfócitos T infiltrantes, expressando as moléculas Foxp3 e CD8 (100X) em amostras de linfoma ósseo primário.....	111
Figura 41-	Análise do gene <i>Bcl2/IGH</i> , utilizando FISH de interfase em dois casos de linfomas ósseos primários. Destaque para o sinal da sonda <i>Bcl2/IGH dual-fusion</i> , demonstrando aspecto característico de fusão dos sinais verde e vermelho na t(14;18)(q32;q21) (setas brancas).....	114
Figura 42-	Análise do <i>MYC</i> , utilizando FISH de interfase em caso de linfoma ósseo primário. Destaque para o sinal vermelho e verde (<i>split</i>) da sonda <i>MYC break apart</i> , demonstrando t(8; 14) (setas brancas).....	114

LISTA DE QUADROS

	PÁG.
Quadro 1- Principais trabalhos publicados sobre linfoma ósseo primário (LOP).....	46
Quadro 2- Imunofenotipagem de linfomas B.....	61
Quadro 3- Apoptose e regulação do ciclo celular:.....	62
Quadro 4- Moléculas de adesão.....	62
Quadro 5- Origem B centro e pós-centro germinativo.....	63
Quadro 6- Células infiltrantes do sistema imune.....	63
Quadro 7- Características clínicas e resultados das técnicas de hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH) e imunoistoquímica (IHQ) nos 32 casos de linfoma ósseo primário.....	113

RESUMO



Cerca de 20% a 40% dos linfomas não-Hodgkin (LNH) B são extranodais e caracterizam-se por comportamento biológico distinto, de acordo com o seu sítio de origem e variante histológica. Linfoma ósseo primário (LOP), uma forma extranodal rara, apresenta-se na maior parte dos casos como LNH B de alto grau e evolui com bom prognóstico. Os estudos sobre o LOP são escassos e suas características imunofenóticas e citogenéticas ainda não estão bem definidas. Neste trabalho, foram analisados três grupos de linfomas difusos de grandes células B (LDGCB): a) ósseos primários, B) nodais e c) metastáticos (com envolvimento ósseo secundário). Foram investigados, nesses grupos, dados clínicos e de sobrevida, aspectos morfológicos, imunofenóticos e citogenéticos. Na análise imunoistoquímica, foi verificado o estudo das moléculas envolvidas na apoptose e regulação do ciclo celular (Bcl-2, Bax, p53, Bcl-6, p21, pRB) moléculas envolvidas na adesão celular (CD29, CD62L, CD44, CD51) índice de proliferação celular (Ki-67) e expressão das subpopulações de células infiltrantes do sistema imune (CD3, CD4, CD5, CD8, CD57, CD68, Foxp3) com objetivo de melhor caracterizar o LOP. Foram selecionados no total 138 casos de LDGCB, provenientes dos departamentos de Anatomia Patológica FCM-UNICAMP, Hospital AC.-Camargo - Fundação Antônio Prudente, Instituto de Traumatologia e Ortopedia da USP e Centre Hospitalier Universitarie (CHU Purpan). Do total de 138, 76 casos eram linfomas ósseos primários, 46 casos linfomas nodais e 16 casos linfomas com envolvimento ósseo secundário. Nossos resultados demonstraram que o LOP possui características evolutivas que diferem dos demais LDGCB extranodais. Observamos que a maioria dos LDGCB ósseos primários (66%) pertenceram ao imunofenótipo centro germinativo (CG) e não exibiram diferenciação plasmacítica. Os três grupos de LDGCB analisados exibiram forte imunexpressão das proteínas relacionadas à apoptose e ao ciclo celular enquanto que a imunexpressão de moléculas de adesão foi fraca ou ausente, na maioria dos casos. O estudo da sobrevida, envolvendo a ausência da imunexpressão das moléculas de adesão CD29, CD62L e CD51, nos três grupos, revelou-se significativamente associada com melhor sobrevida. O significado biológico deste achado ainda está para ser esclarecido. O CD44 foi o

mais fortemente expresso nas células tumorais. As moléculas envolvidas na apoptose Bax e p53 foram relacionadas à pior evolução e o pRB à evolução favorável nos LOP. As proteínas Bcl-2 e Bcl-6 foram expressas nos três grupos de linfomas. Com a análise em 32 casos de LOP das principais translocações em LNH (*MYC*, *BCL2/IGH*, *BCL6*, *ALK*, *IGH/CCND1* e *PAX5*), conseguimos caracterizar melhor esta entidade. Rearranjos, envolvendo o *BCL2* e *MYC* foram encontrados, entretanto não ocorreram rearranjos do *BCL6*. Os demais genes não demonstraram translocações. Estes achados indicam que o LOP deve ser considerado uma categoria distinta de LDGCB extranodal, com aspectos genéticos e moleculares mais próximos dos nodais.

Palavras-chave: linfoma difuso de grandes células, moléculas de adesão, apoptose, hibridização *in situ* fluorescente.

ABSTRACT



The incidence of extranodal lymphomas is increasing in the last decades. Around 20 to 40% of B-cell non-Hodgkin lymphomas (NHL) arise outside the lymph nodes and may present distinct biological behavior, as compared to the corresponding nodal counterpart of similar histological grade. The heterogeneity of large B-cell lymphomas (LBCL) has been matter of various studies, although morphology alone may be insufficient to separate groups of clinical relevance, immunophenotyping and molecular techniques have demonstrated that different variants of LBCL may present diverse clinical and prognostic features. Primary bone lymphoma (PBL) is rare form of extra nodal NHL, which generally presents a more favorable prognosis than the nodal counterpart. The reason for this is unclear.

We selected a large series (n=138) of nodal NHL (N=46), primary (n=76) and metastatic (n=16) bone diffuse large cell lymphomas collected in tissue micro-arrays from several centers in France and Brazil. We investigated to be comparing clinical, morphological and immunophenotypic features. Immunohistochemical detection of proliferation markers, apoptosis related proteins and adhesion molecules was be marked. Our results demonstrated that primary bone LDGCB possesses peculiar clinical characteristics that you differ of the other extranodal LDGCB as the longest evolution and smaller recurrence tax. The three groups of LDGCB exhibited strong immunoexpression of the related proteins the apoptosis and cellular cycle while the immunoexpression of adhesion molecules was weak or absentee in most of the cases.

These cases were classified according to the expression of antigens with germinal center (GC) (n=37/62) or non germinal center (non-GC) (n=26/62) stages of B-cell differentiation.

The study of the survival involving the absence of the imunoexpressão of the adhesion molecules CD29, CD62L and CD51 in the three groups was revealed significantly associated with better outcome. The biological meaning of this discovery is still to be explained. CD44 was it more strongly expressed in the tumor cells and it demonstrated relationship away with inferior survival without statistical significance. The molecules involved in the apoptosis Bax and p53 were related

the worst evolution and the pRB the favorable evolution in PBL. The proteins Bcl-2 and Bcl-6 were expressed in the three lymphomas groups and associated the worst evolution, however without significance.

By fluorescence in situ hybridization, we found a substantial number of cases with a rearrangement of *BCL2* (n=9/32) and *MYC* (n= 3/32) whereas *PAX5*, *BCL6*, *BCL-1/Cyclin D1* and *ALK* genes were in germ line configuration. Interestingly, one case, with GC phenotype, showed a dual *BCL2* and *MYC* rearrangement. We observed that the majority of the cases with rearrangements were of GC phenotype. These results, associated with the lack of *BCL6* rearrangement, suggest that bone DLBCL represents a specific group within extranodal B-cell lymphomas.

Keywords: diffuse large cell lymphoma, adhesion molecules, apoptosis, fluorescent *in situ* hybridization

1- INTRODUÇÃO

1.1- Linfoma ósseo primário

O linfoma ósseo primário (LOP) corresponde cerca de 4% a 5% dos linfomas extranodais, menos de 1% dos linfomas não-Hodgkin (LNH) e cerca de 7% dos tumores ósseos malignos primários. Oberling¹ (1928) foi o primeiro a descrever sobre esse tipo de linfoma e, em 1939, Parker e Jackson² descreveram os primeiros casos de LOP como reticulossarcoma primário do osso. Outros estudos realizados sobre LOP, descreveram mais detalhadamente os seus aspectos clínicos, morfológicos e evolutivos (Vassallo et al., 1987, Vassallo et al., 1988, de Camargo et al., 2002, Flechter et al., 2002, de Leval et al., 2003, Zinzani et al., 2003, Barbieri et al., 2004).

Segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde atualmente utilizados, são classificados como LOP, linfomas localizados em único sítio ósseo com ou sem envolvimento de linfonodo regional, ou em múltiplos sítios ósseos sem envolvimento visceral ou de linfonodo regional, mantendo-se esse quadro de quatro a seis meses após o início dos sintomas (Flechter et al., 2002). Pacientes com lesão óssea e envolvimento precoce de vísceras e/ou múltiplos linfonodos à distância e pacientes com linfoma prévio e envolvimento ósseo secundário não devem ser considerados como LOP (Flechter et al., 2002).

O LOP pode ocorrer em qualquer osso do esqueleto, porém atinge mais freqüentemente ossos longos, seguido das vértebras, escápula, mandíbula e maxila. Existe discreta predominância no sexo masculino e a faixa etária mais acometida varia de 30 a 50 anos. Clinicamente caracteriza-se por dor óssea, fratura patológica, massa palpável em alguns casos e sintomas neurológicos, quando ocorre envolvimento da medula espinhal. Os achados radiológicos são inespecíficos.

Nos ossos longos, observa-se envolvimento freqüente da diáfise com acentuada destruição óssea, áreas líticas e escleróticas variáveis e muitas vezes comprometimento de todo o osso com extensão para partes moles, formando uma

¹ Oberling apud Horsman et al, 2006

² Parker e Jackson apud Kitsoulis et al, 2006

grande massa (de Camargo et al., 2002, Gianelli et al., 2002, Zinzani et al., 2003, Barbieri et al., 2004).

A maioria dos casos de LOP são linfomas difusos de grandes células B (LDGCB) geralmente de padrão centrolástico (Vassallo et al., 1987, Vassallo et al., 1988). Caracterizam-se por envolvimento difuso dos espaços medulares com pouca destruição óssea, as trabéculas ósseas são geralmente normais, espessadas ou irregulares e pagetóides (Huebner-Chan et al., 2001, de Camargo et al., 2002, Zinzani et al., 2003, Beal et al., 2006).

O linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) é considerado o tipo mais comum de linfoma em países do Ocidente. Segundo a classificação de neoplasias dos tecidos linfóide e hematopoiético da OMS, o LDGCB representa cerca de 40% dos LNH no adulto. Este linfoma pode desenvolver-se de novo ou surgir a partir de linfomas B indolentes, formando um grupo amplo e heterogêneo, com aspectos morfológicos, terapêuticos e clínicos variados (Colomo et al., 2003, Staudt e Dave, 2005). Vários estudos feitos nas últimas décadas demonstraram a variabilidade imunofenotípica, clínica e genética desses linfomas (Hans et al., 2004, Staudt e Dave, 2005, Kwong, 2007).

A literatura mundial demonstra divergências em relação aos aspectos imunoistoquímicos, fatores prognósticos, evolutivos e tratamento em vários estudos sobre o LOP. Alguns trabalhos, correlacionando prognóstico e estádios da lesão, demonstraram sobrevida de 5 a 10 anos nos pacientes com doença isolada e sem extensão para partes moles, em torno de 53% a 58% dos casos, enquanto aqueles com envolvimento de partes moles possuem sobrevida de 5 a 10 anos em cerca de 12% a 22% dos casos (Fletcher et al., 2002, Miguez Sanchez et al., 2006, Ramadan et al., 2007). No Brasil, os estudos feitos sobre LOP são raros e limitados à análise de aspectos clínico-evolutivos e morfológicos com pouca ênfase nos fatores prognósticos (Vassallo et al., 1987, Vassallo et al., 1988, de Camargo et al., 2002).

1.2- Características imunofenotípicas e moleculares do LOP

Trabalhos recentes definiram alguns aspectos imunofenotípicos do LOP, porém foram insuficientes principalmente em relação à análise dos seus marcadores de prognóstico e estudos moleculares. Em virtude de sua raridade e à dificuldade em coletar material para pesquisa, os estudos moleculares sobre LOP são escassos (de Leval et al., 2003, Miguez Sanchez et al., 2006, Maruyama et al., 2007, Ramadan et al., 2007). De Leval *et al* (2003) demonstraram em 29 casos de LDGCB primários do osso que 48% dos casos eram padrão centro-germinativo e que a expressão do anticorpo CD10 estava relacionada com maior sobrevida. Neste mesmo estudo, o rearranjo *BCL-2/IGH* foi observado, por meio da PCR, em apenas um de 23 casos analisados (de Leval et al., 2003).

Huebner-Chan *et al* (2001) observaram em 20 casos de LDGCB primário ósseo forte expressão da proteína Bcl-2 em 55% dos casos. Na análise molecular foi observado rearranjo do gene da cadeia pesada da imunoglobulina, porém não foram detectados rearranjos dos genes *BCL-2/IGH* sugerindo assim que a expressão do Bcl-2 não ocorre como consequência do rearranjo genético desse gene (Huebner-Chan et al., 2001). Em 2003, Gianelli et al observaram que as mutações envolvendo o gene *BCL-6* em LOP, são menos freqüentes do que nas formas nodais (Gianelli et al., 2003).

O LOP permanece pouco conhecido sob vários aspectos e, até o momento, as informações obtidas são insuficientes (quadro 1). Estudos adicionais são necessários para caracterizar melhor os fatores prognósticos e analisar mais profundamente os aspectos imunofenotípicos e citogenéticos (de Leval et al., 2003, Miguez Sanchez et al., 2006, Maruyama et al., 2007, Ramadan et al., 2007).

Quadro 1- Principais trabalhos publicados sobre linfoma ósseo primário

Autor/ano	Casuística	Tipo de estudo
de Camargo <i>et al</i> , 2002	24	Estudo clínico
Gianelli <i>et al</i> , 2002	54	Estudo clínico
Stein <i>et al</i> , 2003	19	Estudo clínico
Zinzani <i>et al</i> , 2003	52	Estudo clínico
Barbieri <i>et al</i> , 2004	77	Estudo clínico
Beal <i>et al</i> , 2006	82	Estudo clínico
Maruyama <i>et al</i> , 2007	28	Estudo clínico
Ramadan <i>et al</i> , 2007	131	Estudo clínico
Huebner Chan <i>et al</i>, 2001	20	Estudo molecular e imunofenotípico
Gianelli <i>et al</i>, 2003	53	Estudo molecular e imunofenotípico
de Leval <i>et al</i>, 2003	29	Estudo molecular e imunofenotípico
Horsman <i>et al</i> , 2003		Revisão de literatura
Kitsoulis <i>et al</i> , 2006		Revisão de literatura
Miguel Sanchez <i>et al</i> , 2006		Revisão de literatura

1.3- Perfis imunofenotípico, citogenético e das moléculas envolvidas na apoptose, regulação do ciclo e adesão celular no linfoma difuso de grandes células B

Estudos de expressão gênica demonstraram que o LDGCB pode ser dividido em dois subgrupos: um subgrupo de LDGCB denominado semelhante às células B normais do centro germinativo (Vega, F. et al., 2005), ou seja, as células linfomatosas expressam genes considerados próprios das células B normais do centro germinativo (Staudt e Dave, 2005) e o outro subgrupo, denominado pós-centro germinativo (pós-CG), caracteriza-se pela ausência na expressão dos genes característicos do centro germinativo e demonstra apenas genes induzidos durante a estimulação mitótica de células B sangüíneas (Hans et al., 2004, Wu e Keating, 2006, Kwong, 2007). Um terceiro subgrupo recentemente descoberto foi definido pela expressão gênica como linfoma de células B do mediastino.

A expressão de marcadores pós-CG como o MUM-1 e CD138, e marcadores do CG, como Bcl-6 e CD10, auxiliam na classificação dos LDGCB nos dois subgrupos e podem ser relacionados com prognóstico (Hans et al., 2004, Sjo et al., 2007). A expressão do Bcl-6 acima de 10% nas células desse linfoma é indicativa de boa sobrevida bem como a co-expressão do CD10.

Outro aspecto já demonstrado em trabalhos anteriores consiste na expressão do CD5 (marcador de linfócitos T e expresso em 10% dos casos de LDGCB) associado à ausência de expressão do CD10 e expressão da proteína Bcl-6. Este subtipo de LDGCB é considerado *de novo*, acomete mais freqüentemente mulheres idosas em sítios extranodais e evoluem com pior prognóstico (Hans et al., 2004, Sjo et al., 2007).

O grau de proliferação celular tumoral pode ser medido pela expressão do anticorpo de proliferação celular, Ki-67. Níveis elevados de proliferação celular estão relacionados com pior sobrevida nos pacientes com linfomas agressivos (Miller et al., 1994, Nicolaidis et al., 1998).

A proteína Bcl-2, membro da família das moléculas reguladoras de apoptose (Bcl-2, Bcl-X, Bax, e Bak) favorece a oncogênese, atuando como supressor potente da morte celular programada das células tumorais e prolongando sua sobrevida (Gutierrez et al., 1999). A expressão da proteína Bcl-2 nos LDGCB ocorre em 30% a 60% dos casos e relaciona-se com maior freqüência de recidiva tumoral e resistência à ação das drogas quimioterápicas (Nicolaidis et al., 1998, de Leval e Harris, 2003, Wu e Keating, 2006, De Paepe e De Wolf-Peeters, 2007).

Gascoyne et al (1997) descreveram o significado prognóstico da proteína Bax em LDGCB nos pacientes com estágios avançados da doença (Gascoyne et al., 1997). Os resultados semelhantes aos de Bairey et al (1999), sugerem efeito conjunto paradoxal entre Bax e Bcl-2 suprimindo a morte celular (Bairey et al, 1999). Esses resultados permitem formular novas hipóteses sobre o papel funcional e oncogênico da coexpressão Bax e Bcl-2 nos LNH agressivos e

outras neoplasias malignas (Gascoyne et al., 1997, Kramer et al., 1998, Nicolaidis et al., 1998, Pagnano et al., 2002, Fisher et al., 2004).

A presença de mutações no gene supressor tumoral *P53* em células de LDGCB foi associada a fatores de pior prognóstico, como idade e estádios clínicos avançados e desidrogenase láctica elevada (Nicolaidis et al., 1998). Formas mutantes do gene *P53* estão associadas a baixos níveis de remissão completa da neoplasia e sobrevida reduzida (Villuendas et al., 1992, Nicolaidis et al., 1998, Leroy et al., 2002, Sohn et al., 2003, Paik et al., 2005). A análise combinada da expressão das proteínas p53 e p21, outra molécula envolvida no controle da divisão celular, permite distinguir formas mutantes e selvagens do gene *P53*. Os LDGCB que demonstraram expressão do p53 e ausência de expressão do p21 (p53+ e p21-) estão associados à forma *P53* mutante e relacionados com pior prognóstico e ineficácia do tratamento, enquanto aqueles que expressaram p53 e p21, simultaneamente, estão relacionados com a forma não mutante do gene *P53*. A associação do *P53* mutante e a expressão do Bcl-2 demonstrou baixa sobrevida em um grupo de pacientes estudados portadores de LDGCB nodais (de Leval et al., 2001, de Leval e Harris, 2003, Kwong, 2007).

A proteína do retinoblastoma (pRB) regula de forma negativa o ciclo celular ou seja diminui a atividade proliferativa celular. Os LDGCB que exibem expressão elevada desta proteína (acima de 80% das células tumorais positivas) estão relacionados com sobrevida mais longa (de Leval e Harris, 2003).

As moléculas de adesão envolvidas na recirculação, quimiotaxia e interação endotelial dos linfócitos pertencem às famílias de receptores denominados selectinas, integrinas, imunoglobulinas e CD44 (Springer, 1990, Drillenburger e Pals, 2000). Os LNH B agressivos preservam vários receptores de adesão nas suas células, principalmente aqueles relacionados com a recirculação dos linfócitos residentes (Drillenburger et al., 1999, Drillenburger e Pals, 2000, Wallach-Dayana et al., 2001).

As moléculas de adesão estão envolvidas nos processos de invasão e disseminação dos linfomas (Drillenburg e Pals, 2000, Naor et al., 2002). Trabalhos demonstram que moléculas de adesão podem determinar o padrão de agressividade e propagação específica nos tecidos alvo em alguns subtipos de linfomas. Linfomas extranodais, por exemplo, originados no tecido linfóide associados à mucosa (do inglês *mucosal associated lymphoide tissue*, MALT) preservam moléculas como a L-selectina, encontrada durante o processo de maturação na mucosa intestinal. Provavelmente, a expressão destas moléculas orientará o padrão de disseminação deste linfoma nas mucosas (Drillenburg e Pals, 2000, Pals et al., 2007).

O CD44 representa uma família de glicoproteínas codificada por único gene no cromossomo 11. Suas isoformas variantes (CD44v) estão distribuídas em vários tecidos humanos e são responsáveis por importantes funções biológicas como proliferação e diferenciação celulares, ativação e migração de linfócitos, hematopoiese, angiogênese, apresentação de citocinas, quimocinas e fatores do crescimento, bem como progressão tumoral e metástase. Várias funções celulares normais mediadas pelo CD44 são adotadas pelas células malignas de forma descontrolada (Wallach-Dayana et al., 2001, Naor et al., 2002).

Estudos clínicos demonstraram que a expressão do CD44 foi relacionada com prognóstico desfavorável em LDGCB e maior disseminação da doença (Drillenburg e Pals, 2000). Outro trabalho demonstrou que a expressão do CD44 esteve relacionada com sobrevida livre de doença e com doença localizada em pacientes com LDGCB (Drillenburg e Pals, 2000). Tzankov et al (2005), analisando a expressão das isoformas variantes do CD44 nos grupos de LDGCB CG e pós-CG, demonstraram que a variante 6 (CD44v6), expressa mais freqüentemente no grupo pós-CG, pode contribuir com a disseminação do linfoma e correlacionar-se com estágio avançados da doença (Tzankov et al., 2003).

A família das selectinas é constituída pela L-selectina, fator de crescimento epidérmico e lecitina. A L-selectina está expressa em linfócitos, monócitos e neutrófilos e rapidamente é sub-regulada durante a ativação celular

(Drillenburg e Pals, 2000). Estudos *in vitro* demonstraram o papel dessa proteína na migração dos linfócitos para linfonodos periféricos. Foi observado que a maioria dos LNH B nodais de alto e baixo grau histológicos e linfomas T expressam L-selectina, porém a expressão em linfomas extranodais foi variável (Drillenburg e Pals, 2000).

A família das integrinas é composta pelas subunidades α e β . Sua expressão é limitada nos linfócitos e são utilizadas como receptores na interação entre os linfócitos com outras células e a matriz extracelular (Drillenburg e Pals, 2000). A expressão destas subunidades pode estar relacionada com o grau de diferenciação dos linfomas e seu padrão de disseminação (Bargatze et al., 1987, Terpe et al., 1994). O padrão de expressão da família das integrinas nas células linfomatosas provavelmente influencia a progressão da doença e prognóstico do paciente (Terol et al., 1999, Drillenburg e Pals, 2000).

Desarranjos citogenéticos em LNH são freqüentes e podem auxiliar no seu diagnóstico, patogenia e prognóstico. Muitas das proteínas codificadas pelos genes alterados atuam em mecanismos de apoptose, regulação do crescimento celular, controle do ciclo e diferenciação celulares (Vega, F e Medeiros, 2003, Staudt e Dave, 2005, Wu e Keating, 2006). A hibridização *in situ* fluorescente (FISH), técnica bastante utilizada na pesquisa das anormalidades citogenéticas em LNH, atualmente demonstra resultados satisfatórios em material de biópsias arquivadas (Ventura et al., 2006).

O LDGCB, em razão de sua heterogeneidade, demonstra uma grande variedade de alterações moleculares recorrentes e não patognomônicas, podendo ser observadas em outros tipos de LNH B. As translocações aleatórias podem estar envolvidas na patogênese dos LDGCB e possuem implicações clínicas e prognósticas importantes (Haralambieva et al., 2002, Haralambieva et al., 2003, Lossos e Morgensztern, 2006). Translocações envolvendo genes da IGH (cromossomo 14q32), *BCL2* (cromossomo 18q21), *BCL-6* (cromossomo 3q27) e *MYC* (cromossomo 8q24) são freqüentemente observadas.

O rearranjo genético e expressão do gene *BCL-6*, marcador de células do centro germinativo, está associado a prognóstico favorável (Kramer et al., 1998, De Paepe e De Wolf-Peeters, 2007). A superexpressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 é considerada fator de pior prognóstico, seu rearranjo genético t(14; 18)(q32; q21) ocorre, freqüentemente, com a justaposição do gene *BCL2* no *locus* do gene da imunoglobulina de cadeia pesada *IGH* (Kusumoto et al., 2005). Outros mecanismos podem levar à superexpressão dessa proteína como a amplificação do gene *BCL2*. Estudos demonstraram que a presença desta translocação parece não estar relacionada com a baixa sobrevida (Hermine et al., 1996, Kusumoto et al., 2005).

Aberrações genéticas, envolvendo os genes do ciclo celular *P53*, *CKDN2A* (p16^{INK4}) e *CCND1* (ciclina D1) em LDGCB estão relacionados com pior sobrevida (Vega, F e Medeiros, 2003, Kusumoto et al., 2005, Wu e Keating, 2006). A translocação t(8,14) ou amplificação t(8q24) do gene *MYC*, promotor do ciclo celular e ao mesmo tempo da apoptose, produz a superexpressão da proteína c-myc em mais de 15% dos LDGCB, freqüentemente, em pacientes portadores do vírus HIV com linfomas extranodais e estão geralmente relacionados com curso clínico mais agressivo (Hermine et al., 1996, de Leval e Harris, 2003, Fisher et al., 2004).

Atualmente, o LDGCB é considerado o LNH mais freqüente em adultos e os inúmeros trabalhos realizados demonstram a diversidade clínica genética e imunofenotípica deste grupo de linfoma que pode ser comprovada na evolução satisfatória de alguns pacientes. Vários marcadores prognósticos foram identificados e relacionados com a resposta imune do hospedeiro e a capacidade invasiva do tumor, contudo ainda permanecem incertezas sobre a aplicabilidade desses fatores na prática. É imprescindível a realização de mais pesquisas e o descobrimento e aplicação de novas técnicas para entender melhor a biologia desse linfoma agressivo.

1.4- Justificativa

A frequência dos LNH tem aumentado nos últimos vinte anos. O LDGCB é considerado o maior e mais freqüente grupo de linfoma que acomete adultos nas formas nodais e extranodais. Fatores clínicos, morfológicos e imunoistoquímicos podem apresentar impacto na terapêutica e sobrevida dos portadores dessas neoplasias (Miller et al., 1994, Nicolaides et al., 1998, Craxton et al., 2000, Linderoth et al., 2003). As pesquisas recentes têm valorizado o estudo detalhado de marcadores imunoistoquímicos relacionados ao padrão de comportamento das células neoplásicas no hospedeiro, como moléculas de adesão, moléculas reguladoras da apoptose e proliferação celular e moléculas relacionadas com origem em centro e pós-centro germinativo (Nicolaides et al., 1998, de Leval et al., 2003, de Leval e Harris, 2003). A análise genética molecular dos LDGCB é considerada outra ferramenta importante no estudo desse grupo de linfoma e tem fornecido importantes informações acerca do prognóstico, classificação e patogenia. No entanto, os avanços observados nos estudos dos LDGCB nodais não foram estendidos aos LOP, principalmente em razão de sua baixa freqüência.

A comparação da expressão dos marcadores biológicos relacionados à apoptose, proliferação e ciclo celular e moléculas de adesão em três sítios diferentes de apresentação do LDGCB (LOP, nodal e de acometimento ósseo secundário ou metastático), permitirá caracterização de diferenças e semelhanças entre o LOP e os linfomas dos dois outros sítios. Possíveis diferenças e semelhanças moleculares podem esclarecer a sua patogênese, em pontos obscuros sobre as diferenças clínicas entre essas formas de neoplasia. A análise conjunta dos dados clínicos e de sobrevida e os padrões de imunoexpressão desses marcadores poderão fornecer novas informações prognósticas dessa forma de apresentação, pouco freqüente de LDGCB.

2- OBJETIVOS

Objetivo geral

- Avaliar o LOP e comparar com os LDGCB nodais e de envolvimento ósseo secundário, quanto aos seus aspectos clínicos (idade, localização, sexo, tratamentos instituídos) imunofenotípicos e moleculares genéticos.

Objetivos específicos

- Avaliar e comparar nos três grupos de LDGCB a expressão das moléculas de adesão (CD29, CD62L, CD44 e CD51), relacionadas com apoptose e regulação do ciclo celular (Bcl-2, Bax, p53, Bcl-6, p21 e pRB) e correlacionar com a sobrevida.
- Classificar o compartimento de origem B (pós ou de centro germinativo) nos três grupos de linfomas, através de marcadores imunistoquímicos (CD10, MUM1, Bcl-6, CD138) e correlacionar com sobrevida.
- Avaliar o padrão de expressão das principais subpopulações de células infiltrantes do sistema imune (CD3, CD4, CD5, CD8, CD57, CD68, Foxp3), nos três grupos de linfomas.
- Avaliar a presença de translocações no LOP quanto aos genes BCL2/IGH, MYC, BCL6, CCND1/IGH, ALK e PAX5 e compará-las com os dados existentes sobre linfomas nodais e outros extranodais.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Seleção dos casos e revisão histopatológica

Foram selecionados 138 casos de LDGCB, sendo 76 casos de LOP, 46 casos de linfomas nodais e 16 casos de linfomas com envolvimento secundário para medula óssea (metastáticos). Os casos foram provenientes dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica da FCM-UNICAMP, do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C.-Camargo, Fundação Antônio Prudente e do Instituto de Traumatologia e Ortopedia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Centre Hospitalier Universitaire (CHU Purpan), Toulouse, França. O período da seleção dos casos de LOP, em virtude da raridade da doença, foi bastante amplo, variando de 15 a 30 anos.

A seleção dos casos de LOP foi de acordo com os critérios estabelecidos pela OMS que caracterizam como LOP os linfomas localizados em único sítio ósseo com ou sem envolvimento de linfonodo regional, ou em múltiplos sítios ósseos sem envolvimento visceral ou de linfonodo regional, mantendo-se esse quadro de quatro a seis meses após o início dos sintomas (Fletcher et al., 2002). Pacientes com lesão óssea e envolvimento precoce de vísceras e/ou múltiplos linfonodos a distância e pacientes com linfoma prévio e envolvimento ósseo secundário não devem ser considerados como LOP (Fletcher et al., 2002).

Com exceção das amostras provenientes da França, foram coletados de cada amostra os dados referentes ao sexo, idade, localização do tumor, estágio, evolução, sintomas B e tipo de tratamento instituído. Esses dados foram catalogados em relatórios com os números de registros hospitalares e das biópsias de origem. Casos de linfoma T, associados à infecção pelo HIV e outros tipos de linfomas B foram descartados. Os outros linfomas B encontrados foram linfomas de Hodgkin, linfomas de Burkitt, linfomas linfoblásticos e excepcionalmente foliculares. Casos com biópsia extraviada ou com material insuficiente para análise imunoistoquímica foram excluídos da pesquisa.

A revisão histopatológica foi feita por dois anátomo-patologistas. Inicialmente foram selecionados, de cada caso, os blocos e lâminas coradas em hematoxilina-eosina (HE), a partir dos arquivos dos departamentos envolvidos no projeto. A leitura foi realizada em microscópio óptico de dupla observação e os critérios morfológicos utilizados no diagnóstico de LDGCB nos grupos nodal e ósseo foram baseados na nomenclatura da OMS-2001 de neoplasias hemolinfóides (Jaffe et al., 2001). São eles: presença de células neoplásicas com duas vezes o tamanho dos linfócitos normais, presença de nucléolo proeminente e citoplasma basofílico, observando-se que as células neoplásicas apresentavam semelhanças com centroblastos ou imunoblastos (Jaffe et al., 2001).

A seleção dos casos com envolvimento secundário da medula óssea foi inicialmente realizada nas biópsias com diagnóstico histopatológico de infiltração da medula óssea por LNH e história anterior de LDGCB. Os critérios morfológicos estabelecidos para a revisão dos casos foram: presença de infiltrados paratrabeculares, presença de grandes células com atipia citológica, pouca demarcação do infiltrado e infiltração no tecido hematopoiético adjacente (Jaffe et al., 2001). Os infiltrados benignos foram descartados de acordo com critérios previamente estabelecidos (Jaffe et al., 2001) e os casos duvidosos ou com má representação do linfoma como, por exemplo, ocasionado pelo desgaste do material também não foram selecionados (Thiele et al., 1999). A extensão do infiltrado e a percentagem de grandes células pelo HE não foram consideradas nesta análise bem como o caráter discordante ou não do infiltrado com o linfoma primário.

3.2- Método imunoistoquímico

3.2.1- Marcadores imunoistoquímicos

Foram pesquisados marcadores de imunofenotipagem de linfomas B, das moléculas de adesão envolvidas na migração das células linfóides e moléculas relacionadas com apoptose e proliferação celular, origem das células B

em pós e centro germinativo e células infiltrantes do sistema imune. Abaixo observam-se os quadros 2, 3, 4, 5 e 6, discriminando os anticorpos utilizados na pesquisa quanto à sua origem, função, padronização e tipo de marcação. Os marcadores realizados por método automatizado não exibem alguns itens. Anticorpos que faziam parte em mais de um painel não foram repetidos como por exemplo, o CD3.

Quadro 2- Imunofenotipagem de linfomas B

ANTICORPO	FONTE	ANTÍGENO/ESPECIFICIDADE	MARCAÇÃO	pH	TAMPÃO	DILUIÇÃO	CLONE
1. Anticorpo monoclonal anti-CD20	Dakocytomation, Carpinteira, CA, USA	Marcador de linfócitos B.	membrana celular	7.2	citrato	1:800	L26
2. Anticorpo monoclonal anti-CD3, linfócito T		Marcador de linfócitos T.	citoplasma	7.2	citrato	1:200	F7.2.38
3. Anticorpo monoclonal anti-CD99, sarcoma de Ewing		Marcador do sarcoma de Ewing	membrana celular	7.2	citrato	1:50	MIC-2
4. Anticorpo monoclonal anticélula plasmática		Marcador de células plasmáticas normais e neoplásicas.	citoplasma	7.2	EDTA	1:50	VS38c
5. Anticorpo monoclonal anti-CD30		Marcador de célula de Reed-Stenberg	membrana celular	7.2	EDTA	1:80	Ber-H2
6. Anticorpo monoclonal anti CD5	Novocastra, Newcastle, UK	Marcador de células T e pequena quantidade de células B periféricas.	membrana celular		citrato	1:20	4C7
7. Anticorpo monoclonal anticadeia leve kappa		Marcador da cadeia leve kappa de imunoglobulinas nas células B.	citoplasma		citrato	1:1200	Kp-53
8. Anticorpo monoclonal anticadeia leve lambda		Marcador da cadeia leve lambda de imunoglobulinas nas células B.	citoplasma		citrato	1:1600	HP-6054
9. Anticorpo monoclonal CD138		Marcador de células B precursoras da medula óssea e células B nas fases mais tardias de desenvolvimento.	citoplasma e membrana celular		citrato	1:80	5F7
10. Anticorpo monoclonal CD38		Marcador de plasmócitos secretores de Ig, linfócitos pré B e centro germinativos	membrana celular		citrato	1:100	SPC32
11. Anticorpo policlonal PAX5	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA	Marcador da proteína Pax5 encontrada em linfócitos pró e pré-B e maduros.	nuclear			1:50-1:500	
12. Anticorpo monoclonal BOB1	Abcam plc, Cambridge. UK	Marcador da proteína transcripcional co-ativadora específica para linfócitos B Bob1	nuclear	7.5	citrato	1:50-1:100	Wue-AC5

Quadro 3- Apoptose e regulação do ciclo celular

ANTICORPO	FONTE	ANTIGENO/ESPECIFICIDADE	MARCAÇÃO	pH	TAMPÃO	DILUIÇÃO	CLONE
1. Anticorpo policlonal anti-Bax	Dako	Marcador da oncoproteína Bax que promove a apoptose e morte celulares.	citoplasma	7.2	citrato	1:1500	Bax
2. Anticorpo monoclonal antiproteína p53	Dako	Marcador da oncoproteína p53 que regula o ciclo celular e induz apoptose	nuclear	7.2	EDTA	1:100	DO-7
3. Anticorpo monoclonal anti-oncoproteína Bcl-2	Dako	Marcador da oncoproteína Bcl-2 que bloqueia a apoptose celular	citoplasma	7.2	citrato	1:150	124
4. Anticorpo monoclonal anti Waf1(p21)	Novocastra,	Marcador da proteína p21 envolvida no mecanismo do ciclo celular	nuclear		citrato	1:20	4D10
5. Anticorpo monoclonal antiproteína do retinoblastoma		Marcador do produto do gene supressor tumoral pRB do retinoblastoma envolvido na regulação do ciclo celular	nuclear		citrato	1:25	13A4210

Quadro 4- Moléculas de adesão

ANTICORPO	FONTE	ANTIGENO/ESPECIFICIDADE	MARCAÇÃO	pH	TAMPÃO	DILUIÇÃO	CLONE
1. Anticorpo policlonal anti-CD44	Dako,	Utilizado no estudo da linfomopoiese e adesão celular.	membrana celular	7.2	citrato	1:40	DF1485
2. Anticorpo monoclonal anti-L-selectina (CD62L)	Novocastra	Marcador da molécula de adesão L-selectina	membrana celular predominantemente mas e citoplasma pode ser observado		citrato	1:25	9H6
3. Anticorpo monoclonal anti CD29	Novocastra	Marcador das integrinas beta 1 encontrada em linfócitos T e leucócitos.	membrana celular		citrato	1:600	7F10
4. Anticorpo monoclonal anti CD51.	Novocastra	Conhecido como integrina alfa-V é encontrado em células NK, plaquetas, leucócitos, macrófagos.	membrana celular		citrato	1:150	CJ100

Quadro 5- Origem B centro e pós-centro germinativo

ANTICORPO	FONTE	ANTIGENO/ESPECIFICIDADE	MARCAÇÃO	pH	TAMPÃO	DILUIÇÃO	CLONE
1. Anticorpo monoclonal anti proteína MUM-1	Dako	Marcador de linfócitos B no último estágio de maturação no centro germinativo e etapas subsequentes na maturação até plasmócitos.	nuclear	7.2	citrato	1:100	MUM 1p
2. Anticorpo monoclonal antioncoproteína Bcl-6	Dako	Marcador de células B do centro germinativo	nuclear	7.2	citrato	1:100	PG- B6p
3. Anticorpo monoclonal anti CD10	Novocastra	Marcador de linfócitos situados no centro germinativo	citoplasma		citrato	1:150	56C6

Quadro 6- Células infiltrantes do sistema imune

ANTICORPO	FONTE	ANTIGENO/ESPECIFICIDADE	MARCAÇÃO	pH	TAMPÃO	DILUIÇÃO	CLONE
1. Anticorpo monoclonal anti-CD4	Dako	Marcador de linfócitos T auxiliares	Membrana celular			1:50- 1:100	MT310
2. Anticorpo monoclonal anti CD8	Dako	Marcador de linfócitos T citotóxicos	citoplasma			1:50- 1:100	C8/144B
3. Anticorpo monoclonal anti CD57	Dako	Marcador de linfócitos T/NK	membrana celular e citoplasma			1:25-1:50	TB01
4. Anticorpo monoclonal anti CD68	Dako	Marcador de macrófagos e monócitos	citoplasma/granular ou difuso			1:50- 1:500	KP1
5. Anticorpo monoclonal anti FOXP3	Santa Cruz Biotechnology, CA,USA	Marcador de FOXP3 de origem humana	citoplasma			1:50- 1:500	221D/D3

3.2.2- Técnica imunoistoquímica

O estudo imunoistoquímico foi realizado nas dependências do Laboratório de Imunoistoquímica, no Departamento de Anatomia Patológica – Caism – FCM – Unicamp e no Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Centre Hospitalier Universitarie (CHU Purpan).

As lâminas foram desparafinadas com banho em xilol a 100°C e posterior passagem em mais dois xilóis à temperatura ambiente. Após, as lâminas foram banhadas em três álcoois absolutos, um álcool 80% e um álcool 50% para hidratação progressiva. Foram, então, lavadas em água corrente por 3 minutos e passadas em água destilada.

Para inibição da peroxidase endógena, as lâminas passaram por três banhos de 3 minutos cada, em solução de peróxido de hidrogênio a 3%, à temperatura ambiente e novamente lavada em água corrente por 3 minutos e passadas por água destilada.

A recuperação antigênica foi realizada pela imersão das lâminas em tampão citrato 10mM, pH 6, 0, durante 30 minutos acerca de 98°C, usando panela a vapor (alternativamente pode-se utilizar tampão Tris-EDTA 0,05M pH 8,9). Após isto, esperou-se 15 a 20 minutos para que o conjunto (lâminas imersas no tampão) esfriasse. Realizou-se a lavagem das lâminas em água corrente por 3 minutos, com posterior passagem em água destilada, após o que foram colocadas em solução tampão fosfato (PBS), durante 5 minutos.

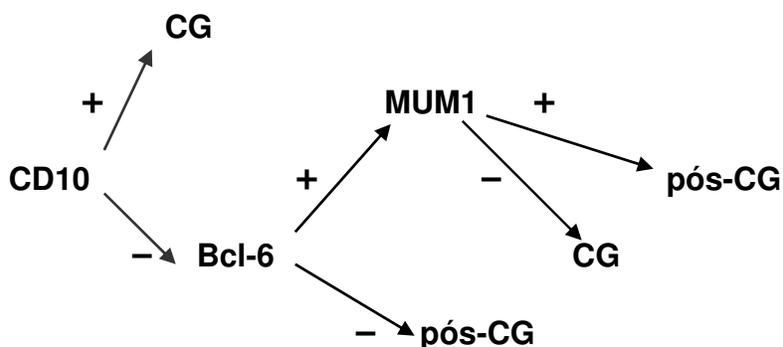
As lâminas foram incubadas com anticorpo 30' em estufa a 37°C e, após, incubadas por toda a noite (16-20 horas) a 4 C em câmara úmida. Na manhã seguinte, retirou-se o excesso do anticorpo primário; seguindo-se três lavagens em PBS de 5 minutos em temperatura ambiente. Foram utilizados dois kits para amplificação da reação imunoistoquímica e do anticorpo secundário: NovoLink (Novocastra, Newcastle, UK) e LSAB+, Peroxidase, HRP (DakoCytomatiom V. G., Carpinteira, CA, USA).

A coloração foi realizada com 60 mg de DAB (3,3 tetra-hidrocloro de diamino-benzidina, SIGMA D5637) - cromógeno de cor marrom impregnado-no local onde ocorreu a reação, dissolvido em 100 ml de PBS com 1 ml de dimetil-sulfóxido e 0,5 ml de peróxido de hidrogênio 10%, com posterior lavagem em água corrente. Seguiu-se a contracoloração com hematoxilina de "Harris" e realizada nova lavagem em água corrente. A seguir, as lâminas foram

desidratadas com banhos em álcool absoluto, passadas em xilol e posterior montagem com resina Entellan (Merck, cód. 7961). A positividade foi evidenciada pela marcação em marrom da estrutura celular que encerrava a proteína analisada (padrão nuclear, citoplasmático ou de membrana) contrastando com o roxo dos núcleos e das células que não foram marcadas e coradas apenas pela hematoxilina de “Harris”. Todas as reações foram realizadas com os controles positivos específicos para cada anticorpo.

3.2.3- Método de classificação nos grupos centro germinativo e pós-centro germinativo (pós-CG)

A classificação molecular dos LDGCB foi baseada no algoritmo proposto por Hans et al (2004) e realizada em 68 amostras de LOP e 45 de LDGCB nodais (Hans et al., 2004). O grupo metastático não foi submetido a esta classificação em virtude de dificuldades técnicas e escassez do material. Este método baseia-se na expressão imunistoquímica dos anticorpos CD10, MUM-1 e Bcl-6 para classificar nos dois subgrupos, CG e PÓS-CG. As amostras de LDGCB com expressão isolada para CD10 ou associada ao Bcl-6 foram classificadas no subgrupo CG, se ocorreu negatividade destes dois marcadores, considerou-se como sendo do grupo pós-CG. Nos casos de LDGCB que foram negativos para CD10, mas positivos para Bcl-6, a expressão de MUM-1 determinou o subgrupo, se foi positivo para MUM-1 considerou-se pós-CG e se negativo CG (Hans et al., 2004, Sjo et al., 2007). De acordo com Hans et al., 2004, temos no esquema abaixo o algoritmo para classificação em centro germinativo e pós-centro germinativo.



3.3- Técnica do microarranjo matricial de tecidos (TMA, do inglês “tissue microarray”)

Esta técnica foi escolhida, neste estudo, por permitir o uso de grande número de casos e/ou marcadores, sem perda significativa da representatividade do tumor em relação aos estudos com cortes histológicos inteiros, tanto para imunohistoquímica, quanto para FISH. (Hedvat et al., 2002, Shergill e Arya, 2004, Shergill et al., 2004, Poulsen et al., 2005).

A reação de imunohistoquímica dos casos de linfoma secundário em osso (metastáticos) foi realizada em cortes histológicos dos blocos originais. A pouca representação dos linfomas, obtidos a partir de biópsias de agulha fina e a dificuldade na seleção das áreas do TMA favoreceram a escolha deste método.

Para a construção do TMA foram selecionadas nas biópsias de LOP, três áreas com maior representatividade tumoral, foram evitadas áreas com necrose e de tecido ósseo maduro. Nas biópsias de linfoma nodal foram selecionadas duas áreas representativas. Em seguida foram feitas marcações circulares com tinta azul nas áreas selecionadas dos blocos e lâminas, tendo-se o cuidado de verificar se as duas marcações eram correspondentes. Os blocos das biópsias originais foram denominados de blocos doadores e o bloco onde foi construído o TMA foi denominado de receptor ou bloco mãe. Uma planilha foi construída com as biópsias de LOP e linfoma nodal sendo agrupadas e ordenadas de acordo com a instituição de origem e número da biópsia.

Foi utilizado na confecção do TMA³ o aparelho de precisão da *Beecher Instruments Microarray Technology* (Beecher Instruments, Inc, Sun Prairie, WI, USA). Durante a confecção do TMA foi utilizada agulha com 0,6mm de diâmetro interno acoplada a eixo milimetrado. O primeiro furo no bloco receptor foi de acordo com a ordem estabelecida na planilha original. Após a retirada do cilindro de parafina do bloco receptor, perfurou-se o primeiro bloco doador nas áreas previamente marcadas, obtendo-se o cilindro de tecido tumoral dentro da agulha. O tecido foi implantado na respectiva cavidade do bloco receptor. Este procedimento foi repetido sucessivamente em todos os blocos de linfoma ósseo e nodal.

Ao final, foram construídos cinco blocos receptores, um bloco com casos do Brasil, contendo as 44 amostras de LOP e 46 de linfoma nodal e quatro blocos da França, contendo as 32 amostras de LOP. O primeiro cilindro de tecido hepático normal serviu como orientação para o correto posicionamento do TMA durante a leitura microscópica. Nos blocos confeccionados em Toulouse, França foram adicionados cilindros de amígdalas normais para controle positivo das reações imunoistoquímicas e sondas utilizadas no método de FISH. O bloco receptor foi cortado em micrótomo rotativo para blocos histológicos parafinados. Os cortes histológicos obtidos foram colados em fita adesiva especial.

Os cortes histológicos de cinco micrômetros que foram aderidos à fita adesiva e obtidos em 100 níveis diferentes com distância de 10 micrômetros entre si, foram numerados e colados sobre lâminas especiais eletricamente carregadas. Os cortes foram tratados com luz ultravioleta e solvente químico para descolarem as fitas adesivas e apenas os cortes histológicos permaneceram nas lâminas, sendo recobertos em seguida com parafina e armazenados em “freezer” para conservação.

³ Gugelmin, E. S. Tumores do plexo coróide: novas perspectivas após revisão histopatológica e estudo imunoistoquímico através da técnica de *tissue microarray* (TMA) de 36 carcinomas e 8 papilomas em crianças. Local: UFRP, 2005, 279p. Tese de doutorado, Curitiba, 2005.

Cortes em três níveis do bloco de TMA (níveis 40, 60 e 86) foram corados em HE para demonstração da qualidade das amostras dos linfomas.

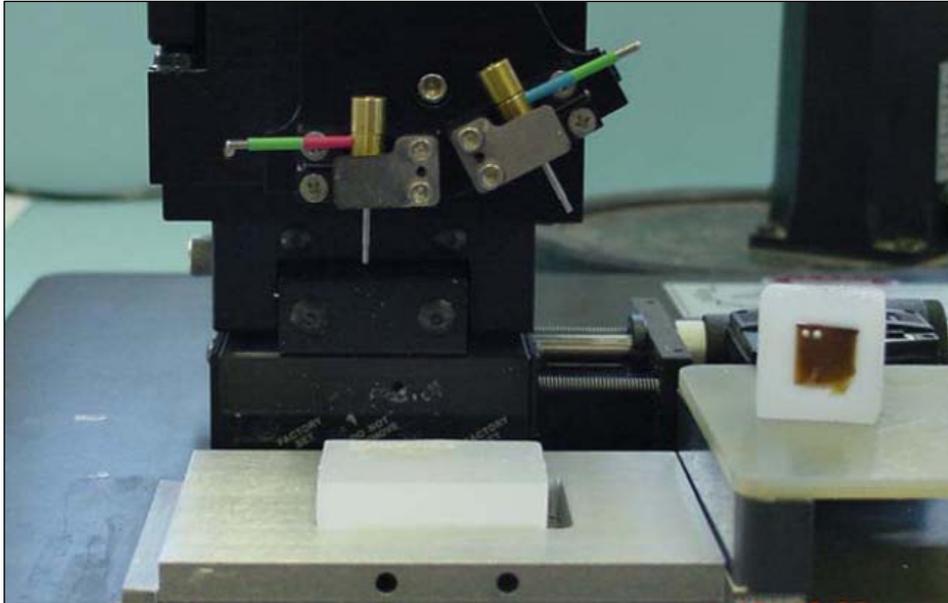


Figura 1- Aparelho de *tissue microarray* (TMA) da *Beecher Instruments Microarray Technology*, demonstrando bloco receptor posicionado ao lado do bloco doador (Departamento de Patologia - Hospital AC Camargo)

3.3.1- Método de leitura das lâminas de TMA

As leituras das reações imunoistoquímicas foram realizadas pelos pesquisadores patologistas participantes do trabalho. A leitura sempre se iniciou com lâmina posicionada à esquerda do observador, onde existia fragmento de tecido hepático que demarcava o começo do TMA.

As planilhas com as amostras selecionadas facilitaram a leitura do TMA. A expressão de todos os anticorpos analisados foi baseada a partir da percentagem de células linfomatosas coradas pelo anticorpo (Foucar, 2002, Hans et al., 2004, Shergill et al., 2004, Lossos e Morgensztern, 2006):

- Igual ou acima de 10% foi considerado **positivo**
- Menor de 10% foi considerado **negativo**

O marcador de proliferação celular Ki-67 foi avaliado semiquantitativamente quanto à porcentagem de células coradas, após a leitura no microscópio óptico, não se utilizou programa de computação específico para quantificar imunexpressão do anticorpo. Foram classificados como de índice elevado, os tumores que expressaram o anticorpo igual ou acima de 50% das células e de índice moderado os tumores com expressão em menos de 50% das células (Nicolaidis et al., 1998). Os anticorpos relacionados com as células imunes infiltrantes foram avaliados semiquantitativamente em relação à porcentagem de linfócitos reacionais presentes que expressaram os anticorpos. Para estes anticorpos, se mais de uma amostra foi analisada no TMA, o valor mais alto de porcentagem foi valorizado (Foucar, 2002, Hedvat et al., 2002, Dabbs, 2006). Células não tumorais que expressavam o anticorpo analisado foram utilizadas como controle interno positivo da reação.

Amostras não interpretáveis: não foram avaliadas as amostras com perda acentuada do tecido tumoral, amostras com artefatos técnicos, amostras com representação de tecido não tumoral e amostras contendo artefatos decorrentes de excesso de fundo da imunocoloração ou com imunomarcagem fora do padrão reconhecido na literatura e pelos fabricantes. Pesquisadores da área consideram aceitáveis a não representação de até 30% dos casos em cada lâmina de TMA (Hsu et al., 2002, Milanes-Yearsley et al., 2002, Hans et al., 2004).

3.4- Análise da hibridização *in situ* fluorescente (FISH, do inglês *fluorescence in situ hybridization*)

Foram utilizadas duas sondas de dupla fusão (dual fusion): LSI IGH/BCL2 e LSI IGH/CCND1 Dual Color, Dual Fusion Translocation Probes (Vysis, Abbott Molecular Inc., Des Plaines, USA) e quatro sondas de dissociação

(break-apart): LSI BCL-6 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe (Vysis); PAX5 DNA FISH Probe, Split Signal (Dako Cytomation, Denmark, USA), ALK DNA FISH Probe, Split Signal (Dako), c-MYC DNA FISH Probe, Split Signal (Dako). A técnica de FISH foi realizada igualmente sobre cortes de 5 µm do TMA contendo os casos de LOP, segundo protocolo fornecido pelos fabricantes das sondas. A técnica de FISH foi inteiramente realizada no Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Centre Hospitalier Universitaire (CHU Purpan).

Resumindo o protocolo: as lâminas de TMA do Brasil e da França foram submetidas a um pré-tratamento com solução de 2XSSC (NaCl / citrato de sódio) e desidratadas em uma bateria de álcoois 70%, 80% e 100% à temperatura ambiente. Para desnaturação, as lâminas foram colocadas em uma solução de 70% formamida/ 30% 2XSSC (pH 7.0) aquecida a 73°C por cinco minutos. A sonda desnaturada simultaneamente foi aplicada sobre as lâminas, cobertas com lamínula e colocadas, em câmara úmida e no escuro, em estufa a 37°C por, no mínimo, seis horas ou, preferencialmente, “overnight”. Após esse período, as lâminas foram lavadas em uma seqüência de três banhos de formamida e 2XSSC a 45°C por dez minutos e, por cinco minutos, na solução de 2XSSC e NP 40%. No momento da análise, as lâminas foram coradas com 10uL de DAPI II (Vysis, Inc.) e cobertas com lamínula.

3.5- Interpretação dos achados do FISH

Os sinais de FISH foram analisados, utilizando-se o microscópio de fluorescência Zeiss modelo Axioplan dois (Karl Zeiss, Inc., Thornwood, NY, USA), equipado com objetiva 100x. A sonda hibridizada foi visualizada com os fluocromos: DAPI (contracoloração), FITC, spectrum orange TM (Vysis). As imagens foram capturadas e processadas pelo software Ikaro & Isis versão 5.0 (Metasystems, Altusheim, Germany). Uma pontuação de, no mínimo, 50 núcleos com sinais foi estabelecida para convalidar os resultados em cada caso de LOP.

Nas sondas do tipo “break-apart” foi utilizado um sistema de corte reproduzível e devidamente legitimado em outros estudos. Este sistema avalia a distância entre os sinais verdes e vermelhos dos genes estudados; aqueles com distância menor ou igual ao tamanho de um sinal ou fusionados, produzindo cor amarela foram considerados normais; aqueles com distância maior ou acima do tamanho de um sinal foram considerados positivos para a translocação (Cook, 2004, Ventura et al., 2006).

Na sonda tipo “dual-fusion”, a presença de dois sinais, verde e vermelho, fusionados ou com distância menor do tamanho de um sinal foi considerada como resultado positivo. O ponto de corte utilizado, em todos os casos, foi de 10% dos núcleos com sinais exibindo translocação e foi previamente estabelecido em outros trabalhos, utilizando material em parafina com TMA (Cook, 2004). Casos com sinais duvidosos, ausentes e com artefatos decorrentes da fixação e descalcificação do material foram excluídos.

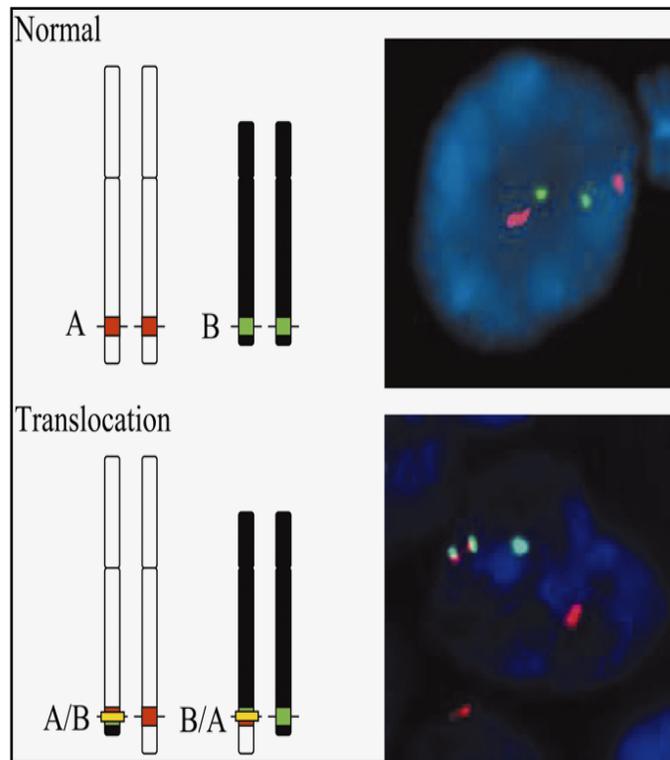


Figura 2- Sonda do tipo “dual-fusion”, demonstrando cromossomo normal e com translocação recíproca. Acima, observam-se dois sinais verdes e dois vermelhos separados (*splits*) em uma célula não neoplásica e as sondas ligando-se nos respectivos *loci* nos cromossomos não translocados. Abaixo, observam-se dois sinais amarelos (verde e vermelho justapostos) que correspondem aos fragmentos que foram trocados, dando origem aos novos cromossomos “derivados” e o alelo normal com sinal verde e vermelho separado (Cook, 2004).

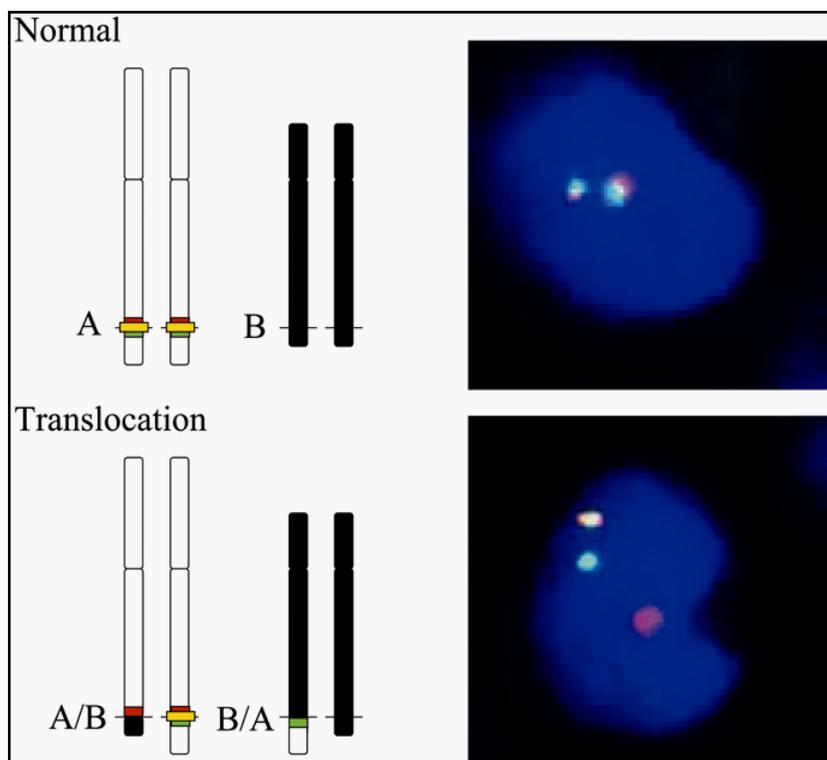


Figura 3- Sonda do tipo “break-apart”, demonstrando cromossomo normal e com translocação recíproca. Acima, observam-se dois sinais verdes e dois vermelhos justapostos, produzindo dois sinais amarelos em uma célula normal e as sondas ligando-se nas regiões adjacentes logo acima e abaixo dos respectivos *loci* nos cromossomos. Abaixo, observam-se dois sinais (um verde e um vermelho), produzindo *split*, correspondendo aos fragmentos que foram trocados e alelo normal com sinal amarelo (Cook, 2004).

3.6- Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, sob protocolo número 492/2003 de 20 de Abril de 2004.

3.7- Metodologia estatística

Foi utilizado o estimador de *Kaplan-Meier* para as curvas de sobrevida (tempo até a ocorrência do óbito) considerando-se como evento a categoria morto pelo linfoma ou suas complicações. Para comparar a sobrevida de cada grupo utilizou-se o teste “log-rank”.

Para verificar se existia associação entre as variáveis categóricas, foi utilizado o teste Qui-quadrado. Quando os valores esperados foram menores que cinco, utilizou-se o teste Exato de Fisher. O nível de significância adotado foi de 5%, ou seja, $p\text{-valor} \leq 0,05$.

4- RESULTADOS

4.1- Resultados epidemiológicos

a. **LOP:** nos 44 casos do Brasil, a faixa etária variou de 14 a 90 anos e a média de idade observada foi de 46 anos, 45% (20/44) foram do sexo feminino e 54% (24/44) do sexo masculino. Não ocorreram sintomas B (febre, sudorese, emagrecimento acima de 10% do peso) (Carbone et al., 1971). A análise da curva de sobrevida relacionando os pacientes acima (6/27) e abaixo (21/27) de 60 anos não demonstrou significância estatística. Abaixo observa-se a freqüência dos casos de LOP de acordo com o sítio envolvido.

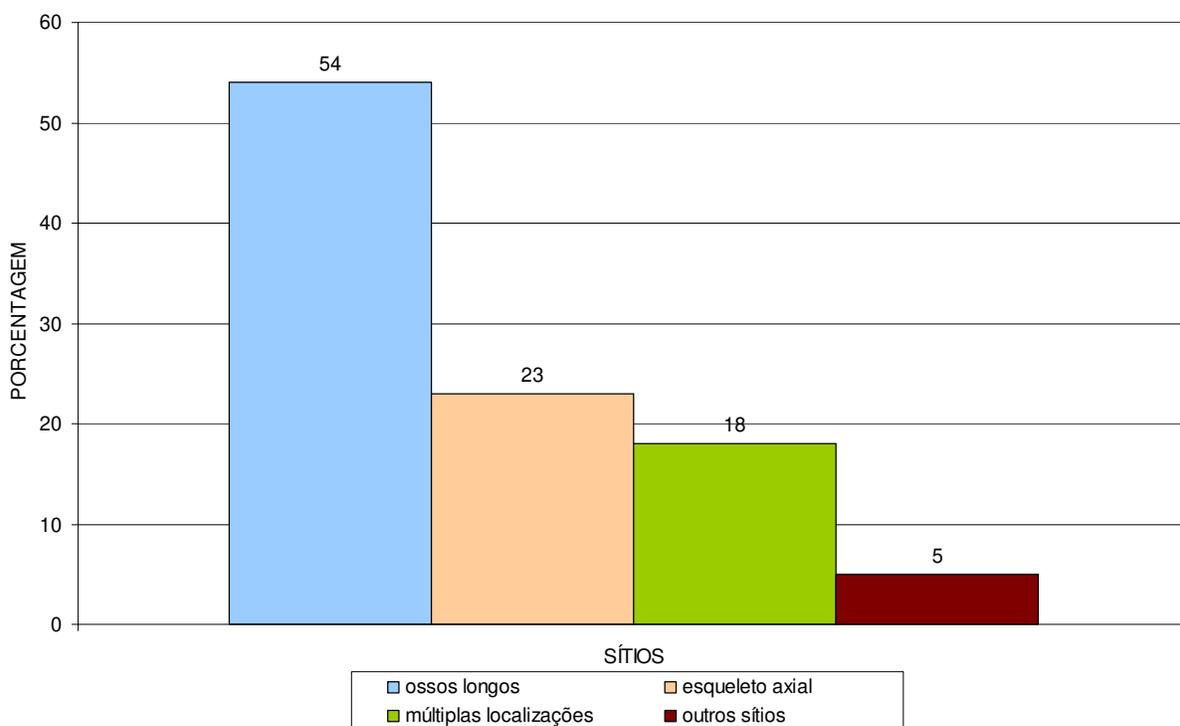


Figura 4- Percentual da distribuição dos casos de linfoma ósseo primário de acordo com sítio

O estágio clínico de acordo com Sistema Ann Arbor (1993) revelou os seguintes resultados:

- 56% (19/34) ESTÁDIO I E.
- 12% (4/34) ESTÁDIO II E.
- 3% (1/34) ESTÁDIO III E.
- 29% (10/34) ESTÁDIO IV E.

A análise estatística da curva de sobrevida, agrupando-se os estádios I e II com o estágio IV revelou significância estatística ($P=0,0245$). O estágio com melhor tempo médio de vida e menor número de óbitos foi o estágio agrupado I+II.

O tipo de tratamento constou em quimioterapia (74%, 28/38), radioterapia (55%, 21/38), cirurgia (26%, 10/38), transplante de medula óssea: (5%, 2/38).

A média do seguimento dos pacientes foi de 42 meses; 81% (21/26) dos pacientes permaneceram vivos (16/21 sem doença e 5/21 com doença) e 19% (5/26) morreram pelo linfoma. Dezoito por cento (5/28) dos pacientes sofreram recidiva tumoral com tempo médio de sobrevida de 26 meses.

b. LDGCB nodal: em 46 casos, a média de idade foi de 53 anos e variou de 20 a 79 anos; 61% (28/46) eram do sexo feminino e 39% (18/46) do sexo masculino. Cinquenta e três por cento (24/45) dos pacientes evoluíram com sintomas B. Quarenta e nove por cento (22/45) dos pacientes foram incluídos no estágio clínico IV, 30% (13/45) no III e 22% (10/45) no I. A recidiva ocorreu em 31% (14/45) dos pacientes e o tratamento mais utilizado foi quimioterapia (89%, 41/46) seguido de transplante de medula óssea (16%, 7/43), radioterapia (15%, 7/46) e cirurgia (2%, 1/46).

c. LDGCB metastático para medula óssea: em 16 casos, a média de idade foi de 56 anos e a faixa etária variou de 23 a 77 anos. Cinquenta e seis por cento (9/16) eram do sexo masculino e 44% (7/16) sexo feminino. Setenta e cinco por cento (12/16) dos pacientes evoluíram com sintomas B. Todos os pacientes se

apresentavam no estágio IV. A recidiva ocorreu em 25% (4/16) dos pacientes. Noventa e quatro por cento (15/16) dos pacientes foram submetidos à quimioterapia, 6% (1/16) à radioterapia, 6% (1/16) ao transplante de medula óssea e 6% (1/16) à cirurgia.

4.2- Revisão histopatológica e imunofenotipagem da linhagem B

Todos os exemplares (grupos LOP, nodal e metastático) foram revistos e classificados como LDGCB a partir da análise morfológica em HE e imunofenotipagem com CD20, CD3 e Ki 67.

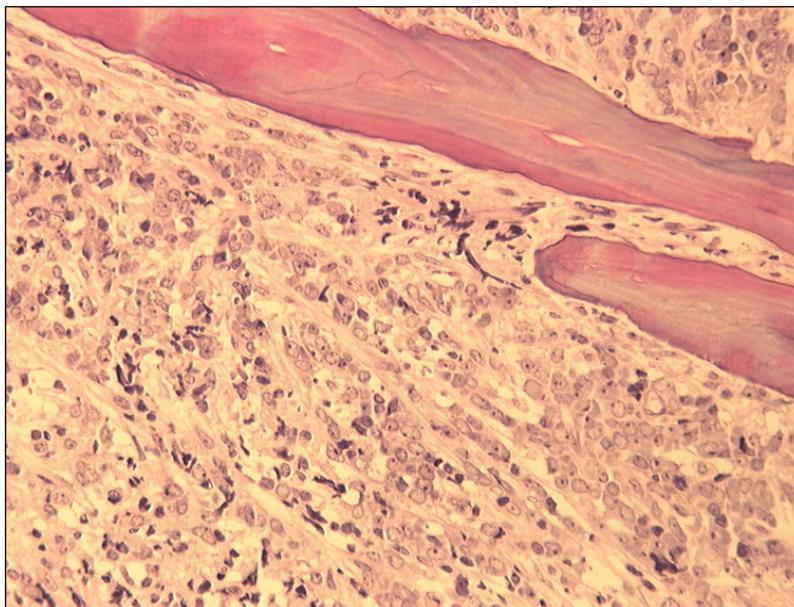


Figura 5- Linfoma ósseo primário, infiltrando tecido ósseo trabecular (HE, 40X)

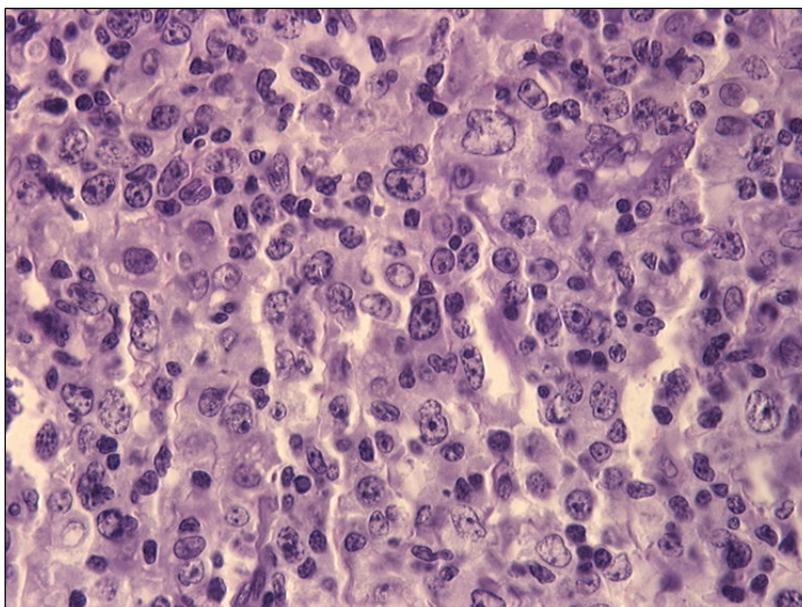


Figura 6- Linfoma ósseo primário, demonstrando padrão difuso de grandes células. Observam-se células tumorais de padrão centroblástico, volumosas, irregulares e com núcleo vesicular (HE, 100X)

4.3- Resultados do estudo imunoistoquímico

4.3.1- Moléculas de adesão

- **CD29:** oitenta e um por cento dos casos de LOP foram avaliados (36/44). Seis por cento (2/36) dos casos de LOP foram positivos e 94% (34/36) negativos, 18% (8/44). Os linfomas nodais não demonstraram expressão dessa molécula. Vinte e cinco por cento (4/16) dos metastáticos foram positivos e 75% negativos (12/16) ($P= 0, 0024$) (Figura 7).

A análise da sobrevida demonstrou relação entre os grupos que não expressaram CD29: LOP e metastático ($P= 0, 0040$), metastático e nodal ($P= 0, 0104$). A menor sobrevida ocorreu no grupo metastático e a melhor nos grupos LOP e nodal negativos (Figura 8).

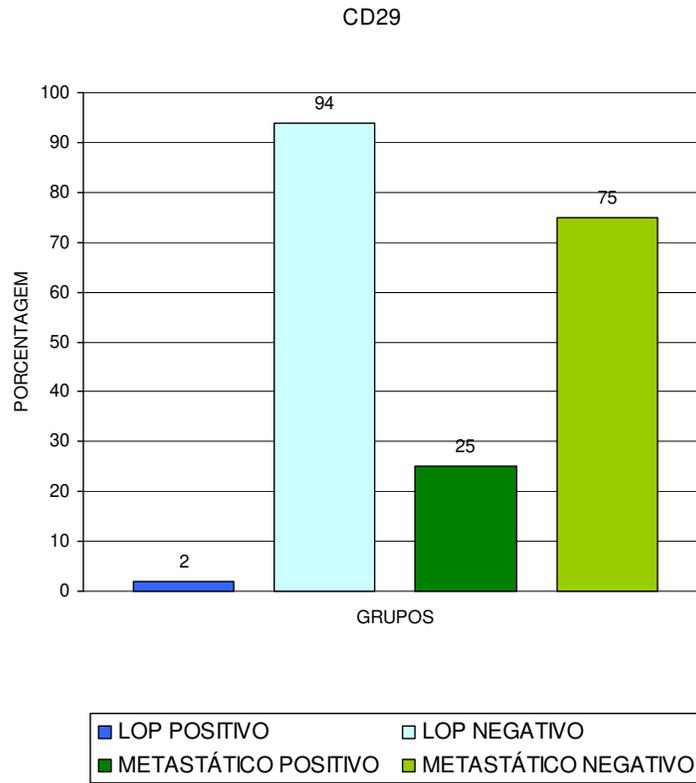


Figura 7- Percentual da expressão do CD29 nos dois grupos (LOP, metastático) de linfoma difuso de grandes células B

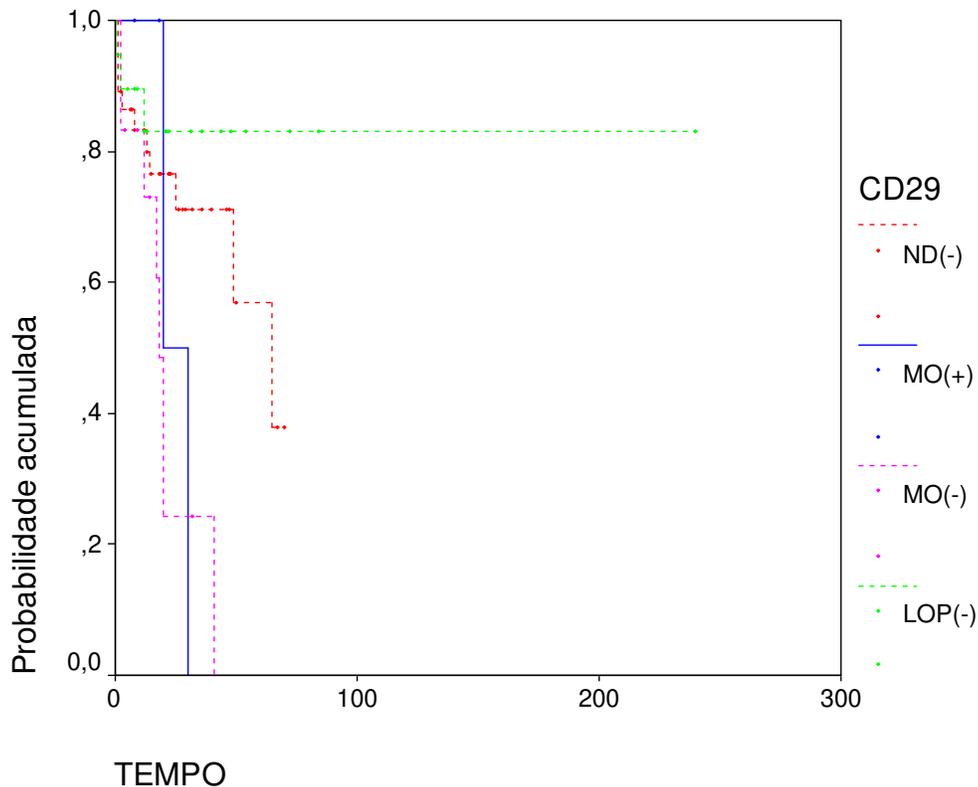


Figura 8- Curva de sobrevivida, demonstrando a relação da expressão da molécula CD29 com a sobrevivida nos três grupos de linfoma difuso de grandes células B (ND: nodal, MO: metastático, LOP)

- **CD62L:** noventa e três por cento (41/44) dos casos de LOP foram avaliados. A expressão desta proteína nos três grupos de linfomas foi negativa. A análise da sobrevivida demonstrou significância entre os grupos LOP negativo e metastático negativo ($P= 0, 0021$) com menor sobrevivida neste último grupo e melhor no grupo LOP negativo (Figura 9).

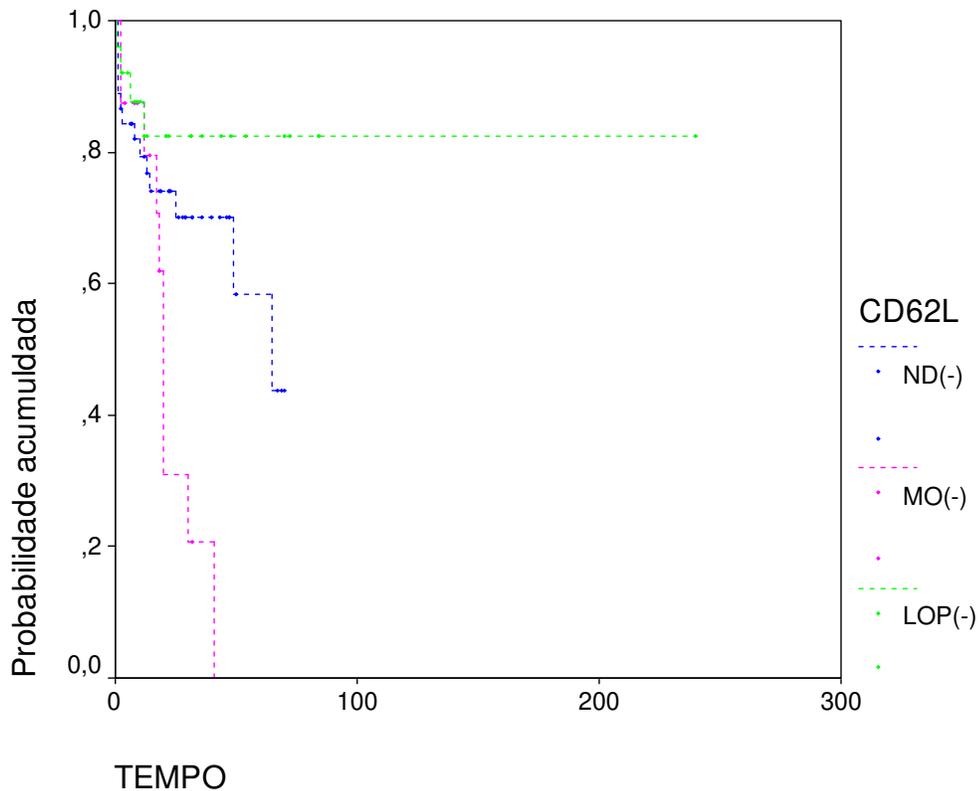


Figura 9- Curva de sobrevivência, demonstrando a relação da expressão da molécula CD62L com a sobrevivência nos três grupos de linfoma difuso de grandes células B (ND: nodal, MO: metastático, LOP)

- CD44:** sessenta e um por cento (27/44) dos casos de LOP foram avaliados. Cinquenta e seis por cento (15/27) foram positivos e 44% (12/27) negativos. Noventa e oito por cento dos casos de linfoma nodal foram avaliados. Sessenta e sete por cento (30/45) dos casos foram positivos e 33% (15/45) foram negativos. Oitenta e um por cento (13/16) foram positivos do grupo metastático e 18% (3/16) negativos (Figura 11). A análise da sobrevivência não demonstrou significância estatística entre os grupos. A menor sobrevivência observada foi no grupo metastático positivo, enquanto o grupo LOP negativo demonstrou melhor sobrevivência (Figura 12).

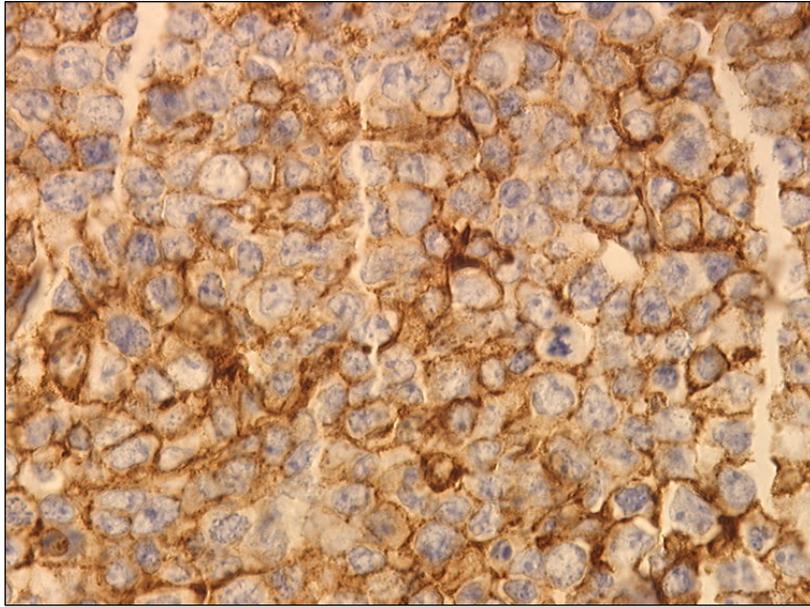


Figura 10- Imunoexpressão do CD44 na membrana citoplasmática das células de linfoma ósseo primário (100X)

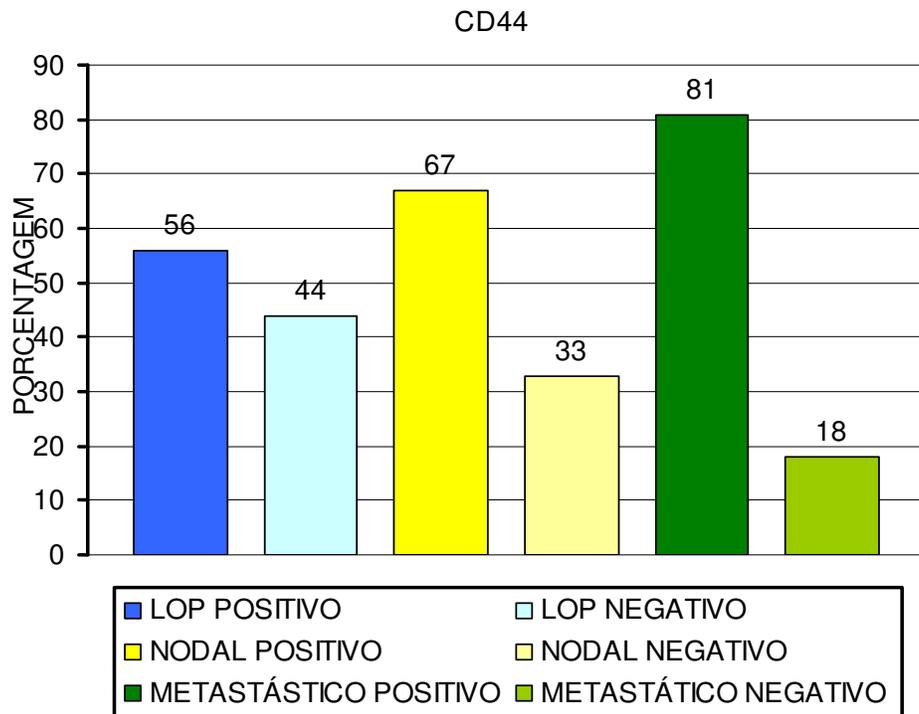


Figura 11- Percentual da expressão do CD44 nos três grupos de linfoma difuso de grandes células B

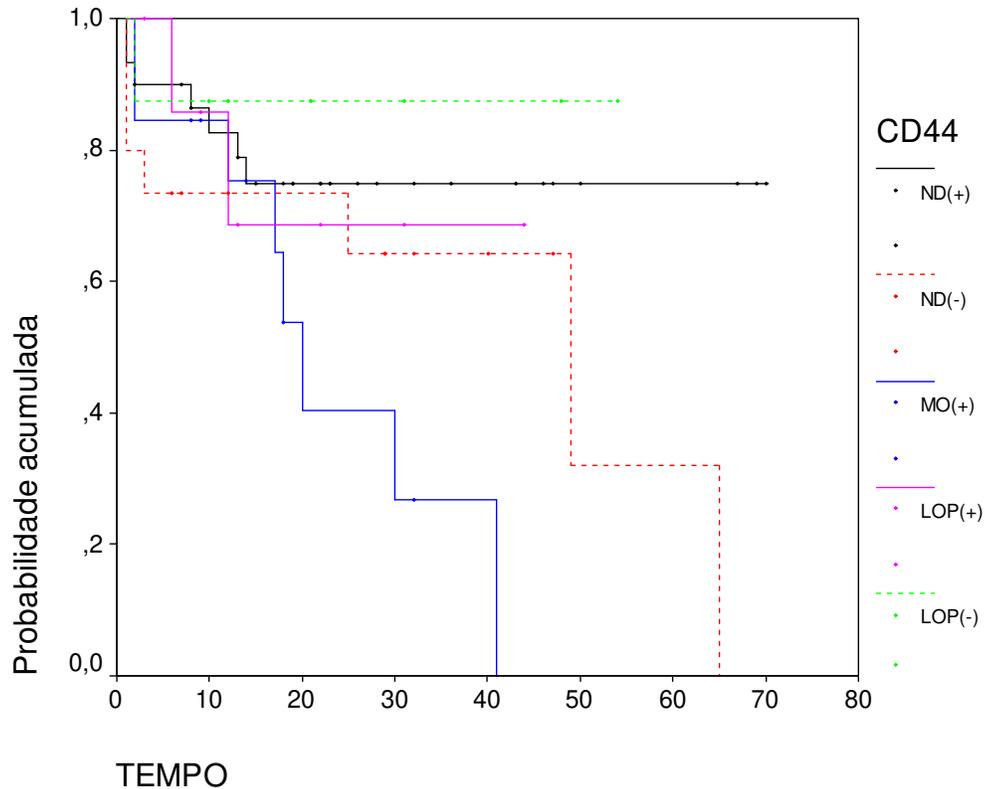


Figura 12- Curva de sobrevivência, demonstrando a relação da expressão da molécula CD44 com a sobrevivência nos três grupos de linfoma difuso de grandes células B (ND: nodal, MO: metastático, LOP)

- **CD51:** noventa e três por cento (41/44) dos casos de LOP foram avaliados. A expressão do CD51 foi negativa no grupo LOP (0/41). Dois por cento (1/46) dos casos de linfoma nodal foram positivos e 98% (45/46) negativos. Quarenta e quatro por cento (7/16) dos casos do grupo metastático foram positivos e 56% (9/16) negativos ($P=0,0001$) (Figura 13). Na análise da sobrevivência ocorreu significância estatística nos grupos que não expressaram a molécula CD51, grupos LOP e metastático ($P=0,0137$), metastático e nodal ($P=0,0310$). A menor sobrevivência ocorreu no grupo metastático negativo. Os grupos LOP e nodal que foram negativos demonstraram melhor sobrevivência (Figura 14).

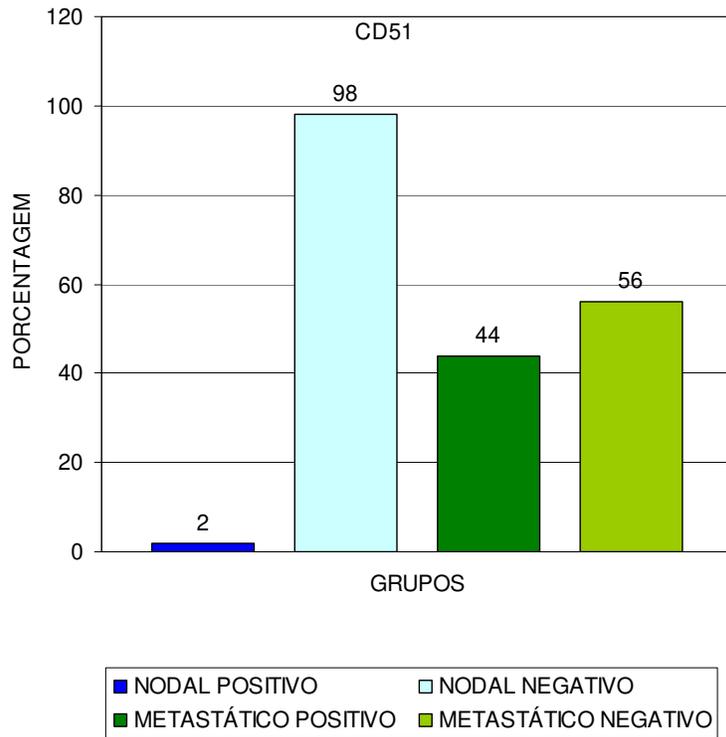


Figura 13- Percentual da expressão do CD51 nos grupos de linfoma difuso de grandes células B

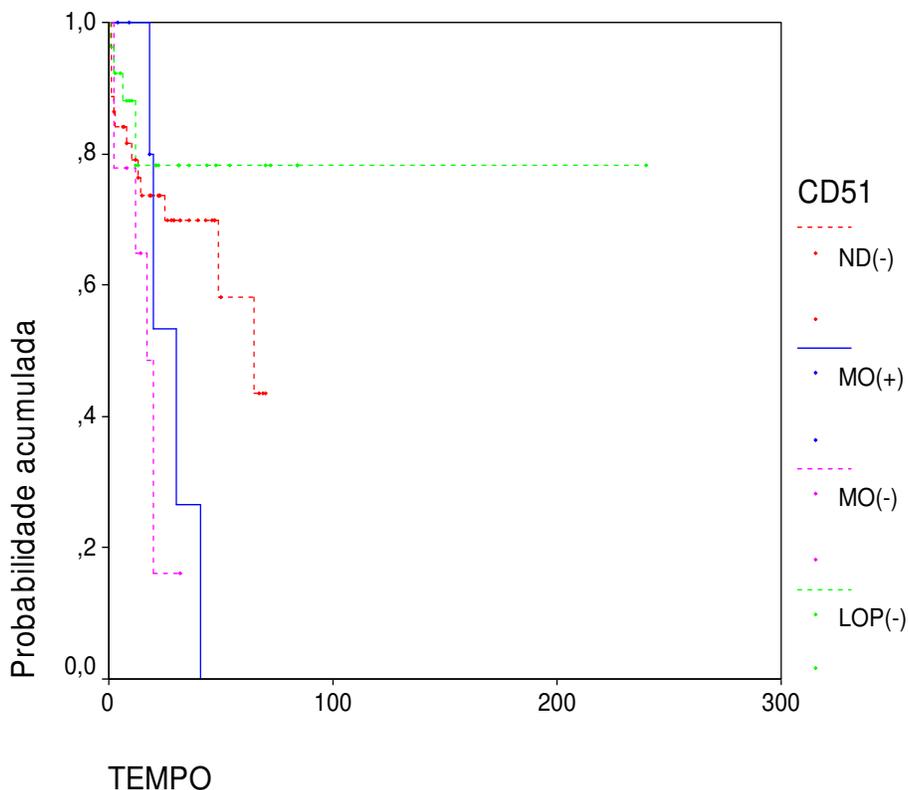


Figura 14- Curva de sobrevivência, demonstrando a relação da expressão da molécula CD51 com a sobrevivência nos três grupos de linfoma difuso de grandes células B (ND: nodal, MO: metastático, LOP)

4.3.2- Moléculas de apoptose e reguladoras do ciclo celular

- **Bax:** oitenta e seis por cento (38/44) dos casos de LOP foram avaliados. Trinta e dois por cento dos casos (18/38) foram positivos e 68% (26/36) foram negativos. No grupo nodal, 43% (20/46) positivos e 56% (26/46) foram negativos. No grupo metastático, 87% (14/16) positivos e 12% (2/16) foram negativos, ($P=0,0017$) (Figura 16).

Na análise da sobrevivência, ocorreu significância estatística entre o grupo LOP negativo e os grupos LOP positivo ($P=0,0288$), metastático positivo ($P=0,0003$) e nodal negativo ($P=0,0193$). Entre o grupo metastático positivo e o grupo

nodal negativo ($P= 0, 0468$) e nodal positivo ($P= 0, 0368$). O grupo LOP negativo demonstrou melhor sobrevida enquanto que o grupo metastático positivo a pior sobrevida (Figura 17).

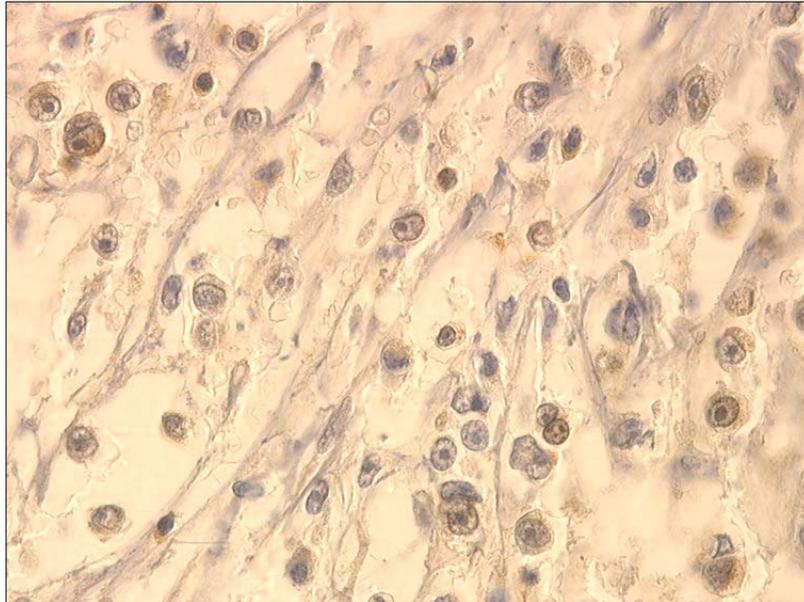


Figura 15- Imunoexpressão da proteína Bax no citoplasma das células de linfoma ósseo primário (100X)

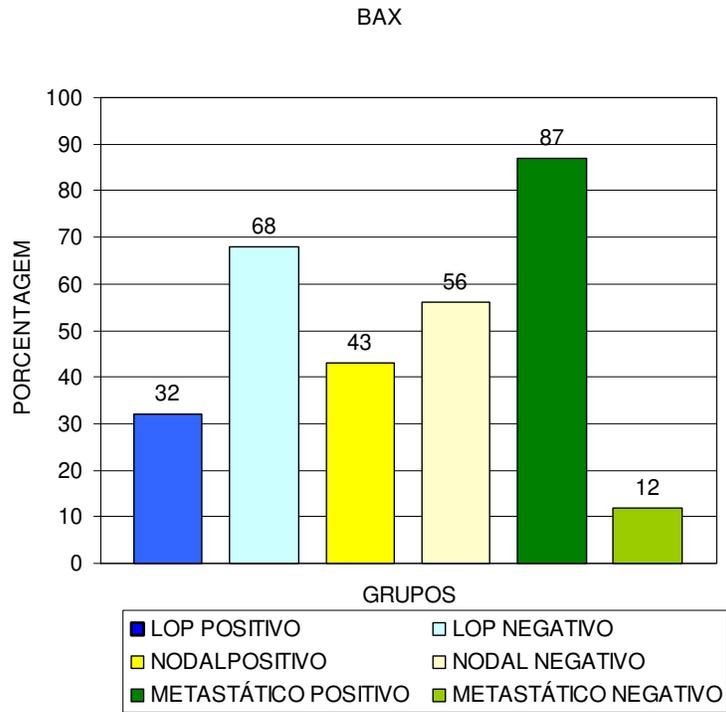


Figura 16- Percentual da expressão da proteína Bax nos grupos de linfoma difuso de grandes células B

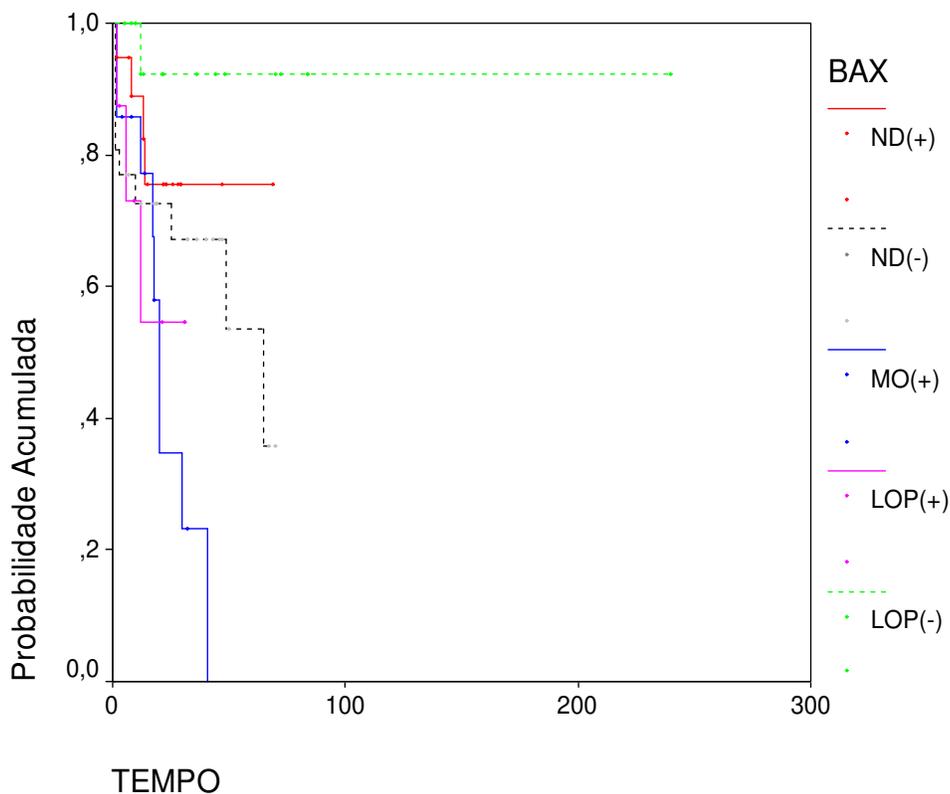


Figura 17- Curva de sobrevivência, demonstrando a relação da expressão da molécula BAX com a sobrevivência nos três grupos de linfoma difuso de grandes células B (ND: nodal, MO: metastático, LOP)

- p21 (WAF-1):** noventa e sete por cento (43/44) dos casos de LOP foram avaliados. Trinta por cento (13/43) foram positivos e 70% (30/43) foram negativos. No grupo nodal, 22% (10/46) positivos e 78% (36/46) foram negativos. No grupo metastático, 31% (5/16) positivos e 69% (11/16) foram negativos (Figura 19). Na análise da sobrevivência, ocorreu significância estatística entre o grupo LOP negativo e os grupos LOP positivo ($P= 0,0372$), metastático negativo ($P= 0,0010$) e metastático positivo ($P= 0,0145$), entre o grupo metastático negativo e nodal positivo ($P= 0,0121$). O grupo com melhor sobrevivência foi LOP negativo e o com pior foi metastático negativo (Figura 20).

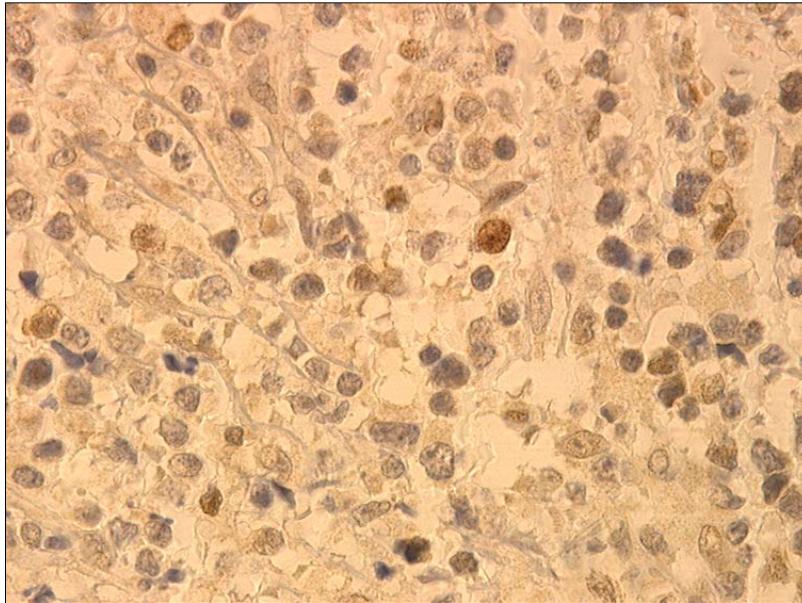


Figura 18- Imunoexpressão com padrão nuclear da proteína p21 nas células do linfoma ósseo primário (100X)

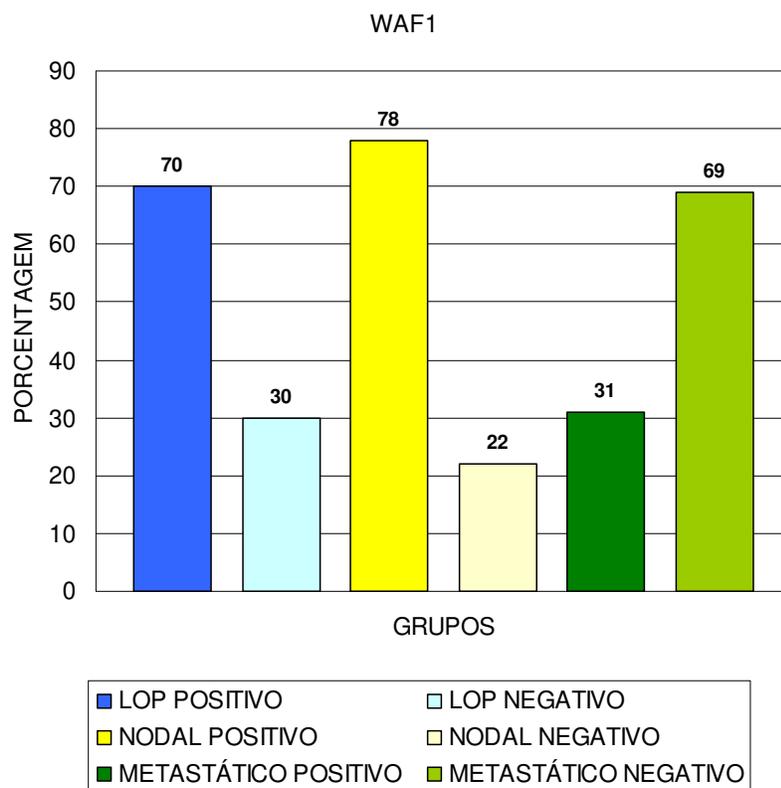


Figura 19- Percentual da expressão do p21 (WAF1) nos grupos de linfoma difuso de grandes células B

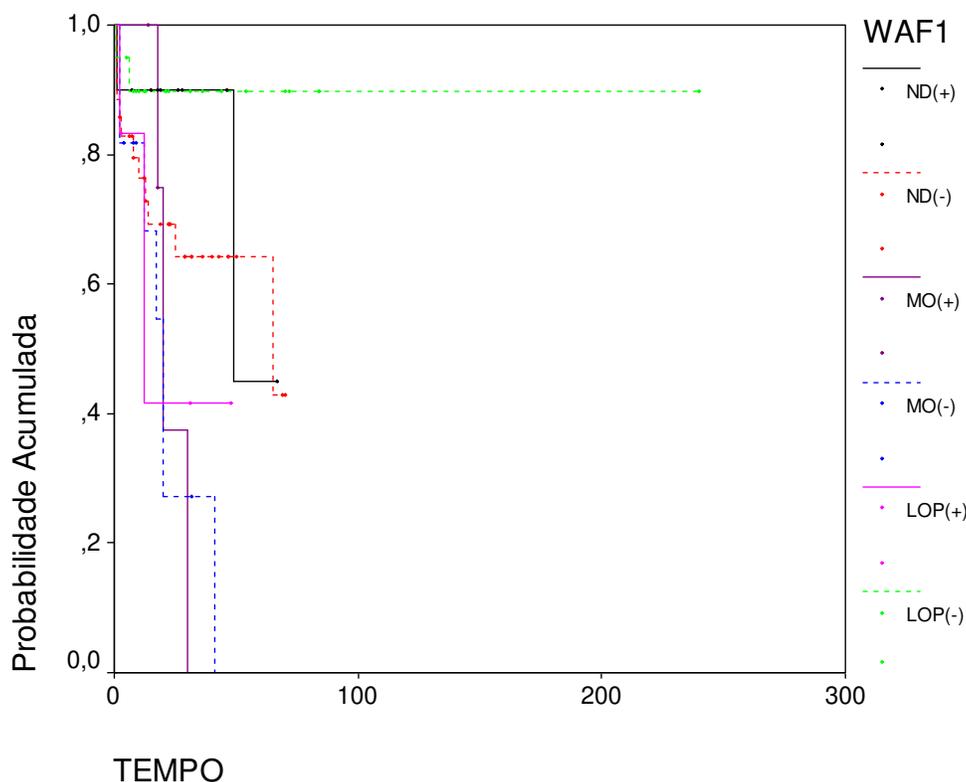


Figura 20- Curva de sobrevivência, demonstrando a relação da expressão da molécula p21 com a sobrevivência nos três grupos de linfoma difuso de grandes células B (ND: nodal, MO: metastático, LOP)

- **Bcl-6:** setenta e um por cento (54/76) dos casos de LOP foram avaliados. Sessenta e sete por cento (36/54) foram positivos e 33% (18/54) negativos. No grupo nodal, 95% (44/46) dos casos foram avaliados. Oitenta e sete por cento (38/44) foram positivos e 14 (6/44) negativos (Figura 22). O grupo metastático não foi analisado. Na análise da sobrevivência não ocorreu significância entre os grupos. A melhor sobrevivência ocorreu no grupo LOP negativo e a pior no grupo nodal negativo (Figura 23).

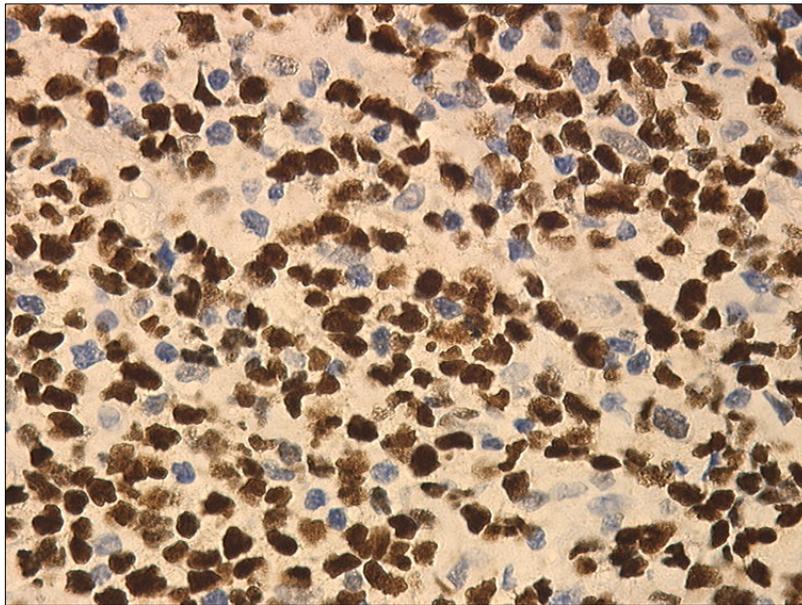


Figura 21- Imunoexpressão de padrão nuclear da proteína Bcl-6 nas células do linfoma ósseo primário (100X)

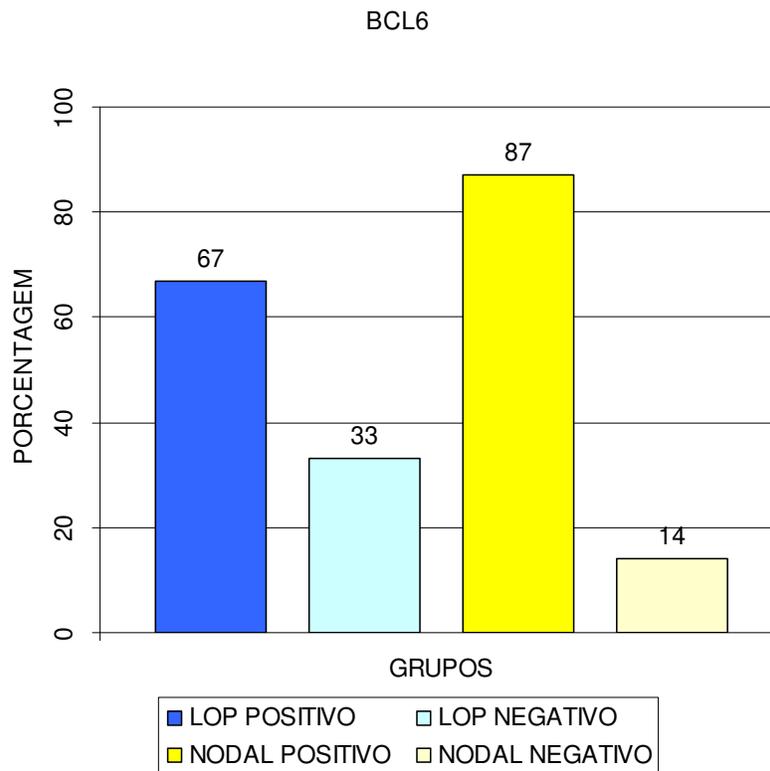


Figura 22- Percentual da expressão do Bcl-6 nos grupos de linfoma difuso de grandes células B

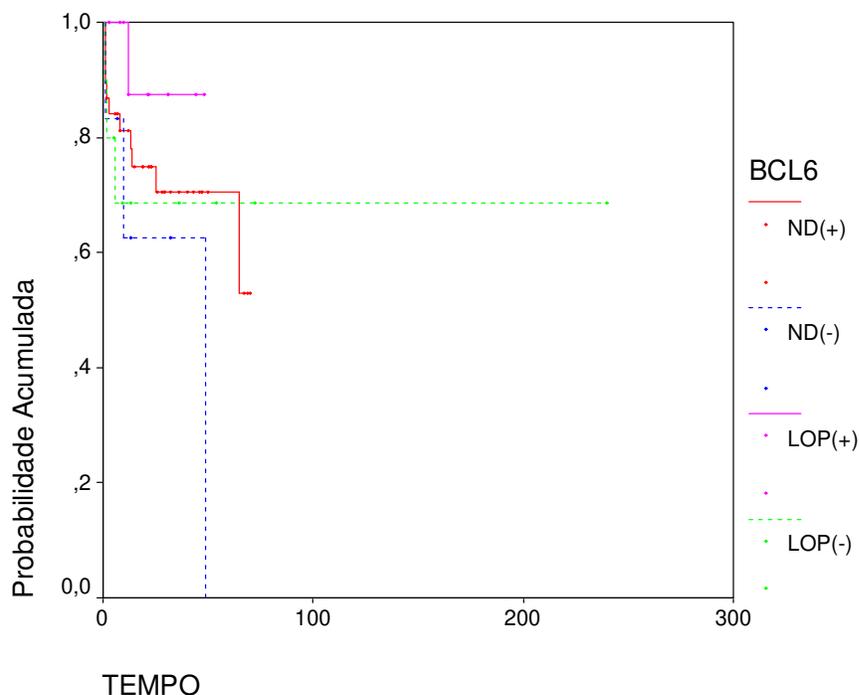


Figura 23- Curva de sobrevivida, demonstrando a relação da expressão da molécula Bcl-6 com a sobrevivida nos três grupos de linfoma difuso de grandes células B (ND: nodal, MO: metastático, LOP)

- **Bcl-2:** oitenta e três por cento (63/76) dos casos de LOP foram avaliados. Setenta e nove por cento (49/63) foram positivos e 22% (14/63) negativos. No grupo nodal, 98% (45/46) foram avaliados. Noventa e um por cento (41/45) foram positivos e 9% (4/45) negativos (Figura 25). O grupo metastático não foi analisado. Na análise da sobrevivida não ocorreu significância estatística entre os grupos analisados e expressão do Bcl-2. A melhor sobrevivida ocorreu no grupo nodal negativo e a pior nos grupos nodal e LOP positivos (Figura 26).

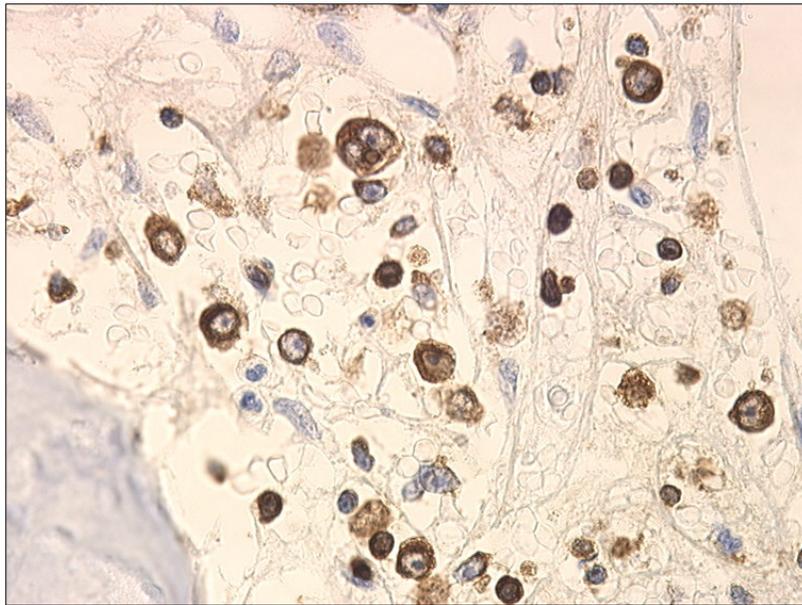


Figura 24- Imunoexpressão de padrão citoplasmático da proteína Bcl-2 nas células do linfoma ósseo primário (100X)

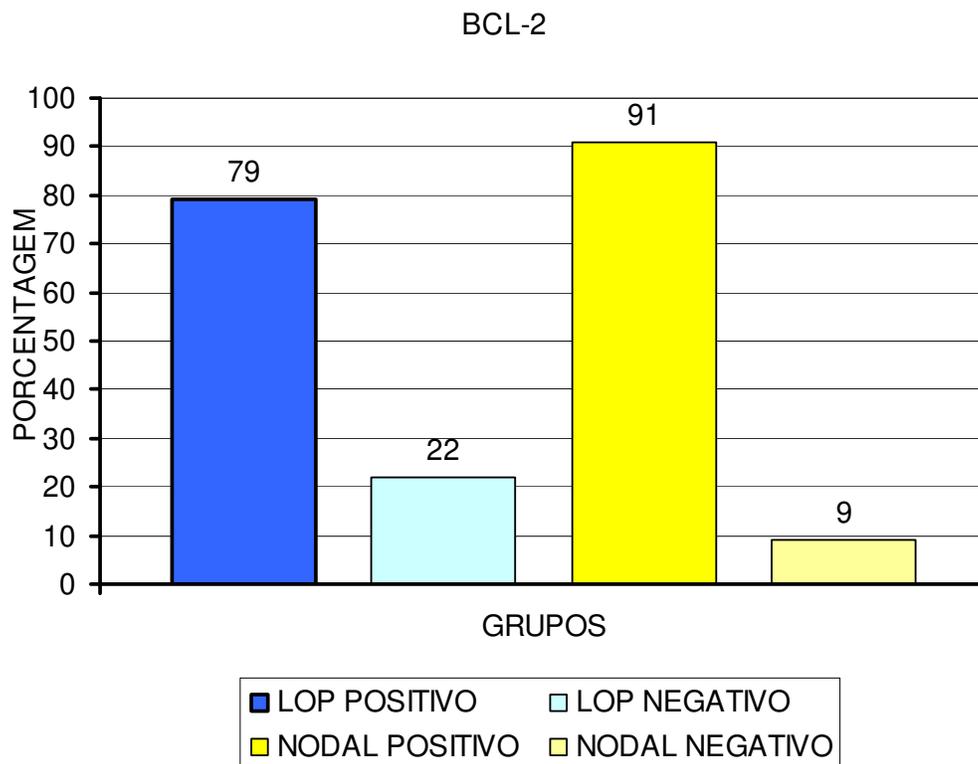


Figura 25- Percentual da expressão do Bcl-2 nos grupos de linfoma difuso de grandes células B

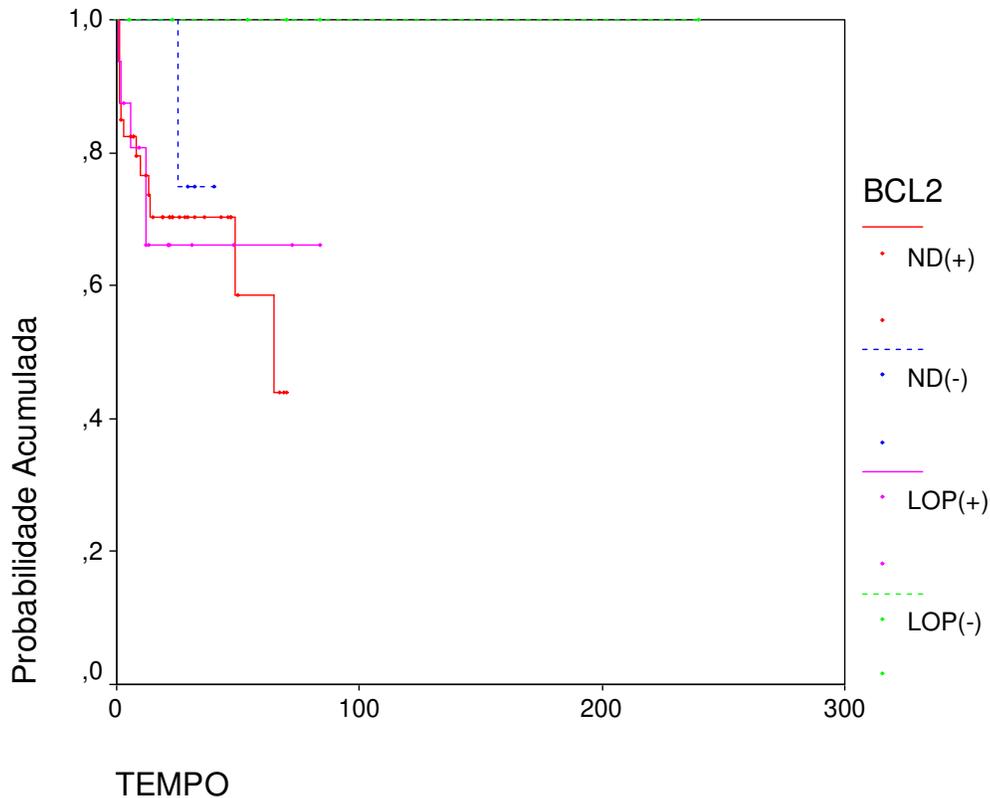


Figura 26- Curva de sobrevivência, demonstrando a relação da expressão da molécula Bcl-2 com a sobrevivência nos três grupos de linfoma difuso de grandes células B (ND: nodal, MO: metastático, LOP)

- **P53:** noventa e três por cento (42/44) dos casos de LOP foram avaliados. Noventa por cento (38/42) foram positivos e 10% (4/42) negativos. No grupo nodal, 4% (2/46) foram negativos e 96% (44/46) positivos. No grupo metastático, 31% (5/16) foram negativos e 69% (11/16) positivos ($P= 0, 0246$) (figura 28). Na análise da sobrevivência ocorreu significância estatística entre os grupos LOP e metastático positivos ($P= 0, 0077$) e entre os grupos metastáticos e nodais positivos ($P= 0, 0101$) a expressão do P53. A melhor sobrevivência ocorreu no grupo LOP positivo e a pior no grupo metastático positivo (Figura 29).

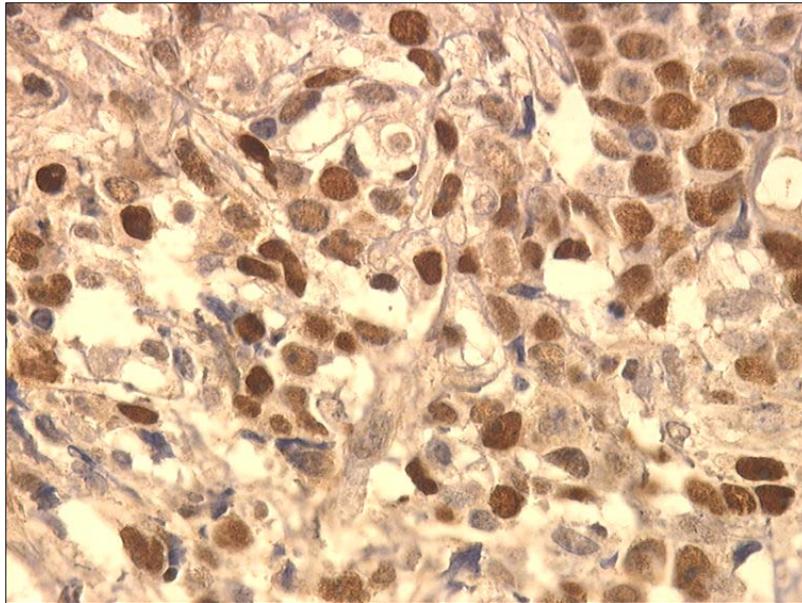


Figura 27- Imunoexpressão de padrão nuclear da proteína p53 nas células do linfoma ósseo primário (100X)

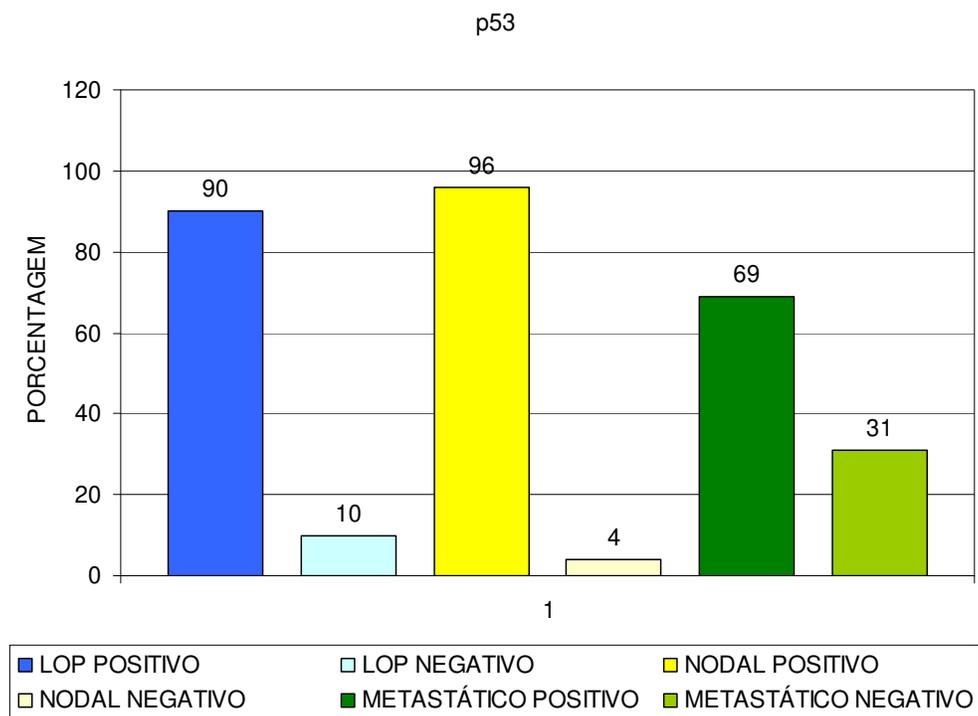


Figura 28- Percentual da expressão do p53 nos grupos de linfoma difuso de grandes células B

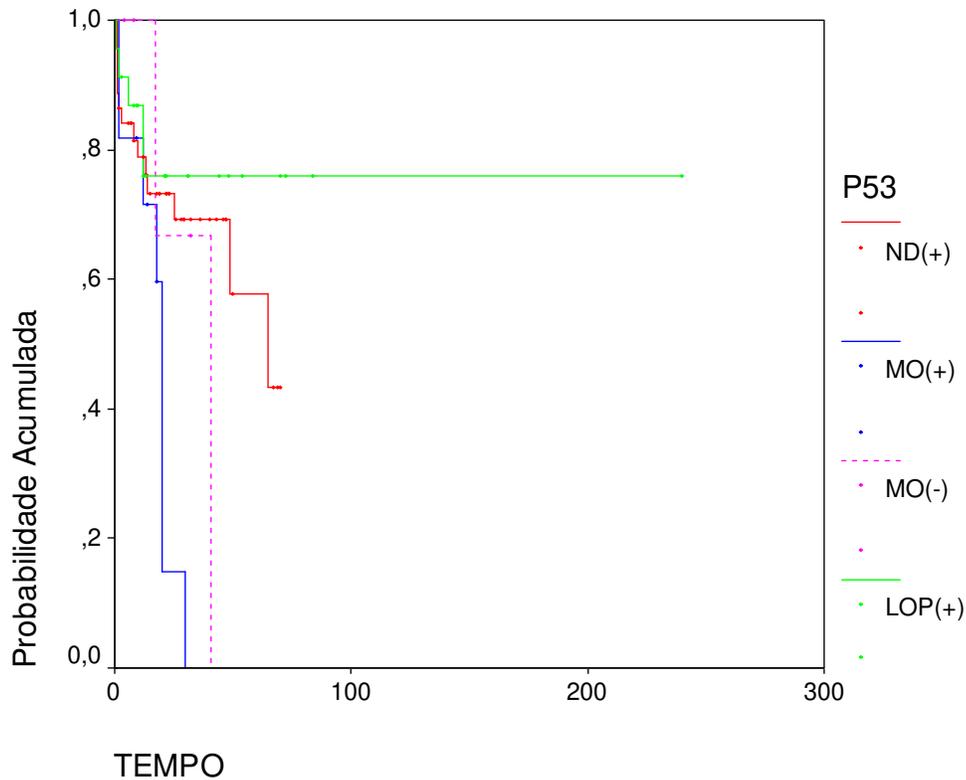


Figura 29- Curva de sobrevivência, demonstrando a relação da expressão da molécula p53 com a sobrevivência nos três grupos de linfoma difuso de grandes células B (ND: nodal, MO: metastático, LOP)

- **RB 358 (pRB):** setenta e três por cento (32/44) dos casos de LOP foram positivos e 27% (12/44) negativos. No grupo nodal, 98% (45/46) positivos e 2% (1/46) negativos. No grupo metastático, 69% (11/16) foram positivos e 31% (5/16) negativos, ($P= 0,0001$) (Figura 31). Na análise da sobrevivência ocorreu significância estatística entre os grupos LOP e metastático positivos ($P= 0,0023$), entre os grupos metastático e nodal positivos ($P=0,0118$) e a expressão do RB358. A melhor sobrevivência ocorreu no grupo LOP positivo e a pior no grupo metastático positivo (Figura 32).

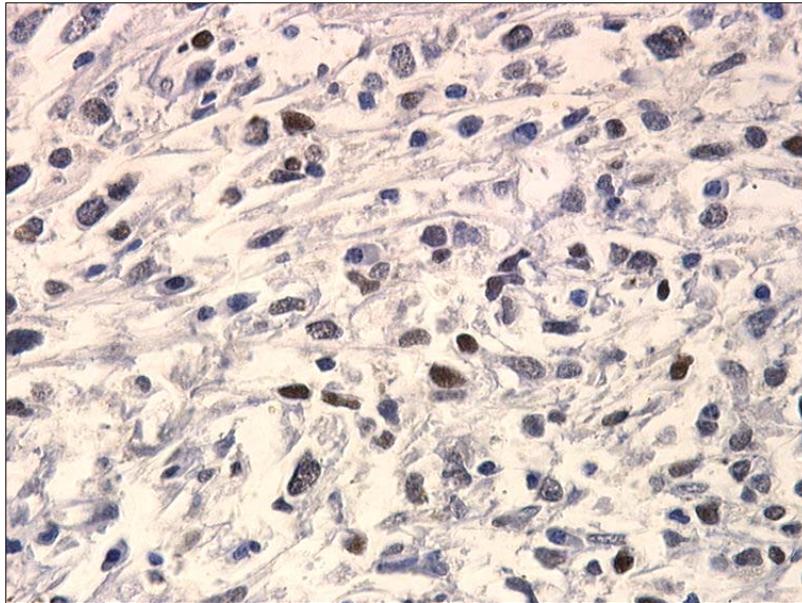


Figura 30- Imunoexpressão de padrão nuclear da proteína pRB nas células do linfoma ósseo primário (40X)

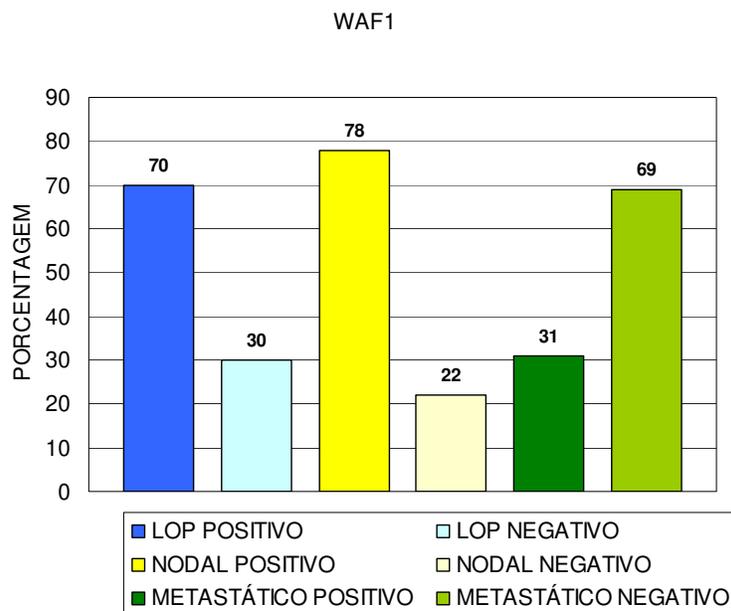


Figura 31- Percentual de expressão do WAF-1 (pRB) nos grupos de linfoma difuso de grandes células B

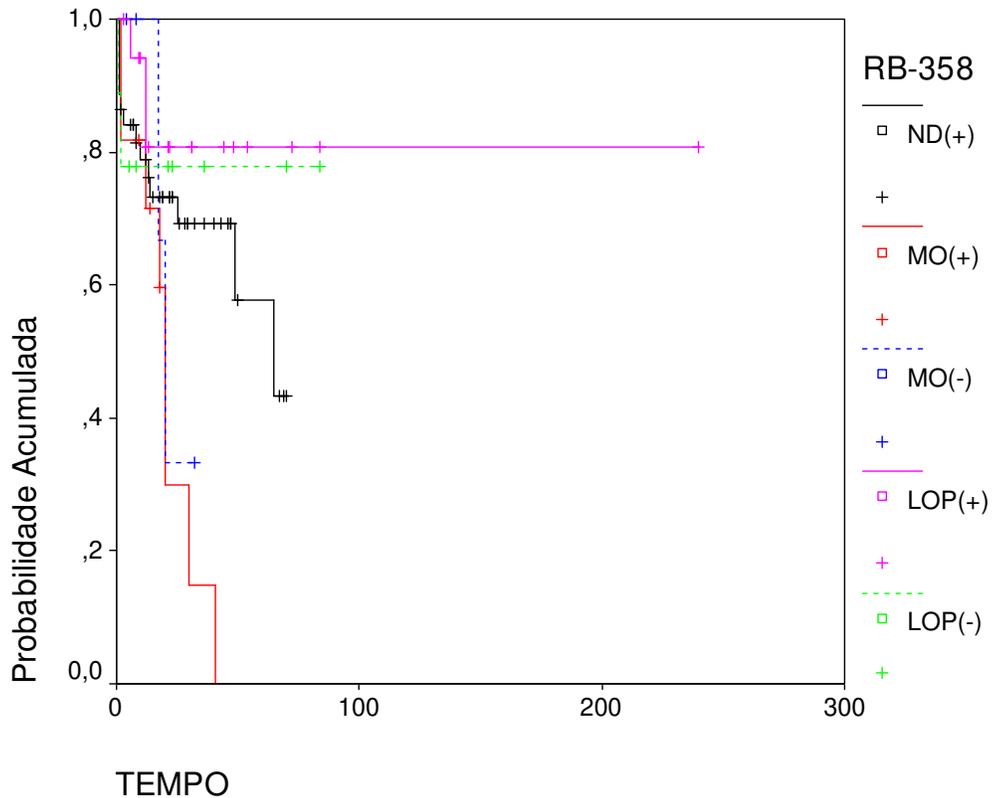


Figura 32- Curva de sobrevida, demonstrando a relação da expressão da molécula pRB com a sobrevida nos três grupos de linfoma difuso de grandes células B (ND: nodal, MO: metastático, LOP)

- **Relação p53/p21:** expressaram simultaneamente p53 e p21, 28% (6/21) dos casos de LOP, 48% (10/21) do grupo nodal e 24% (5/21) no grupo metastático. Na análise da sobrevida não ocorreu significância estatística entre os grupos. A melhor sobrevida ocorreu no grupo nodal e a pior no grupo metastático. Não ocorreram casos positivos para p53 e negativos para p21.

Tabela 1- Percentual de casos que expressaram moléculas de adesão, apoptose e regulação do ciclo celular nos três grupos linfoma difuso de grandes células B

Marcador	LOP	NODAL	MT	P
Adesão				
CD29	6%	0	25%	0,0024
CD62L	0	0	0	NA
CD44	56%	67%	81%	NS
CD51	0	2%	44%	0,001
Apoptose				
Bax	32%	43%	87%	0,0017
p21	30	22%	31%	NS
Bcl-6	67%	87%	NA	NS
Bcl-2	79%	91%	NA	NS
P53	90%	96%	69%	0,0246
pRB	73%	98%	69%	0,0001

NS: não significativa, NA: não avaliável; LOP: linfoma ósseo primário, NODAL: linfoma nodal; MT: metastático.

4.3.3- Classificação molecular nos subgrupos CG e pós-CG

Baseado na leitura do TMA, no grupo LOP, 66% (45/68) foram classificados como CG e 34% (23/68) pós-CG. No grupo nodal, 31% (14/45) foram CG e 69% (31/45) pós-CG. Nove amostras não foram classificadas em virtude da expressão do anticorpo ser não avaliável (Figura 33).

Observou-se no grupo LOP CG, 4% (2/45) expressaram CD10 isolado, 7% (3/45) expressaram BCL-6 isoladamente; 9% (4/45) expressaram simultaneamente CD10 / BCL-6, 9% (4/45) expressaram simultaneamente CD10 / MUM1 e 38% (17/45) expressaram simultaneamente CD10 / BCL6 / MUM1. A expressão do Bcl-6 não foi avaliável em 2% (1/45), MUM-1 em 15,5 (7/45) e MUM-1 / Bcl-6 em 15,5% (7/45) das amostras.

No grupo LOP pós-CG, 39% (9/23) expressaram simultaneamente MUM1 / Bcl-6; 30% (7/23) com expressão isolada de MUM1 e 26% (6/23) com expressão negativa para todos os antígenos. Em 4% (1/23) dos casos a expressão do Bcl-6 foi não avaliável.

No grupo nodal CG, constatou-se que 50% (7/14) expressaram simultaneamente CD10 / Bcl-6 / MUM-1, 14% (2/14) expressaram simultaneamente CD10 / Bcl-6, 7% (1/14) expressaram simultaneamente MUM-1 / CD10 e 21% (3/14) expressaram Bcl-6 isolado. Em 7% (1/14) dos casos, a expressão do Bcl-6 não foi avaliável. Não ocorreu expressão de CD10 isolado.

No grupo nodal pós-CG, 84% (26/31) expressaram simultaneamente MUM-1 / Bcl-6 e 16% (5/31) expressaram MUM-1 isolado. Não ocorreram casos com expressão negativa para todos os anticorpos nem casos incompletos. Na análise da sobrevida não ocorreu significância estatística entre os grupos em relação à classificação CG e pós-CG. A melhor sobrevida ocorreu no grupo LOP pós-CG e a pior no grupo nodal pós-CG (Figura 34).

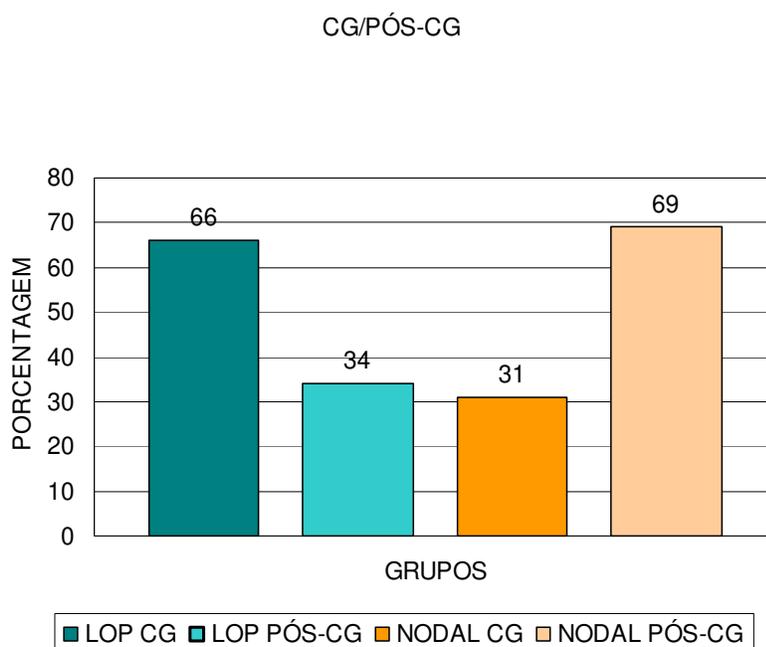


Figura 33- Percentual dos subgrupos centro germinativo e pós-centro germinativo nos linfomas ósseos primários e nodais

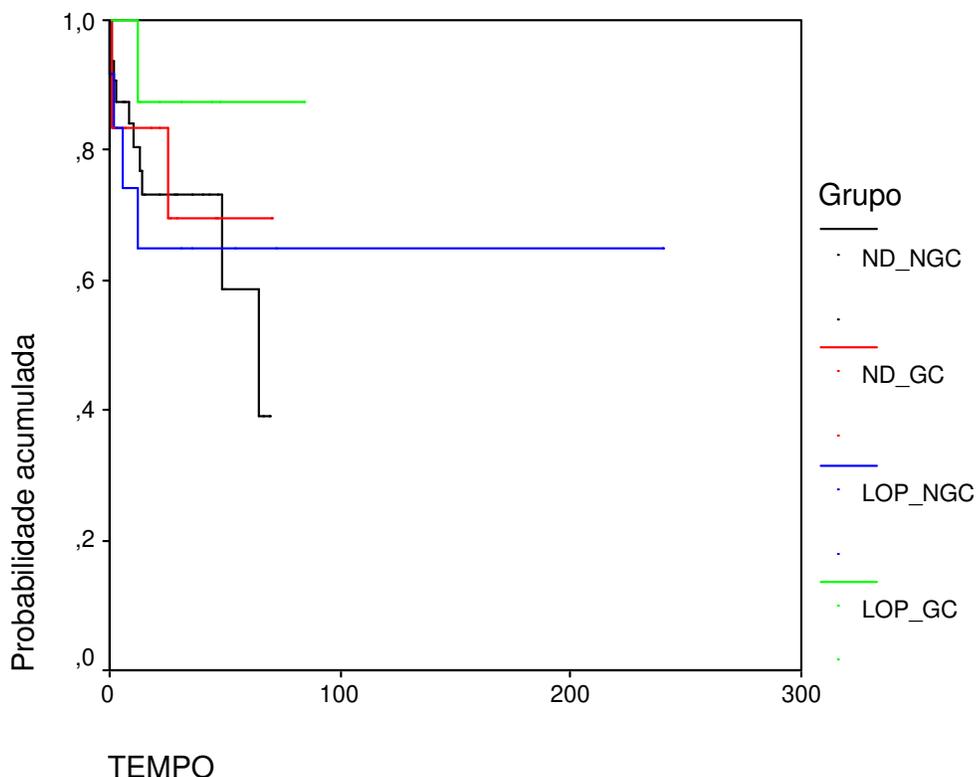


Figura 34- Curva de sobrevivência, demonstrando a relação dos grupos centro germinativo / pós-centro germinativo com a sobrevivência nos três grupos de linfoma difuso de grandes células B (ND: nodal, MO: metastático, LOP)

- **Expressão dos anticorpos por grupo**

a) Bcl-6: os resultados da expressão dessa molécula já foram descritos anteriormente em moléculas de apoptose e sua análise foi restrita aos grupos LOP e nodal.

b) MUM-1: trinta e dois por cento (19/59) dos casos de LOP foram negativos e 68% (40/59) positivos. No grupo nodal, 13% (6/46) foram negativos e 89% (40/46) positivos. No grupo metastático, 56% (9/16) foram negativos e 44% (7/16) positivos, ($P= 0, 0075$).

c) CD10: quarenta e seis por cento (32/69) dos casos de LOP foram negativos e 54% (37/69) positivos. No grupo nodal, 76% (35/46) foram negativos e 24% (11/46) positivos. No grupo metastático, 94% (15/16) foram negativos e 6% (1/16) positivos, ($P= 0, 0023$).

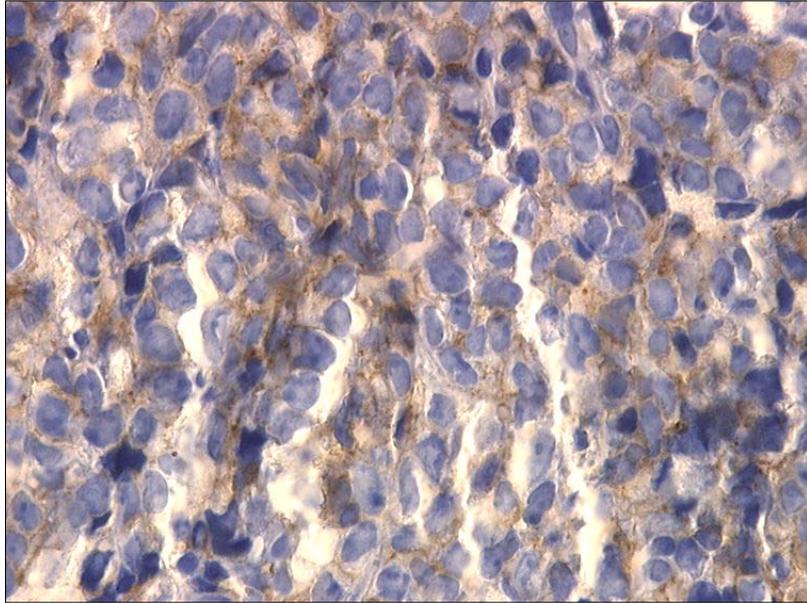


Figura 35- Linfoma ósseo primário, subgrupo centro germinativo, demonstrando imunoexpressão na membrana citoplasmática do CD10 das células linfomatosas (100X)

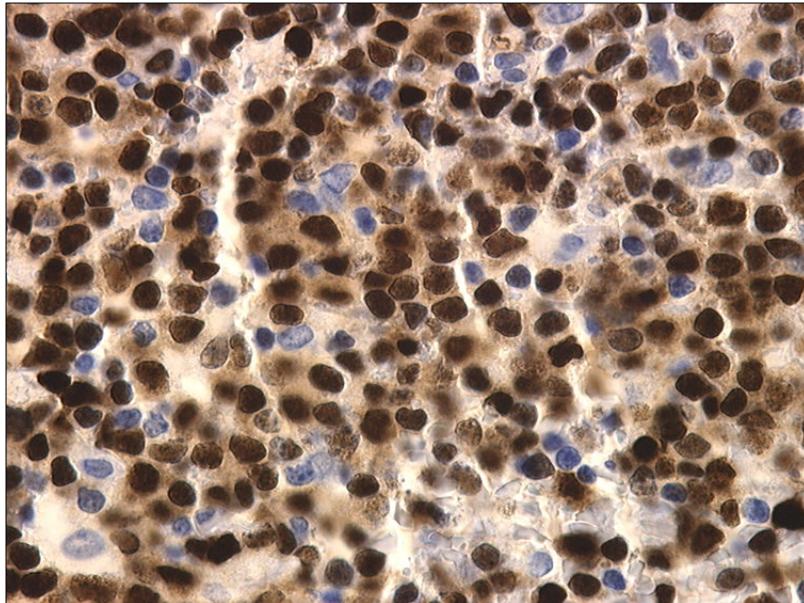


Figura 36- Linfoma ósseo primário do subgrupo pós-centro germinativo demonstrando imunoexpressão de padrão nuclear do MUM1 (100X)

4.3.4- Índice de proliferação celular

- **KI 67:** oitenta e três por cento (63/76) dos casos de LOP foram avaliados. 56% (35/63) dos casos de LOP demonstraram índice mitótico menor que 50% e 44% (28/63) demonstraram índice mitótico igual ou acima de 50%. No grupo nodal, 41% (19/46) dos casos demonstraram índice mitótico menor que 50% e 59% (27/46) demonstraram índice mitótico igual ou acima de 50%. No grupo metastático, 29% (2/7) dos casos demonstraram índice mitótico menor que 50% e 71% (4/7) demonstraram índice mitótico igual ou acima de 50%.

4.3.5- Imunofenotipagem

- **CD20:** noventa e três por cento (71/76) dos casos de LOP foram avaliados. Noventa e nove por cento dos casos (70/71) foram positivos e 1% (1/71) foram negativos. No grupo nodal, todos os 46 casos foram positivos. No grupo metastático, 6% (1/16) foram negativos e 94% (15/16) positivos (Figura 38).

- **CD30:** sessenta e seis por cento (29/44) dos casos de LOP foram avaliados 62% (18/29) dos casos de LOP foram negativos e 38% (11/29) positivos. No grupo nodal, 65% (30/40) foram negativos e 35% (10/40) positivos. No grupo metastático, 88% (14/16) foram negativos e 12% (2/16) positivos.

- **PAX5:** noventa e três por cento dos casos de LOP foram avaliados. Oitenta e três por cento (35/42) foram positivos e 17% (7/42) foram negativos. No grupo nodal, 86% (40/46) positivos e 14% (6/46) foram negativos. O grupo metastático não foi analisado.

- **BOB1:** noventa e três por cento (71/76) dos casos de LOP foram avaliados. Noventa e seis (67/71) foram positivos e 4% (3/71) foram negativos. No grupo nodal, todos os 46 casos foram positivos (Figura 37). O grupo metastático não foi analisado.

- **Kappa**: noventa e sete por cento (43/44) dos casos de LOP foram avaliados. Sete por cento (3/43) foram positivos e 93% (40/43) foram negativos. No grupo nodal, 80% (37/46) foram negativos e 20% (9/46) positivos. No grupo metastático, 69% (11/16) foram negativos e 31% (5/16) positivos.

- **Lambda**: oitenta e dois por cento (36/44) dos casos de LOP foram negativos e 18% (8/44) positivos. No grupo nodal, 93% (43/46) foram negativos e 7% (3/46) positivos. No grupo metastático, 75% (12/16) foram negativos e 25% (4/16) positivos.

- **SP4**: setenta e oito por cento (59/76) dos casos de LOP foram avaliados. Cinco por cento (3/59) foram positivos e 95% (56/59) foram negativos. No grupo nodal, 87% (39/45) foram negativos e 13% (6/45) positivos. O grupo metastático não foi analisado.

- **CD99**: setenta por cento (31/44) dos casos de LOP foram avaliados. Dez por cento (3/31) foram positivos e 90% (28/31) foram negativos. No grupo nodal, 87% (39/45) foram negativos e 13% (6/46) positivos. No grupo metastático, 56% (9/16) foram negativos e 44% (7/16) positivos.

- **P63**: noventa e sete por cento (43/44) dos casos de LOP foram avaliados. Doze por cento (5/43) positivos e 88% (38/43) foram negativos. No grupo nodal, 91% (42/46) foram negativos e 9% (4/46) positivos, (P= 0, 0382). No grupo metastático, 69% (11//16) foram negativos e 31% (5/16) positivos.

- **CD138**: todos os casos de LOP e de nodal foram negativos.

- **CD38**: oitenta e nove por cento (39/544) dos casos de LOP foram avaliados. Oito por cento (3/39) foram positivos e 92% (36/39) negativos e. No grupo nodal, 7% (3/46) foram positivos e 93% (43/46) negativos e. No grupo metastático, 50% (8/16) foram negativos e 50% (8/16) positivos.

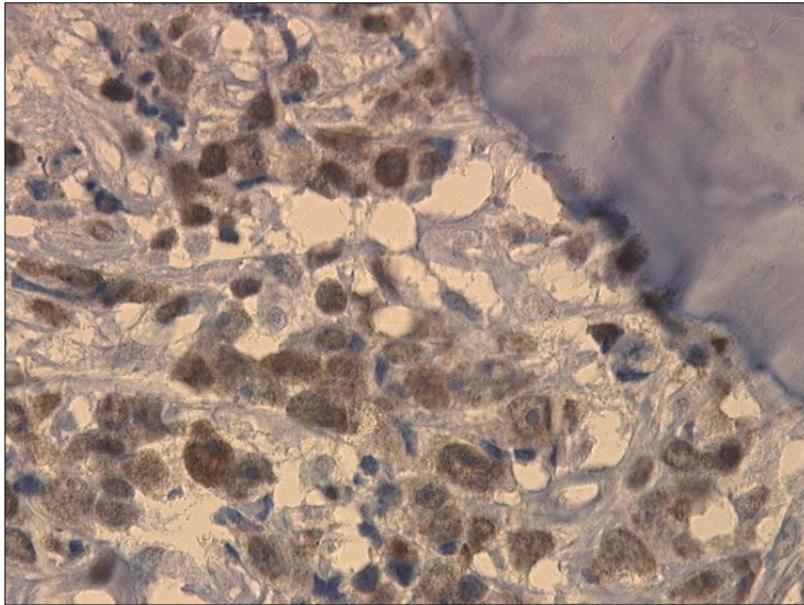


Figura 37- Imunoexpressão do padrão nuclear da proteína BOB1 em linfoma ósseo primário (100x)

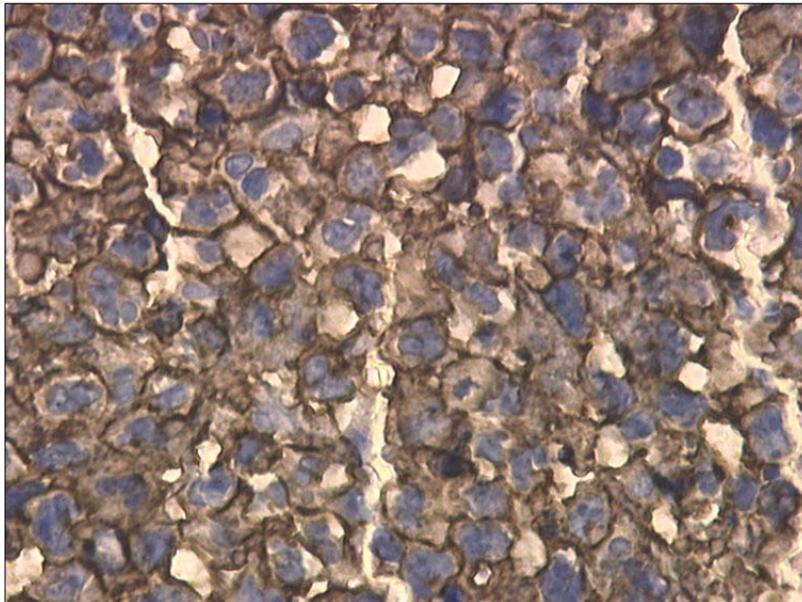


Figura 38- Imunoexpressão do padrão em membrana citoplasmática da molécula CD20 em linfoma ósseo primário (100x)

Tabela 2- Percentual da expressão dos marcadores de imunofenótipo nos três grupos de linfoma difuso de grandes células B

Marcadores	LOP	NODAL	META	P
CD20	99%	100%	71%	0,0024
PAX5	83%	86%	NA	NS
BOB1	96%	100%	NA	NS
CD30	38%	35%	12%	NS
CD99	10%	13%	44%	0,0083
KAPPA	7%	20%	31%	NS
LAMBDA	18%	7%	25%	NS
SP4	5%	13%	NA	0,0258
CD38	8%	7%	50%	0,0001
CD138	0	0	NA	NA
P63	12%	9%	31%	0,0382

NS: não significativo, NA: não avaliável; LOP: Linfoma ósseo primário, NODAL: Linfoma nodal; META: metástase.

4.3.6- Subpopulações de células imunes infiltrantes

- **CD3:** quarenta e seis por cento dos casos de LOP demonstraram infiltração leve (5% de linfócitos T CD3+ infiltrantes) e 43% com infiltração moderada (10-30% de linfócitos T CD3+ infiltrantes). No grupo nodal, 39% dos casos demonstraram infiltração leve (5% de linfócitos T CD3+ infiltrantes) e 50% com infiltração moderada (10-30% de linfócitos T CD3+ infiltrantes).

- **CD4:** setenta e três por cento dos casos de LOP demonstraram infiltração leve (5% de linfócitos T CD4+ infiltrantes) e 19% com infiltração moderada (10-30% de linfócitos T CD4+ infiltrantes). No grupo nodal, 88% demonstraram infiltração leve (5% de linfócitos T CD4+ infiltrantes) e 9% com infiltração moderada (10-30% de linfócitos T CD4+ infiltrantes).

- **CD5:** setenta e seis por cento dos casos de LOP demonstraram infiltração leve (5% de linfócitos T CD5+ infiltrantes) e 19% com infiltração moderada (10-30% de linfócitos T CD5+ infiltrantes). No grupo nodal, 63% demonstraram infiltração leve (5% de linfócitos T CD5+ infiltrantes) e 37% com infiltração moderada (10-30% de linfócitos T CD5+ infiltrantes).

- **CD8:** setenta por cento dos casos de LOP demonstraram infiltração leve (5% de linfócitos T CD8+ infiltrantes) e 29% com infiltração moderada (10-30% de linfócitos T CD8+ infiltrantes). No grupo nodal, 56% demonstraram infiltração leve (5% de linfócitos T CD8+ infiltrantes) e 41% com infiltração moderada (10-30% de linfócitos T CD8+ infiltrantes).

- **CD57:** noventa e sete por cento dos casos de LOP demonstraram infiltração leve (5% de linfócitos T/NK CD57+ infiltrantes) e 3% com infiltração moderada (10-30% de linfócitos T/NK CD57+ infiltrantes). No grupo nodal, 98% demonstraram infiltração leve (5% de linfócitos T/NK CD57+ infiltrantes) 2% com infiltração moderada (10-30% de linfócitos T/NK CD57+ infiltrantes).

- **CD68:** trinta e nove por cento dos casos de LOP demonstraram infiltração leve (5% de macrófagos) e 50% com infiltração moderada (10-30% de macrófagos). No grupo nodal, 53% demonstraram infiltração leve (5% de macrófagos) e 47% com infiltração moderada (10-30% de macrófagos).

- **FOXP 3:** noventa e sete por cento dos casos de LOP demonstraram infiltração leve (5% de linfócitos T reguladores FOXP 3+ infiltrantes) e 3% com infiltração moderada. No grupo nodal, 93% dos casos demonstraram infiltração leve (5% de linfócitos T reguladores FOXP 3+ infiltrantes) e 6% com infiltração moderada.

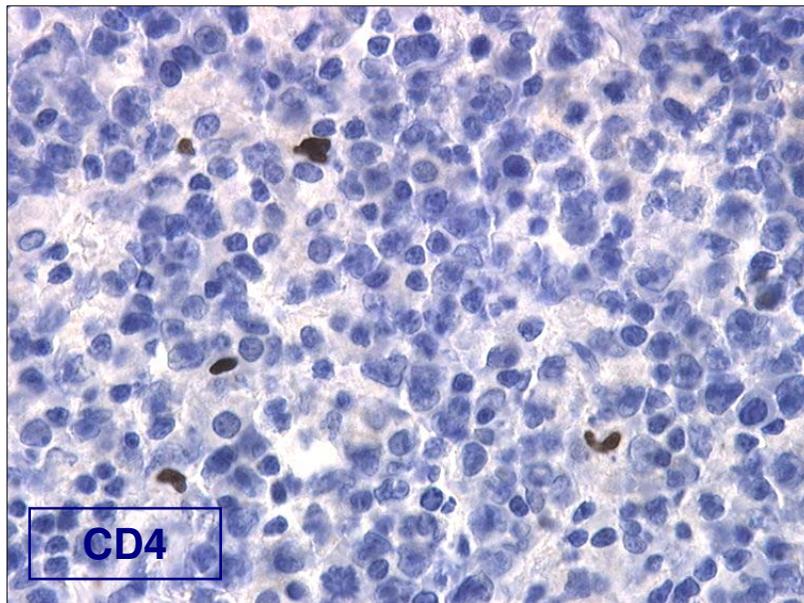
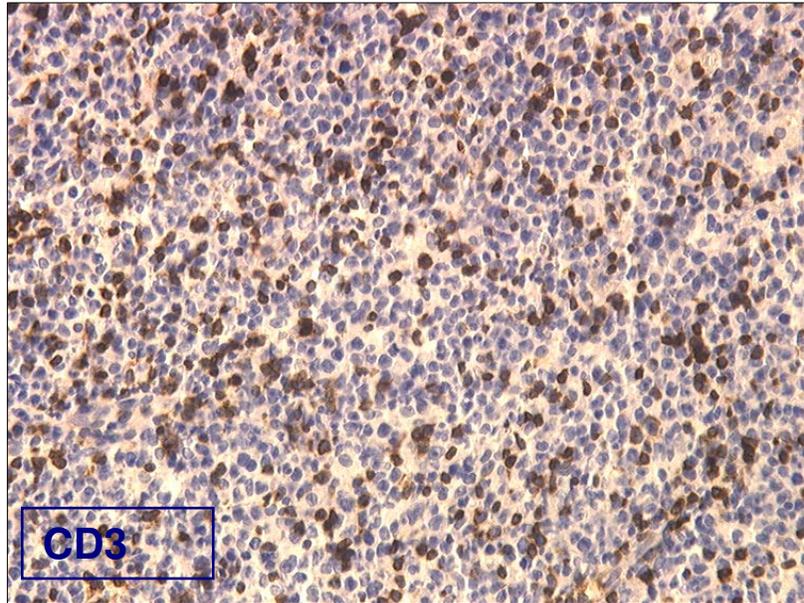


Figura 39- Linfócitos T infiltrantes, expressando as moléculas CD3 (20X) e CD4 (100X) em amostras de linfoma ósseo primário

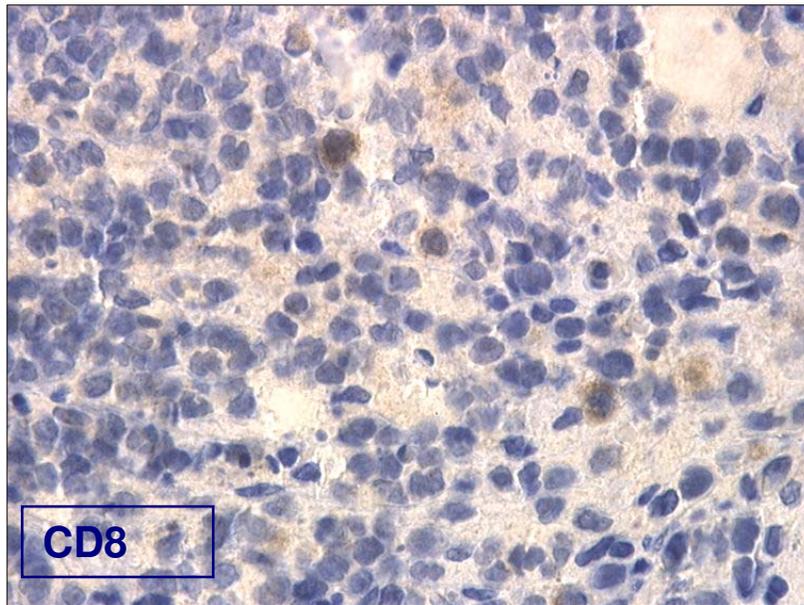
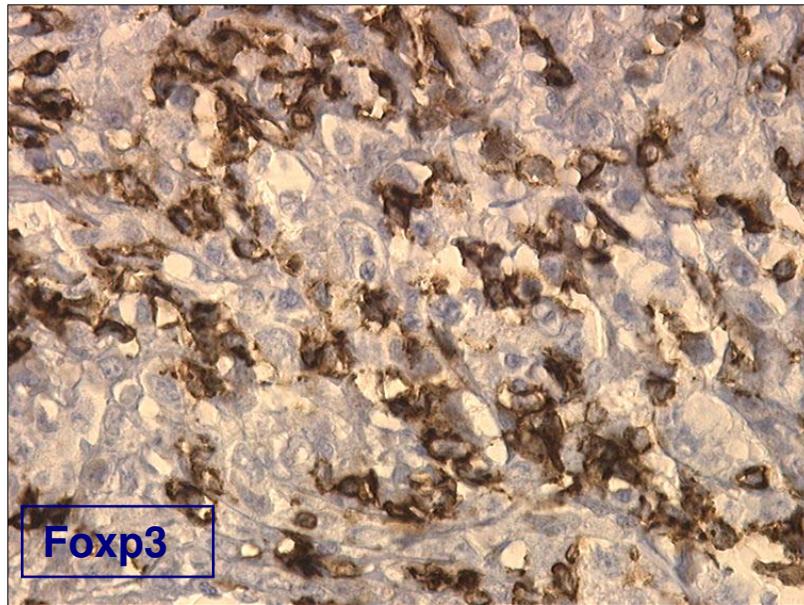


Figura 40- Linfócitos T infiltrantes expressando, as moléculas Foxp3 e CD8 (100X) em amostras de linfoma ósseo primário

Tabela 3- Porcentagem de células imunes infiltrantes nos dois grupos de linfoma difuso de grandes células B (nodal e ósseo primário)

GRUPO	0-5%	10-30%	40-80%
CD3 LOP	49%	43%	8%
CD3 NODAL	39%	50%	11%
CD4 LOP	77%	19%	4%
CD4 NODAL	88%	9%	3%
CD5 LOP	79%	19%	2%
CD5 NODAL	63%	37%	0%
CD8 LOP	71%	26%	3%
CD8 NODAL	57%	39%	4%
CD57 LOP	97%	3%	0%
CD57 NODAL	98%	2%	0%
CD68 LOP	39%	57%	4%
CD68 NODAL	53%	47%	0%
FOXP 3 LOP	97%	3%	0%
FOXP 3 NODAL	93%	7%	0%

LOP: Linfoma ósseo primário, NODAL: Linfoma nodal

4.4- Resultados da análise citogenética pelo FISH

De um total de 62 casos, 30 foram desconsiderados por serem não avaliáveis e 32 convalidados pelo estudo de FISH. Foi destacada a presença da $t(14;18)(q32;q21)$ em 28% (9/32) dos casos, o *MYC* sofreu rearranjo em 9% (3/32) dos casos e um caso exibiu rearranjo conjunto do *MYC* e *BCL2*. Não se observou distribuição peculiar das anormalidades genéticas entre os casos de LOP da França e do Brasil. A análise com as sondas *BLC6*, *ALK*, *CCND1/IGH* e *PAX5* não demonstrou rearranjos nesses genes.

Quadro 7- Características clínicas e resultados das técnicas de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e imunohistoquímica (IHQ) nos 32 casos de linfoma ósseo primário

CASO	SEXO	IDADE	SÍTIO OSSEO	FISH BCL2/IGH	FISH BCL-6	FISH MYC	FISH PAX5	FISH ALK	FISH CCND1/IGH	IHQ CD3	IHQ CD20
1				+	-	-	-	-	-	-	+
2	F	71	EA	UNS	UNS	-	UNS	-	-	-	+
3	F	49	OUT	-	UNS	-	UNS	UNS	-	-	+
4	M	65	EA	+	UNS	UNS	-	-	UNS	-	+
5	F	68	EA	+	-	UNS	-	-	-	-	+
6	F	62	EA	-	-	UNS	-	-	-	-	+
7	M	44	OUT	-	-	-	-	-	-	-	+
8	M	20	EA	+	-	+	-	-	-	-	+
9	F	59	OL	-	-	-	-	-	-	-	+
10	F	41	OL	+	-	+	-	-	-	-	+
11	M	41	OUT	+	-	-	-	-	-	-	+
12	F	56	OL	-	-	-	UNS	UNS	-	-	+
13	F	38	OL	-	-	UNS	-	-	-	-	+
14	M	34	OL	+	-	-	-	-	-	-	+
15	M	22	OL	+	-	-	-	-	-	-	+
16	F	22		-	UNS	-	-	UNS	-	-	+
17	F	36		-	-	-	-	-	-	-	+
18	M	27	OUT	UNS	-	UNS	UNS	-	-	-	+
19	F		OUT	-	UNS	-	-	UNS	-	-	+
20	M	40	ML	UNS	UNS	UNS	UNS	-	-	-	+
21	M	61	ML	-	UNS	UNS	-	UNS	-	-	+
22	M	47	ML	-	UNS	-	-	-	-	-	+
23	M	46	OL	-	UNS	UNS	UNS	UNS	-	-	+
24	M	65	OL	-	-	-	-	UNS	-	-	+
25	M	28	OL	-	-	UNS	-	-	-	-	+
26	M	57		UNS	UNS	-	UNS	UNS	-	-	+
27	M			-	-	UNS	-	UNS	-	-	+
28	F	72	OL	-	-	-	-	-	-	-	+
29	M	43	ML	+	-	-	-	-	-	-	+
30	F	61	OUT	-	UNS	+	-	-	UNS	-	+
31	F	50	OUT	-	-	-	-	-	-	-	+
32	F	46	OL	-	-	-	-	-	-	-	+

M: masculino, F: feminino, OL: ossos longos, OUT: outros sítios, ML:múltiplos sítios, EA: esqueleto axial, UNS: insatisfatório, IHQ: - = negativo, += positivo.

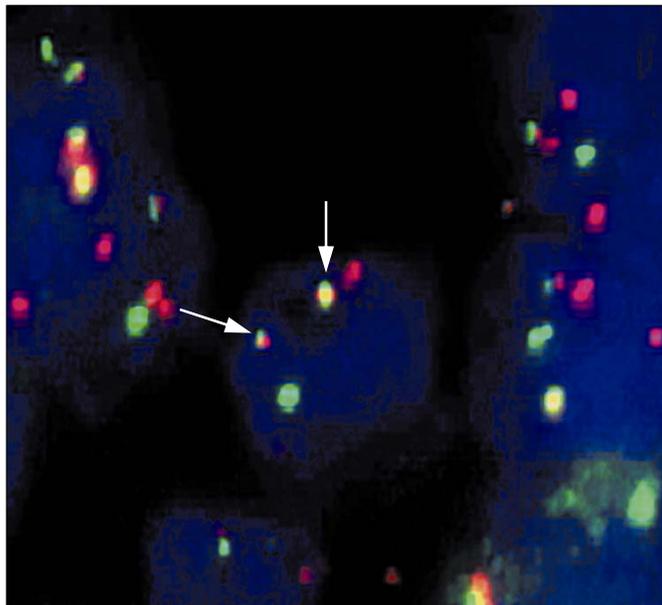


Figura 41- Análise do gene *Bcl2/IGH*, utilizando FISH de interfase em dois casos de linfomas ósseos primários. Destaque para o sinal da sonda *Bcl2/IGH dual-fusion*, demonstrando aspecto característico de fusão dos sinais verde e vermelho na t(14;18)(q32;q21) (setas brancas)



Figura 42- Análise do *MYC*, utilizando FISH de interfase em caso de linfoma ósseo primário. Destaque para o sinal vermelho e verde (*split*) da sonda *MYC break apart*, demonstrando t(8; 14) (setas brancas)

4.5- Principais resultados

- LOP é uma entidade patológica distinta dos demais linfomas nodais e extranodais.
- As características clínico-evolutivas e de estadiamento analisadas nos 44 casos de LOP sugerem prognóstico favorável, quando comparada a outras formas nodais e extranodais.
- O imunofenótipo B dos LOP demonstrou semelhanças com as formas nodais e ausência de diferenciação plasmocítica nos 44 casos analisados.
- O LOP apresentou, em mais da metade dos casos, padrão imunofenotípico característico de células B do centro germinativo. Este grupo parece estar associado à melhor evolução, quando comparado às outras formas de apresentação.
- A expressão da maioria das moléculas de adesão foi negativa nos casos de LOP.
- A expressão das moléculas de adesão provavelmente não possui relação prognóstica nos LOP.
- LOP expressou, freqüentemente, proteínas relacionadas com apoptose e regulação do ciclo celular semelhante ao observado nas formas nodais, com exceção do p53 e Bax que estavam acima do observado na literatura.
- Surpreendentemente, Bax relacionou-se com sobrevida inferior no LOP, enquanto o nodal demonstrou melhor evolução.
- Bcl-2 e Bcl-6 demonstraram provável associação à sobrevida inferior no LOP e nodal, porém outros estudos são necessários para melhor caracterizar esta associação.

- Não se demonstrou valor prognóstico da expressão p53+/p21+ nos três grupos de linfoma.
- A expressão do p53 nos LDGCB ósseos primários e nodais está mais relacionada com forma não mutante do *P53*.
- A expressão do p21 parece ser fator prognóstico desfavorável nos LDGCB ósseos primários e nodais.
- Provavelmente, os estádios avançados observados nos linfomas metastáticos modificaram negativamente as análises das curvas de sobrevida.
- A expressão da pRB está relacionada com melhor sobrevida no LDGCB ósseo primário, comparando-se com o nodal.
- Linfócitos T infiltrantes estão presentes no LDGCB ósseo primário e o padrão encontrado assemelha-se ao observado nas formas nodais. A quantidade e variedade de linfócitos T infiltrantes foram proporcionais nos dois grupos de linfomas.
- O LDGCB ósseo primário, após análise do FISH, revelou rearranjos genéticos do *BCL2* e *MYC* e, curiosamente, ausência de rearranjos do *BCL6*.
- Com a melhor caracterização, pode-se deduzir que o LOP é singular diante das formas extranodais e revela algumas semelhanças patogénicas com as formas nodais.

5- DISCUSSÃO

Neste trabalho, foram avaliados aspectos clínico-evolutivos, moleculares e imunofenotípicos em 76 casos de LDGCB ósseo primário em pacientes adultos com enfoque na expressão imunoistoquímica das principais moléculas relacionadas com prognóstico (adesão, apoptose e regulação do celular) e análise genética molecular das principais translocações envolvidas nos LNH. Foram avaliados os dados clínicos em 44 casos provenientes do Brasil. Observou-se discreta predominância no sexo masculino, semelhante a encontrada na maioria dos estudos de LOP, a idade média de 46 anos estava pouco acima das médias em outros trabalhos. O sítio mais acometido, em ossos longos, seguiu os resultados de outras séries, sendo o fêmur o osso mais lesado (Huebner-Chan et al., 2001, de Leval et al., 2003, Ramadan et al., 2007).

Neste trabalho, os estádios IE (56%) e IVE (29%) foram os mais freqüentes e caracterizam respectivamente sítio ósseo único e múltiplos sítios ósseos. Trabalhos publicados por De Leval et al. (2003) e por Kitsoulis et al. (2006) diferiram um pouco dos nossos resultados, neles os estádios IE e IIE foram os mais constantes (de Leval et al., 2003, Kitsoulis et al., 2006). Horsman et al. (2006), descreveram que mais de 25% dos casos LOP encontravam-se no estágio IVE e demonstraram maior taxa de recorrência local (Horsman et al., 2006). Foi proposta por esse autor a tendência do LOP em se desenvolver e crescer no interior do tecido ósseo e acometer com menor freqüência os linfonodos (Gianelli et al., 2002, Horsman et al., 2006, Kitsoulis et al., 2006). Ramadan et al. (2007) observaram que os estádios IV e IIE exibiram evolução semelhante, diferentemente das formas nodais (Ramadan et al., 2007). Vários estudos clínicos comprovaram a boa sobrevida dos pacientes nos estádios IE, IIE e IVE, mas muitos fatores clínicos prognósticos continuam sendo pouco compreendidos e os resultados são controversos (Gianelli et al., 2002, Horsman et al., 2006, Kitsoulis et al., 2006). Nossos resultados demonstraram que, após análise entre os estádios agrupados I+II com o estágio IV, observou-se melhor sobrevida no grupo I+II com significância estatística. Este grupo apresentou menor número de óbitos e melhor tempo médio de vida, comprovando

melhor evolução nos estádios iniciais, de acordo com a literatura mundial (de Camargo et al., 2002, Kitsoulis et al., 2006).

O seguimento dos 44 pacientes variou de 240 meses a cinco meses com média de 42 meses. Outros estudos demonstraram melhor média de sobrevida, variando de 80 a 51 meses enquanto em outros a média foi semelhante a nossa (Gianelli et al., 2002, de Leval et al., 2003, Horsman et al., 2006, Kitsoulis et al., 2006). A maioria dos pacientes permaneceu viva até o final do seguimento (81%) e o índice de recidiva tumoral foi baixo (18%). Nossos resultados foram semelhantes aos observados em outros trabalhos que confirmaram a evolução satisfatória dos pacientes portadores da doença (Gianelli et al., 2002, Beal et al., 2006, Horsman et al., 2006, Kitsoulis et al., 2006). O tempo médio de sobrevida dos casos de LOP com recidiva foi de 26 meses e, em apenas 25% ocorreu óbito, padrão considerado bom e esperado nos linfomas ósseos primários.

Outro trabalho recente, analisando a sobrevida e fatores prognósticos no LOP, observou que a progressão ou recorrência da doença, especialmente em pacientes acima de 60 anos, condiciona a um pior prognóstico (Ramadan et al., 2007). Sintomas B foram ausentes nos 44 pacientes, pesquisa recente comprovou que a ausência destes sintomas na evolução do linfoma confere melhor prognóstico (Ramadan et al., 2007). Neste trabalho, obteve-se a idade na maioria dos casos, contudo os dados sobre evolução foram incompletos. Em cinco casos, com óbito pelo linfoma, a idade variou de 22 a 71 anos e dois casos apresentaram idade superior a 60 anos. A curva de sobrevida de acordo com idade não demonstrou significância estatística, contudo destacou-se tendência de melhor sobrevida no grupo etário abaixo dos 60 anos.

A longa sobrevida e baixo índice de recidiva observados em vários estudos é uma característica que diferencia o LOP dos demais linfomas extranodais. Gianelli et al. (2002) concluíram que os linfomas ósseos primários são uma categoria heterogênea de linfomas extranodais com prognóstico favorável na maioria dos casos (Gianelli et al., 2002). A presença de fratura patológica e compressão medular pelo tumor são fatores que podem complicar

essa evolução (de Camargo et al., 2002, Gianelli et al., 2002, Beal et al., 2006, Kitsoulis et al., 2006). Ramadan et al. (2007) observaram que a presença de fratura patológica e compressão da medula espinhal não interferiram no prognóstico dos pacientes (Ramadan et al., 2007).

Linfoma B difuso de grandes células (LDGCB) é considerado o linfoma mais comum em adultos e representa cerca de 40% dos linfomas não-Hodgkin no mundo ocidental e um dos mais freqüentes em países em desenvolvimento. Pode acometer desde crianças a idosos, contudo é mais prevalente neste último grupo. O comprometimento extranodal é mais freqüente do que nodal, mas envolvimento da medula óssea e leucemização são raros (Colomo et al., 2003, Neto, 2005, Staudt e Dave, 2005). Nas últimas décadas, tem ocorrido aumento das formas extranodais, representando atualmente cerca de 1/3 a 1/4 dos casos de LDGCB (Lopez-Guillermo et al., 2005).

A heterogeneidade deste grupo de linfomas é observada na sobrevida variável dos pacientes, nas diferentes anormalidades genéticas, aspectos clínicos, resposta ao tratamento e prognóstico, causando divergências na literatura (Colomo et al., 2003, Staudt e Dave, 2005). Vários trabalhos realizados nas últimas décadas confirmam essa variabilidade imunofenotípica, clínica e genética (Hans et al., 2004, Poulsen et al., 2005).

Estudos de expressão gênica, utilizando *cDNA microarray* diferenciaram os LDGCB em dois subgrupos prognósticos: semelhante a células do centro germinativo (Vega, F. et al., 2005) e semelhante a células não-centro germinativo (pós-CG). Pacientes do subgrupo CG possuem melhor sobrevida total do que os do grupo pós-CG (Staudt e Dave, 2005).

A análise epidemiológica nos 46 casos de LDGCB nodal demonstrou alguns resultados semelhantes aos da literatura e outros discordantes (Hans et al., 2004) A idade média observada foi de 53 anos (6ª década de vida) semelhante à apresentada em outras séries. O sexo feminino foi o mais acometido

(61%), diferentemente de outros trabalhos publicados em que se verificou discreta predominância em homens (Jaffe et al., 2001, Hans et al., 2004).

A análise do IPI (índice internacional de prognóstico), validado em vários estudos e utilizado como fator prognóstico em LNH, não foi efetivada devido à ausência dos pré-requisitos em vários casos de linfoma nodal e principalmente ósseo como, por exemplo: dosagem de desidrogenase láctica (Neto, 2005). Os resultados de estadiamento mostraram-se próximos aos de outros trabalhos, os estádios IV e III foram os mais freqüentes em 49% e 30% dos pacientes, respectivamente. Confirmou-se também que esses estádios são os mais agressivos e propensos à recidiva precoce, nos pacientes com recidiva, 57% eram estágio IV e 29% estágio III (Fisher et al., 2004).

A análise estatística demonstrou tempo médio de sobrevida nos casos recidivados de 48 meses, maior do que observado nos linfomas ósseos e elevado número de óbitos (43%) comparado ao LOP recidivado. Nossos dados confirmam os achados clínicos observados em outras pesquisas e indicam a relação do pior prognóstico com o estágio avançado e a recidiva. Vale a pena ressaltar que os estádios de LOP predominantes eram I e II, enquanto os nodais eram III e IV e todos os casos de linfomas metastáticos estavam no estágio IV.

O grupo de LDGCB com envolvimento secundário da medula óssea (MO) denominado grupo metastático, com 16 casos, demonstrou variação na faixa etária e sexo semelhante às formas nodais. Este grupo nodal estava representado tanto por linfomas primários nodais quanto extranodais não de origem óssea. O envolvimento da MO nos LDGCB demonstra, em alguns estudos, variação de 17% a 33% dos casos (Chung et al., 2007). Campbell et al. (2006) observaram relação entre os LDGCB extranodais e a maior freqüência no envolvimento da MO. Este estudo refere que pacientes com envolvimento da MO possuem sobrevida semelhante à observada nos pacientes sem comprometimento da MO (Campbell et al., 2006). Nossos casos de LDGCB metastático associados à recidiva exibiram tempo médio de sobrevida de 30 meses inferior aos outros dois grupos (LOP e nodal) e maior número de óbitos nos três grupos (75%).

Neste trabalho, foram utilizados marcadores imunoistoquímicos com intuito de evidenciar e melhor caracterizar o imunofenótipo do LDGCB nos três grupos de linfomas. Esse estudo pormenorizado possibilitou confirmar origem B, o diagnóstico diferencial com outros linfomas de alto grau e observar algumas peculiaridades no LDGCB ósseo primário.

A expressão do CD20 comumente observada em LDGCB pode estar perdida em casos com diferenciação plasmacítica (Jaffe et al., 2001). Neste trabalho, todos os casos nos três grupos analisados, demonstraram positividade para o CD20, confirmando a sua origem em linfócitos B. Outros panmarcadores para linfócitos B utilizados como o Bob 1, proteína transcriptional específica para linfócitos B e o PAX5, encontrado em todos os estágios de maturação dos linfócitos B, demonstraram resultados previsíveis e foram expressos na maioria dos LDGCB nodais e ósseos primários (Dabbs, 2006).

A expressão negativa do CD138 e fraca dos CD38 e VS38c nos LDGCB nodais e ósseos não demonstraram diferenciação plasmocitária nos casos examinados. Nos casos metastáticos com padrão intersticial, a maior expressão do CD38 pode ter sido decorrente da presença de células pré-existentes como plasmócitos, linfócitos B reacionais e depósitos de imunoglobulina dispostos em meio às células linfomatosas da medula óssea e interpretados como falsos positivos nas células neoplásicas. Alguns casos de LOP que expressaram fracamente VS38c nas células tumorais estavam associados ao excesso de fundo decorrente dos artefatos técnicos de descalcificação. A expressão das cadeias leves de imunoglobulina Kappa e Lambda foram negativas na maioria dos casos de LDGCB (Jaffe et al., 2001, Dabbs, 2006).

A escassa expressão da enzima ciclina D1 (SP4), nos LDGCB ósseos primários, demonstrou sua semelhança neste aspecto com os nodais. Essa proteína-quinase, reguladora do ciclo celular, raramente é expressa em plasmocitomas e a expressão citoplasmática observada em muitos LNH é considerada inespecífica e não se relaciona com a sua expressão no RNAm (Nakamura et al., 1997, Dabbs, 2006) O CD30 foi expresso nos três grupos com

freqüência variável de 12% a 38% dos casos e a intensidade de expressão foi pouco intensa e observada em pequeno número de células. A positividade para o CD30 pode ser observada em pequena proporção de células do LDGCB (Dabbs, 2006).

CD99 geralmente é observado nos estágios iniciais do desenvolvimento do linfócito B, podendo ser expresso em linfomas/leucemias linfoblásticas, leucemias mielóides agudas e LNH de baixo grau. Sua expressão nos LDGCB ósseos primários e nodais foi escassa e pouco intensa. A medula óssea exhibe subtipos de linfócitos normais positivos para o CD99, este dado poderia justificar a expressão positiva em 44% dos casos metastáticos ou, provavelmente, decorrente da coloração de fundo ocasionada pela ligação cruzada do anticorpo com outros antígenos teciduais (Ambros et al., 1991, Dabbs, 2006).

CD5, marcador de linfócitos T, pode ser encontrado em linfomas do manto e leucemias crônicas. Sua expressão nos LDGCB delimita um subgrupo caracterizado por menor sobrevida, em aproximadamente, 10% dos casos (Wu e Keating, 2006). A análise do CD5 demonstrou positividade em apenas 5% (3/62) dos LDGCB ósseos primários e exclusivamente nas amostras provenientes da França. As amostras do Brasil foram negativas. A falta de dados evolutivos desses casos impediu sua correlação com a sobrevida. A expressão do CD3, panmarcador de linfócitos T, foi negativa em todos os casos analisados.

A identificação dos dois principais subgrupos prognósticos de LDGCB, centro germinativo (Vega, F. et al., 2005) e não-centro germinativo (pós-CG) foram recentemente demonstrados em trabalho de Hans et al. (2004), utilizando três anticorpos (CD10, Bcl-6 e MUM1). O reconhecimento das moléculas com expressão no RNAm por estes anticorpos está freqüentemente relacionado com os subgrupos do LDGCB nas análises de *cDNA microarray*. A praticabilidade e sensibilidade deste método favorecem a sua utilização em material de TMA (Hans et al., 2004). No entanto, a utilidade deste método em identificar os dois subgrupos prognósticos tem sido debatida na literatura, trabalhos confirmaram sua utilidade enquanto outros não (De Paepe e De Wolf-Peeters, 2007). Neste

trabalho, optamos pelo método do algoritmo descrito por Hans et al. (2004) e obtivemos resultados satisfatórios que permitiram classificar os casos de LDGCB nodal e ósseo primário nos subgrupos CG e pós-CG.

A classificação dos LDGCB do subgrupo CG foi determinada pela expressão dos anticorpos CD10 e Bcl-6. O CD10 é uma endopeptidase neutra associada à membrana citoplasmática e expressa em vários tecidos humanos, mas limitada nos linfócitos reativos do centro germinativo. Estudos retrospectivos confirmaram a capacidade do CD10 isolado em prever a sobrevida nos pacientes com LDGCB, todavia até o momento essa afirmação é controversa (Hans et al., 2004). A proteína Bcl-6 atua como fator de transcrição dos genes envolvidos no ciclo celular, ativação de linfócitos, apoptose e diferenciação, estando expressa nas células B do centro germinativo (centroblastos e centrócitos) com papel central na sua formação. Rearranjos genéticos, envolvendo o *BCL6* são freqüentemente observados nos LDGCB. Estudos sobre a expressão do Bcl-6 e sua relação com prognóstico nos LDGCB são limitados em número. Casos positivos para Bcl-6 e MUM1 foram classificados como pós-CG em razão de estudos anteriores comprovarem sua origem pela expressão gênica (Hans et al., 2004) (De Paepe e De Wolf-Peeters, 2007).

MUM1 / IRF-4 normalmente é expresso em plasmócitos e subgrupo de linfócitos B do centro germinativo. Membro linfóide específico da família dos fatores regulatórios de transcrição do interferon pode estar expresso em 50 a 70% dos LDGCB. Representa a fase final de diferenciação das células B do centro germinativo e com função determinante no desenvolvimento dos plasmócitos, sendo considerado marcador do fenótipo pós-CG (Hans et al., 2004, De Paepe e De Wolf-Peeters, 2007). Neste trabalho, além do MUM1 foi utilizado outro marcador do fenótipo pós-CG, o CD138 que auxilia na identificação dos LDGCB com diferenciação plasmacítica.

As diferenças biológicas entre os grupos CG e PÓS-CG são observadas em vários trabalhos na literatura. Tem sido descrito que a sobrevida de 5 anos nos grupos CG e PÓS-CG correspondeu a 59% e 31% respectivamente

e, em trabalhos utilizando cDNA *microarray*, a sobrevida correspondeu a 62% a 26% respectivamente (Staudt e Dave, 2005, Lossos e Morgensztern, 2006, Kwong, 2007). O fenótipo CG é considerado de prognóstico mais favorável nas formas nodais e extranodais de LDGCB tanto em trabalhos de expressão gênica com análise do DNA bem como trabalhos imunoistoquímicos (Kwong, 2007). Este subgrupo corresponde a cerca de 1/3 dos LDGCB.

De Leval et al. (2003) demonstraram pela imunoistoquímica, em 29 casos de LDGCB ósseo primário, que 48% eram do fenótipo CG e associados com longa sobrevida (de Leval et al., 2003). Nosso trabalho demonstrou predomínio do grupo CG no LDGCB ósseo primário (66%) enquanto no grupo nodal predominou o fenótipo pós-CG (69%). Na curva de sobrevida não ocorreu significância estatística na análise entre os grupos (CG e pós-CG) e os sítios primários (ósseo e nodal) apesar de ter sido observada tendência em relação ao grupo LOP CG com melhor sobrevida e menor número de óbitos e o nodal pós-CG com pior evolução.

Esses resultados podem sugerir melhor evolução do grupo CG no linfoma ósseo semelhante ao observado em um único trabalho que avaliou este aspecto no LOP (de Leval et al., 2003). Em pesquisa recente, Colomo et al. (2003) foram capazes de confirmar a classificação molecular de grupos nodais e extranodais de LDGCB, por meio da imunoistoquímica, mas não observaram diferença significativa na sobrevida entre os dois subgrupos CG e pós-CG (Colomo et al., 2003). Não se efetuou a correlação com prognóstico, analisando CD10 e MUM-1 isolados ou em combinação.

A disseminação dos linfomas B obedece, em parte, aos mecanismos de ativação linfocitária observados na migração e endereçamento (“*homing*”) dos linfócitos normais aos órgãos linfóides secundários. Três grandes famílias de moléculas de adesão (integrinas, selectinas e moléculas da família das imunoglobulinas) são responsáveis pela aderência dos linfócitos e possuem papel decisivo no seu processo de ativação e fluxo para os órgãos linfóides (Terol et al., 1999).

Visando investigar o padrão de expressão destas moléculas nos LDGCB, procurou-se selecionar as principais moléculas de adesão envolvidas no fluxo e propagação dos linfomas B. É importante ressaltar que o padrão na expressão de algumas destas moléculas nos LDGCB ósseos e nodais ainda são desconhecidos na literatura.

A molécula CD29 corresponde à subunidade comum $\beta 1$ das integrinas, sendo denominada de antígeno de ativação tardia (VLA) quando associada às subunidades α . Terol et al. (1999) demonstraram correlação entre tipos diferentes de β integrinas e a piora da sobrevida total em LDGCB, mas não encontraram significância estatística na análise da sobrevida e expressão das beta-integrinas com linfomas não-Hodgkin (Terol et al., 1999).

Nossos resultados demonstraram expressão fraca do CD29 no grupos LOP e expressão negativa no grupo nodal, diferentemente dos resultados da literatura que exibem elevada expressão CD29 nos LDGCB (Terol et al., 1999). A curva de sobrevida demonstrou significância estatística nos grupos que foram negativos para esta molécula de adesão (LOP, nodal e metastático). O melhor tempo de sobrevida foi observado nos grupos LOP e nodal enquanto o pior nos metastáticos positivos. A ausência de expressão da $\beta 1$ -integrina sugere que esta molécula esteja relacionada com melhor prognóstico nos LDGCB ósseos primários. Outro aspecto a ser ressaltado é que os estádios clínicos dos três grupos de linfomas podem ter influenciado a curva de sobrevida nos grupos negativos para o CD29.

A família CD44 (CD44s e isoformas CD44v) está implicada na migração e endereçamento dos linfócitos, hematopoiese, progressão tumoral e metástase. A maioria das células tumorais expressam a isoforma padrão CD44s (Tzankov et al., 2003). Estudos clínicos com LNH demonstraram que a expressão do CD44s estava associada com doença disseminada e óbito precoce pelo linfoma. Drillenburger et al. (1999) concluíram que o CD44s está implicado como fator prognóstico na sobrevida de pacientes com LDGCB nas formas localizadas nodais (Horst et al., 1990, Drillenburger et al., 1999). As formas variantes são menos

abundantes nos linfócitos normais, contudo a expressão da isoforma seis está associada a prognóstico desfavorável em LDGCB e correlaciona-se linearmente com o estágio da doença, podendo contribuir para a disseminação do linfoma (Drillenburg e Pals, 2000, Tzankov et al., 2003).

Nosso trabalho, avaliou exclusivamente a expressão do CD44s. A maior expressão ocorreu no grupo nodal e a menor no grupo LOP. A literatura exhibe resultados diversos em relação à expressão nos linfomas nodais, variando de 13% a 63% dos casos (Horst et al., 1990, Drillenburg et al., 1999). Nossos resultados apontaram que os linfomas nodais que não expressaram CD44 exibiram tempo de sobrevivência próximo ao LOP, porém demonstraram maior número de óbitos pelo linfoma, isso se deve provavelmente pelos estádios mais avançados encontrados no grupo nodal. Não ocorreu significância estatística entre os grupos na análise da curva de sobrevivência. Porém, observou-se tendência de pior evolução nos casos do grupo LOP que expressaram CD44s comparado aos casos que não expressaram, corroborando a importância da utilização do CD44 no acompanhamento de pacientes com LOP, observados em outros trabalhos (Drillenburg e Pals, 2000, Tzankov et al., 2003).

Selectinas representam uma família de moléculas de adesão estreitamente relacionadas no contato dos leucócitos circulantes e células endoteliais vasculares. Seus membros são L-selectina, E-, P-. A L-selectina é expressa nas células tronco hematopoiéticas, timócitos, leucócitos circulantes e células linfomatosas sendo rapidamente sub-regulada durante os processos de ativação celular (Drillenburg e Pals, 2000, Belanger e St-Pierre, 2005). Vários estudos têm demonstrado a implicação das selectinas nas metástases tumorais, no entanto o seu papel no processo de linfomagenese permanece obscuro (Drillenburg e Pals, 2000, Belanger e St-Pierre, 2005).

Trabalhos anteriores demonstraram que linfomas MALT de baixo grau expressam melhor a L-selectina, enquanto formas agressivas intestinais e LDGCB nodais a expressam fracamente (Liu et al., 2001, Belanger e St-Pierre, 2005). A L-selectina atua na linfomagenese promovendo a migração e fluxo dos

linfócitos nos linfomas extranodais, principalmente os originados em mucosa. Em trabalho experimental recente, a L-selectina favoreceu o crescimento intratímico das células do linfoma T e facilitou a disseminação para órgãos periféricos (Belanger e St-Pierre, 2005).

Neste trabalho, não se observou expressão da L-selectina (CD62L) nos três grupos analisados. A ausência de expressão no grupo LOP foi comparável à observada em linfomas extranodais agressivos. A ausência de expressão do CD62L no grupo LOP não deve estar relacionada com o padrão de agressividade biológica e, provavelmente, deve-se aos mecanismos distintos de migração e endereçamento (“homing”) das células linfomatosas dentro do tecido ósseo durante a formação deste tipo particular de linfoma (Pals et al., 1991, Drillenburger e Pals, 2000). A análise da curva de sobrevida demonstrou significância estatística entre os grupos LOP e metastático negativos. A melhor sobrevida dos casos de LOP provavelmente está relacionada com as características clínicas e de estadiamento que favorecem a boa evolução dos pacientes. Os outros grupos (nodal e metastático) demonstraram curvas de sobrevida com pior evolução.

A integrina $\alpha 5$ (CD51) constitui uma das porções alfa da família das integrinas cuja porção comum $\beta 1$ já foi descrita anteriormente e entra na composição da molécula VLA₅ (antígeno de ativação tardia). A expressão do VLA₅ pode ser encontrada em doenças linfoproliferativas crônicas como a leucemia linfocítica crônica e de maneira mais variável em LDGCB (Terol et al., 1999). Trabalhos anteriores, analisando a expressão das integrinas em LNH, observaram correlação significativa entre a expressão da integrina $\alpha 5$ e o envolvimento extranodal. Estudos experimentais comprovam que o VLA₅ está envolvido no processo de disseminação dos linfócitos malignos (Blase et al., 1995).

A expressão do CD51 em todas as amostras do grupo LOP foi inesperadamente negativa uma vez que esta integrina encontra-se mais expressa em formas extranodais. A maior expressão no grupo metastático demonstrou relação com menor tempo médio de sobrevida (28 meses) apesar da expressão desta integrina estar menos vinculada com infiltração da MO. Na análise da curva

de sobrevida, ocorreu significância estatística nos grupos que não expressaram o CD51, dentre eles o LOP e o nodal exibiram melhor evolução com maior tempo médio de 189 meses no grupo LOP. Deste modo, a ausência de expressão da integrina $\alpha 5$ parece estar relacionada com melhor evolução dos LDGCB ósseos primários, estudos posteriores deverão analisar a expressão das outras formas de integrina α para conclusões mais satisfatórias.

O desequilíbrio entre a proliferação e morte celular das células malignas é uma característica comum a todos os cânceres. O ciclo celular é regulado por grupos complexos de proteínas envolvidas na apoptose e proliferação celulares. Muitas destas proteínas exercem importante função na evolução dos LNH. Foi observado que a resistência à apoptose pelas células tumorais, nos LNH, pode estar envolvida na linfomagênese (Hermine et al., 1996, Gascoyne et al., 1997).

Bcl-2 e Bax são componentes da família de proteínas relacionadas à apoptose celular. Bax promove a apoptose enquanto o Bcl-2 bloqueia o mecanismo de autodestruição celular (Bailey et al., 1999). A literatura demonstra que a desregulação do ciclo celular e dos mecanismos que controlam a apoptose estão envolvidos na patogênese do LDGCB (Bai et al., 2004).

A proteína Bcl-2 esta localizada principalmente na membrana mitocondrial e sua superexpressão nas células malignas esta condicionada à translocação do gen *BCL2* 18q21 com a imunoglobulina de cadeia pesada. A proteína Bcl-2 favorece a promoção das células linfomatosas B, inibindo a apoptose. Cerca de 58% a 47% dos LDGCB expressam a Bcl-2 e demonstram relação com a sobrevida inferior nos pacientes com LDGCB (Lossos e Morgensztern, 2006).

A ligação da proteína Bax com Bcl-2 forma heterodímeros que inibem a sua função. Esta ligação ineficaz pode desorganizar e dificultar a formação dos homodímeros com outras moléculas Bax ou pelas funções bioquímicas opostas. Contrastando com este efeito, o Bcl-2 pode ser neutralizado pela competição com molécula inativa de Bax. Essa relação entre estas duas moléculas sugere padrões

recíprocos nos quais monômeros ou homodímeros de Bcl-2 favorecem a sobrevivência celular enquanto homodímeros da molécula Bax favorecem a morte celular (Sohn et al., 2003).

A expressão da proteína Bax em linfomas inibe a progressão da doença, sendo considerado, em alguns trabalhos, fator prognóstico expressivo na sobrevida total (Sohn et al., 2003). Gascoyne *et al* (1997) concluíram que a expressão da Bax não possui significado prognóstico nos pacientes com LDGCB (Gascoyne et al., 1997).

Em nosso trabalho, a expressão da Bax nos casos de LOP (32%) foi menor que nos linfomas nodais (43%) e metastáticos (87%). Sohn et al. demonstraram expressão da Bax em 37,6% dos pacientes com LDGCB nodais, porém considerando como casos que expressaram Bax aqueles com ponto de corte acima de 50% de células expressando esta proteína (Sohn et al., 2003).

Nosso trabalho utilizou ponto de corte $\geq 10\%$ de células, expressando a proteína como positivo. Este método justificaria assim o maior número de casos positivos para Bax encontrados na nossa série. Outros trabalhos, analisando expressão de anticorpos diversos em TMA utilizaram pontos de corte variados entre 10% a 30% em séries de linfomas e tumores sólidos (Hsu et al., 2002, Milanes-Yearsley et al., 2002, Hans et al., 2004). Em trabalhos sobre linfoma ósseo, os pontos de corte variaram entre 10% a 25% das células positivas, utilizando a técnica de imunoistoquímica (Huebner-Chan et al., 2001, de Leval et al., 2003).

Ocorreu significância estatística na curva de sobrevida entre os grupos de linfoma e a expressão da proteína Bax. A melhor sobrevida ocorreu no grupo LOP negativo para Bax enquanto os casos LOP positivos tiveram sobrevida inferior e com menor tempo médio de vida. O grupo com pior sobrevida foi o metastático positivo para Bax seguido do nodal negativo. A expressão da proteína Bax nos linfomas ósseos, contrariamente ao que se observa nos LNH, foi

associada com pior sobrevida, entretanto a expressão nos LDGCB nodais esteve de acordo e demonstrou relação com melhor sobrevida. Um caso do grupo LOP negativo evoluiu com o seguimento mais longo (240 meses); este dado provavelmente influenciou na curva de sobrevida deste grupo.

Em relação à expressão do Bcl-2 observou-se forte positividade nos grupos LOP (79%) e nodal (91%), o grupo metastático não foi analisado. Não ocorreu significância estatística na análise da curva de sobrevida dos grupos. Os resultados demonstraram o grupo nodal positivo para Bcl-2 com pior evolução e maior número de óbitos enquanto que o grupo LOP negativo indicou melhor evolução comparando com os nodais e LOP positivo. Trabalhos comprovam a freqüente superexpressão desta proteína nos LDGCB e sua relação com pior prognóstico, favorecendo a sobrevivência das células malignas (Xu et al., 2001).

Bcl-6 promove a proliferação celular e bloqueia a diferenciação promovendo a apoptose. É frequentemente expresso em LDGCB nodais e extranodais sendo relacionado com prognóstico favorável (Xu et al., 2001, de Leval e Harris, 2003, Lossos e Morgensztern, 2006). Os resultados obtidos revelaram expressão elevada do Bcl-6 nos grupo nodal (87%) e LOP (67%). Não foram detectadas diferenças de sobrevida dos dois grupos. Os grupos LOP negativo e nodal positivo para Bcl-6 demonstraram sobrevida mais favorável, contudo ocorreu menor número de óbitos nos grupos que expressaram Bcl-6.

O p53, denominado guardião do genoma, induz a parada do ciclo celular na fase G1 e G2 e programa a morte celular em resposta ao dano do DNA. Mutações ou deleções do gene supressor tumoral *P53* são observadas em mais de 50% dos cânceres e são relacionadas com pior sobrevida.

As principais vias reguladoras do ciclo celular durante a fase de transição G1/S (pRB, proteína do retinoblastoma e p53) estão comumente alteradas em linfomas agressivos e suas vias de inibição do ciclo celular são constituídas por várias proteínas (Sánchez-Beato M, 2003). Foram analisados neste estudo a expressão por IHQ das proteínas p53 e pRB, com funções freqüentemente desreguladas no LDGCB.

Em LDGCB, a expressão da proteína p53 pode ser observada em 30% a 40% dos casos na ausência de mutações (de Leval et al., 2003, de Leval e Harris, 2003). Estudos indicaram que a forma mutante do gen *P53* possui melhor expressão imunoistoquímica que a forma não mutante, no entanto essa correlação é contestada em outros trabalhos (de Leval e Harris, 2003, Lossos e Morgensztern, 2006). O significado prognóstico da expressão da proteína p53 em LDGCB ainda é controverso, em alguns estudos está associada com pior prognóstico e maior resistência a drogas, mas em outros esta correlação não foi observada (Wu e Keating, 2006).

Outro regulador do ciclo celular, o p21, compõe uma família de moléculas inibidoras das ciclino-quinases (Godon et al.). As ciclinas associadas às quinases ciclino-dependentes (CDK) promovem o ciclo celular em várias fases. O p21, estimulado pelo p53, anula a atividade da quinase no complexo E-CDK2, bloqueando a entrada na fase S do ciclo (Paik et al., 2005). Estudos em LNH, investigando o imunofenótipo p53/p21 demonstraram pela IHQ que a mutação do *P53* está mais relacionada com casos positivos para p53 e negativos para p21 (p53+/ p21-), enquanto a forma não mutante ou selvagem com casos p53+/p21+ (de Leval e Harris, 2003). Casos de LDGCB com imunofenótipo p53+/p21- estão associados com pior sobrevida e falha no tratamento (de Leval e Harris, 2003). Paik *et al* (2005) não evidenciaram diferenças na sobrevida dos pacientes p53+/p21- (Paik et al., 2005).

Neste trabalho, os resultados demonstraram casos p53+/p21+ com a seguinte distribuição: 31% no grupo LOP, 22% no grupo nodal e 31% no grupo metastático, porém não se observaram casos p53+/p21-. Não ocorreu significância estatística na análise da sobrevida entre os grupos LOP, nodal e metastático que expressavam p53+/p21+.

A expressão isolada do p53 foi bastante elevada nos casos de LOP (90%) e nodal (96%) e no grupo metastático foi menos freqüente (31%). Foi evidenciada a maior expressão do p53 no grupo nodal e LOP quando comparados com outros estudos (de Leval e Harris, 2003, Paik et al., 2005, Lossos e

Morgensztern, 2006). Foi observado em trabalhos anteriores com pacientes portadores de LDGCB que a diminuição da sobrevida estava associada à forma *P53* mutante, mas controvérsias permanecem sobre a importância desta proteína na evolução desses linfomas (de Leval e Harris, 2003, Wu e Keating, 2006). Em estudo de 20 casos de LDGCB primário ósseo, a expressão do p53 foi observada em 80% dos casos. Os autores sugeriram que p53 poderia conter função importante na patogênese deste grupo de linfoma (Huebner-Chan et al., 2001).

No presente trabalho, observou-se significância na curva de sobrevida com p53. O grupo LOP positivo demonstrou a melhor sobrevida com melhor tempo médio de vida. Os grupos metastáticos que foram positivos e negativos na expressão do p53 demonstraram sobrevidas inferiores e com maior número de óbitos, provavelmente contribuíram para essa pior evolução os estádios avançados dos pacientes do grupo metastático. No grupo nodal positivo, observou-se curva de sobrevida inferior ao grupo LOP.

Os resultados indicaram ainda que a expressão da proteína p53 nos LDGCB ósseos primários e nodais não foi fator condicionante de pior evolução, talvez por estarem mais relacionados com forma não mutante do que a mutante. Trabalhos anteriores demonstraram que os pacientes com LDGCB que com a forma selvagem do *P53* (p53+/p21+) evoluíram melhor do que aqueles com a forma mutante (Leroy et al., 2002).

A proteína do retinoblastoma (pRB) regula negativamente o ciclo celular no início da fase G1, impedindo a liberação do fator de transcrição E2F, fundamental na transcrição de genes envolvidos no ciclo celular. A fosforilação da pRB através das CDK 4 e 6 promove o ciclo celular (Sanchez et al., 1998, de Leval e Harris, 2003, Sánchez-Beato M, 2003, Bai et al., 2004, Bai et al., 2007). A perda da pRB foi considerada fator prognóstico desfavorável nos LDGCB. Foi observada relação entre níveis elevados de pRB e prolongamento do tempo de sobrevida total (Sanchez et al., 1998, de Leval e Harris, 2003). Em trabalho recente, Bai et al. (2007) associaram as alterações encontradas nas três principais

vias de controle do ciclo celular e apoptose (P53, pRB e p27) com curso clínico mais agressivo em LDGCB (Bai et al., 2004, Bai et al., 2007).

Observamos elevada expressão da pRB em nossos grupos, LOP com 73%, nodal com 98% e metastático com 69%. Trabalhos anteriores comprovam a expressão elevada da pRB em casos de LDGCB nodal (Sanchez et al., 1998, de Leval e Harris, 2003, Bai et al., 2007).

Ocorreu significância na análise da curva da sobrevida entre o grupo LOP positivo que demonstrou melhor evolução e menor número de óbitos e o grupo metastático positivo que apresentou pior evolução e maior número de óbitos. Nossos resultados sugerem que a expressão da pRB está relacionada com melhor sobrevida no LDGCB ósseo primário, comparando-se com os grupos nodal e metastático positivos.

O aumento da atividade proliferativa está relacionado com pior prognóstico nos pacientes com linfomas agressivos (de Leval e Harris, 2003). Vários estudos sobre o valor prognóstico da proliferação celular em LDGCB, utilizando o marcador Ki-67, têm revelado resultados inconsistentes apesar dos índices elevados de proliferação celular estarem associados ao prognóstico desfavorável (de Leval e Harris, 2003).

O Ki-67 é uma proteína que está expressa no núcleo das células tumorais em ciclo celular ativo (fases G1, S, G2 e M) e sua análise pela IHQ é subjetivamente estimada pela avaliação microscópica. A dificuldade nos estudos realizados em confirmar o valor prognóstico desta proteína pode ser decorrente dos diferentes meios de validar os altos e baixos índices proliferativos que podem variar de 30% a 90% nos LDGCB.

O Ki-67 foi utilizado como marcador de índice de proliferação pelo seu consagrado uso em inúmeros estudos com LDGCB (de Leval e Harris, 2003, Lossos e Morgensztern, 2006). Optou-se por analisar a porcentagem da

expressão do Ki-67 nos três grupos de linfomas, dispensando a correlação com a sobrevida dos pacientes devido às controvérsias existentes na literatura.

LDGCB com moderado índice proliferativo (abaixo ou igual a 50%) foram mais freqüentes no grupo LOP, no grupo nodal e metastático ocorreram predomínio de alto índice proliferativo (acima de 50%) em 59% dos casos e em 71% dos casos respectivamente. Huebner-Chan *et al* (2001) encontraram índices moderados de proliferação celular em 75% dos casos de LOP (Huebner-Chan *et al.*, 2001). Os grupos nodal e metastático de LDGCB confirmaram os resultados encontrados em estudos já realizados, demonstrando atividade proliferativa entre 60% a 80% das células (Lossos e Morgensztern, 2006). Provavelmente o índice moderado observado na maioria dos casos de LOP justificaria o comportamento biológico menos agressivo e com melhor evolução neste grupo de LDGCB, mas é necessário compreender melhor a expressão desta proteína como fator prognóstico.

O microambiente em torno das células tumorais assume cada vez mais importância na biologia dos LNH. O sistema imune atua como sentinela, controlando a progressão do câncer por meio de células imunes reacionais *natural killer* (NK, do inglês *natural killer cells*) e linfócitos T infiltrantes (Hasselblom *et al.*, 2007). Vários estudos demonstraram a presença destas células infiltrantes e a relação da sua intensidade com a sobrevida em pacientes com câncer. Em LNH, observa-se, de permeio, ao tumor, grande variedade de células inflamatórias como macrófagos, células NK e linfócitos T auxiliares CD 4⁺ e citotóxicos CD 8⁺ infiltrantes. Este padrão varia de acordo com o tipo histológico sendo mais freqüente nas formas nodais do que em sítios extranodais (Ansell *et al.*, 2001). Poucos trabalhos foram realizados, demonstrando relação da sobrevida com linfócitos infiltrantes em LDGCB e os resultados são freqüentemente antagônicos e provavelmente decorrentes das metodologias utilizadas, a quantificação das células coradas e análise imunoistoquímica empregada (Ansell *et al.*, 2001, Hasselblom *et al.*, 2007).

Neste trabalho, avaliamos principalmente a intensidade de infiltração das subpopulações de linfócitos T e outras células do sistema imune encontradas nos LDGCB nodais e ósseos primários. A relação desta expressão com a sobrevida não foi efetuada. A expressão dos anticorpos CD3, CD5, CD4, CD8, CD57, CD68, Foxp3 nas células linfomatosas foi negativa na grande maioria dos casos. Observou-se, em amostras ocasionais de LOP e nodal, fraca expressão de alguns marcadores para linfócitos T, esses casos foram posteriormente reavaliados e concluídos como decorrentes de artefatos técnicos e formação de fundo da imunomarcação, portanto não foram valorizados.

Nossos resultados demonstraram grande variedade de células T infiltrantes e macrófagos no grupo nodal e LOP. A maioria dos casos exibiu baixo nível de infiltração de linfócitos T, variando de 0% a 5% de células T infiltrantes. Estudos prévios demonstraram que os LNH mostram maior frequência de células T ativadas do que em processos linfóides benignos hiperplásicos. Outro trabalho demonstrou que, na maioria dos casos analisados de LNH, ocorreu maior porcentagem de linfócitos T CD4⁺ do que CD 8⁺ (Ansell et al., 2001).

Riemersma et al. (2005), analisando expressão de linfócitos T citotóxicos (LTC) em LDGCB, apresentaram percentagens semelhantes entre formas nodais e extranodais (22-27%). Neste estudo, os autores observaram alta porcentagem de LTC em LDGCB do sistema nervoso central e testículo associada à perda da expressão do antígeno HLA classe I e II, proporcionando provavelmente vantagens na progressão do linfoma (Riemersma et al., 2005).

A infiltração por linfócitos T citotóxicos e T auxiliares nos LDGCB estudados foi reconhecida pelos anticorpos CD8 e CD4, respectivamente. Na maioria dos casos de LOP e nodal observou-se infiltração leve destas duas classes de linfócitos. Xu et al. (2001), em seu trabalho, confirmaram que a alta porcentagem de linfócitos T infiltrantes em LDGCB *de novo* associados à elevada relação CD4:CD8 são correlacionados com melhor sobrevida (Xu et al., 2001).

A expressão do Foxp3, marcador dos linfócitos reguladores (T_{regs}) definidos como $CD4^+ CD25^+$, tem sido recentemente avaliada em alguns trabalhos. Estas células atuam, suprimindo linfócitos T auto-reativos e, desse modo, controlam a auto-imunidade (Hasselblom et al., 2007). O impacto prognóstico do Foxp3 tem sido avaliado em vários tumores sólidos e linfomas com resultados contraditórios (Hasselblom et al., 2007). Hasselblom et al. (2007) investigaram a importância clínica da infiltração do Foxp3 e células citotóxicas em LDGCB através de imunistoquímica. Os autores não encontraram relação da expressão do Foxp3 com o prognóstico (Hasselblom et al., 2007). A quantidade de linfócitos Foxp3 positivos encontrados no nosso trabalho foi semelhante ao trabalho de Hasselblom et al. (2007) e não houve diferenças de percentagens entre os dois grupos (Hasselblom et al., 2007).

A quantidade de células NK reativas (CD57) e macrófagos (CD68) observados em nossas amostras não se distinguiram muito dos padrões observados em outros estudos. Em linfomas foliculares e folículos reativos, observou-se maior frequência do CD57 do que em outros linfomas (Perambakam et al., 2000).

Investigações com técnicas moleculares em LDGCB ósseos primários são escassas e limitadas em razão da baixa frequência desses tumores e às dificuldades na obtenção de amostras de boa qualidade (Huebner-Chan et al., 2001, de Leval et al., 2003). Daí a importância deste estudo, onde o número de casos relativamente grande resultou de coleta multiinstitucional. Existe um consenso de que o FISH é superior que a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar rearranjos em *BCL2* (Andersen et al., 2001, Godon et al., 2004, Ventura et al., 2006, Belaud-Rotureau et al., 2007). Além disto, biópsia de tumores ósseos costuma apresentar acentuada degradação dos ácidos nucléicos decorrentes do processo frequentemente inadequado de fixação e descalcificação dos tecidos, o que limita a utilização da PCR. Por essas razões, a técnica de FISH foi escolhida para avaliar a presença dos rearranjos genéticos

neste estudo. Foram obtidos resultados satisfatórios em cerca de metade dos casos (32/62).

O FISH revelou a presença de t(14; 18) (q32; q21) em 28% (9/32) dos casos de LOP, frequência maior quando comparada com outras análises de linfoma B difuso ósseo primário (Huebner-Chan et al., 2001, de Leval et al., 2003, Kitsoulis et al., 2006). Porém, esta frequência é semelhante à descrita em LDGCB nodal e menor que a observada nas formas extranodais (Kramer et al., 1998, Jaffe et al., 2001). A alta frequência do rearranjo do gene *BLC2* nos LOP sugere que essa entidade esteja patogeneticamente mais próxima aos linfomas nodais do que nos demais extranodais (Kramer et al., 1998).

Surpreendentemente, foi observado que o *MYC* estava rearranjado em 9% (3/32) dos casos. Esta foi a primeira demonstração de que este gene está rearranjado em LDGCB ósseos primários. A frequência do rearranjo do *MYC* foi semelhante à observada em linfomas nodais, mas menor do que a descrita em tumores no trato gastrointestinal (Kramer et al., 1998). Entretanto, neste último sítio, computa-se o linfoma de Burkitt, onde tem incidência relativamente alta (Jaffe et al., 2001). Um caso demonstrou interessante associação entre o *MYC* e o *BCL2*, mas esta associação, apesar de pouco freqüente, foi descrita em linfomas nodais (Kramer et al., 1998, Jaffe et al., 2001, Siebert et al., 2001, Ventura et al., 2006). Apesar de ser difícil extrair alguma conclusão significativa acerca de diferenças e semelhanças entre os casos dos dois países, não foi observada particularidade das anomalias moleculares entre os casos do Brasil e da França.

Os resultados para o gene *BLC-6* foram inesperados, uma vez que não foi detectado nenhum caso de LOP com rearranjo. É conhecido que o *BCL6* é freqüentemente rearranjado em LDGCB nodais e extranodais (Jaffe et al., 2001, Godon et al., 2004, Ventura et al., 2006). Esses resultados sugerem que LOP pode representar um grupo distinto de tumores. Já os resultados obtidos com as sondas *ALK*, *PAX5* foram os esperados, uma vez que estes genes estão envolvidos em translocações observadas em outras entidades clínico-patológicas particulares (Jaffe et al., 2001).

Importantes novos dados foram adicionados para uma melhor compreensão do LDGCB ósseo primário. Destaca-se a incidência relativamente alta de rearranjos do *BCL2* e *MYC* nestes tumores. Estes resultados, associados à ausência de rearranjo do *BCL6*, sugerem que o LDGCB ósseo primário representa um grupo peculiar dentro dos linfomas B extranodais.

6- CONCLUSÕES

- ✓ LOP é uma entidade clínico-patológica distinta dos demais linfomas nodais e metastáticos.
- ✓ O imunofenótipo negativo para as moléculas de adesão celular CD29, CD62L e CD51 associado à expressão das moléculas de apoptose e reguladoras do ciclo celular parecem ter relevância prognóstica no LOP e diferem na sua expressão dos linfomas nodais e metastáticos. Estes marcadores poderão ser úteis no seguimento de pacientes com LOP.
- ✓ O imunofenótipo centro germinativo encontrado na maioria dos casos de LOP permite considerar sua origem em linfócitos B do centro germinativo.
- ✓ O LOP os e linfomas nodais são semelhantes quanto à variedade e intensidade dos linfócitos infiltrantes.
- ✓ A comprovação de rearranjos genéticos do *MYC* e *BCL2* bem como a ausência de rearranjo com *BCL6* caracterizam o LOP como uma forma particular das formas extranodais.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med.* 1993 Sep 30;329(14):987-94.

Ambros IM, Ambros PF, Strehl S, Kovar H, Gadner H, Salzer-Kuntschik M. MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration. *Cancer.* 1991 Apr 1;67(7):1886-93.

Andersen CL, Hostetter G, Grigoryan A, Sauter G, Kallioniemi A. Improved procedure for fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cytometry.* 2001 Oct 1;45(2):83-6.

Ansell SM, Stenson M, Habermann TM, Jelinek DF, Witzig TE. Cd4+ T-cell immune response to large B-cell non-Hodgkin's lymphoma predicts patient outcome. *J Clin Oncol.* 2001 Feb 1;19(3):720-6.

Bai M, Skyras A, Agnantis NJ, Kamina S, Tsanou E, Grepí C, et al. Diffuse large B-cell lymphomas with germinal center B-cell-like differentiation immunophenotypic profile are associated with high apoptotic index, high expression of the proapoptotic proteins bax, bak and bid and low expression of the antiapoptotic protein bcl-xl. *Mod Pathol.* 2004 Jul;17(7):847-56.

Bai M, Tsanou E, Skyras A, Sainis I, Agnantis N, Kanavaros P. Alterations of the p53, Rb and p27 tumor suppressor pathways in diffuse large B-cell lymphomas. *Anticancer Res.* 2007 Jul-Aug;27(4B):2345-52.

Bairey O, Zimra Y, Shaklai M, Okon E, Rabizadeh E. Bcl-2, Bcl-X, Bax, and Bak expression in short- and long-lived patients with diffuse large B-cell lymphomas. *Clin Cancer Res.* 1999 Oct;5(10):2860-6.

Barbieri E, Cammelli S, Mauro F, Perini F, Cazzola A, Neri S, et al. Primary non-Hodgkin's lymphoma of the bone: treatment and analysis of prognostic factors for Stage I and Stage II. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004 Jul 1;59(3):760-4.

Bargatze RF, Wu NW, Weissman IL, Butcher EC. High endothelial venule binding as a predictor of the dissemination of passaged murine lymphomas. *J Exp Med*. 1987 Oct 1;166(4):1125-31.

Beal K, Allen L, Yahalom J. Primary bone lymphoma: treatment results and prognostic factors with long-term follow-up of 82 patients. *Cancer*. 2006 Jun 15;106(12):2652-6.

Belanger SD, St-Pierre Y. Role of selectins in the triggering, growth, and dissemination of T-lymphoma cells: implication of L-selectin in the growth of thymic lymphoma. *Blood*. 2005 Jun 15;105(12):4800-6.

Belaud-Rotureau MA, Parrens M, Carrere N, Turmo M, Ferrer J, de Mascarel A, et al. Interphase fluorescence in situ hybridization is more sensitive than BIOMED-2 polymerase chain reaction protocol in detecting IGH-BCL2 rearrangement in both fixed and frozen lymph node with follicular lymphoma. *Hum Pathol*. 2007 Feb;38(2):365-72.

Blase L, Daniel PT, Koretz K, Schwartz-Albiez R, Moller P. The capacity of human malignant B-lymphocytes to disseminate in SCID mice is correlated with functional expression of the fibronectin receptor alpha 5 beta 1 (CD49e/CD29). *Int J Cancer*. 1995 Mar 16;60(6):860-6.

Campbell J, Seymour JF, Matthews J, Wolf M, Stone J, Juneja S. The prognostic impact of bone marrow involvement in patients with diffuse large cell lymphoma varies according to the degree of infiltration and presence of discordant marrow involvement. *Eur J Haematol*. 2006 Jun;76(6):473-80.

Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res*. 1971 Nov;31(11):1860-1.

Chung R, Lai R, Wei P, Lee J, Hanson J, Belch AR, et al. Concordant but not discordant bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma predicts a poor clinical outcome independent of the International Prognostic Index. *Blood*. 2007 Aug 15;110(4):1278-82.

Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, Rives S, Martinez A, Bosch F, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2003 Jan 1;101(1):78-84.

Cook JR. Paraffin section interphase fluorescence in situ hybridization in the diagnosis and classification of non-hodgkin lymphomas. *Diagn Mol Pathol*. 2004 Dec;13(4):197-206.

Craxton A, Chuang PI, Shu G, Harlan JM, Clark EA. The CD40-inducible Bcl-2 family member A1 protects B cells from antigen receptor-mediated apoptosis. *Cell Immunol*. 2000 Feb 25;200(1):56-62.

Dabbs D. *Diagnostic Immunohistochemistry*. second edition ed: Elsevier; 2006.

de Camargo OP, dos Santos Machado TM, Croci AT, de Oliveira CR, Giannotti MA, Baptista AM, et al. Primary bone lymphoma in 24 patients treated between 1955 and 1999. *Clin Orthop Relat Res*. 2002 Apr(397):271-80.

de Leval L, Braaten KM, Ancukiewicz M, Kiggundu E, Delaney T, Mankin HJ, et al. Diffuse large B-cell lymphoma of bone: an analysis of differentiation-associated antigens with clinical correlation. *Am J Surg Pathol*. 2003 Sep;27(9):1269-77.

de Leval L, Ferry JA, Falini B, Shipp M, Harris NL. Expression of bcl-6 and CD10 in primary mediastinal large B-cell lymphoma: evidence for derivation from germinal center B cells? *Am J Surg Pathol*. 2001 Oct;25(10):1277-82.

de Leval L, Harris NL. Variability in immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its clinical relevance. *Histopathology*. 2003 Dec;43(6):509-28.

De Paepe P, De Wolf-Peeters C. Diffuse large B-cell lymphoma: a heterogeneous group of non-Hodgkin lymphomas comprising several distinct clinicopathological entities. *Leukemia*. 2007 Jan;21(1):37-43.

Drillenburger P, Pals ST. Cell adhesion receptors in lymphoma dissemination. *Blood*. 2000 Mar 15;95(6):1900-10.

Drillenburg P, Wielenga VJ, Kramer MH, van Krieken JH, Kluin-Nelemans HC, Hermans J, et al. CD44 expression predicts disease outcome in localized large B cell lymphoma. *Leukemia*. 1999 Sep;13(9):1448-55.

Fisher RI, Miller TP, O'Connor OA. Diffuse aggressive lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004:221-36.

Fletcher CDM, Unni K, Mertens F. *Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone*. Lyon: IARC press; 2002.

Foucar K. Application of tissue microarrays to hematolymphoid specimens: the minimalist perspective. *Hum Pathol*. 2002 Oct;33(10):951-2.

Gascoyne RD, Krajewska M, Krajewski S, Connors JM, Reed JC. Prognostic significance of Bax protein expression in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997 Oct 15;90(8):3173-8.

Gianelli U, Patriarca C, Moro A, Ponzoni M, Giardini R, Massimino M, et al. Lymphomas of the bone: a pathological and clinical study of 54 cases. *Int J Surg Pathol*. 2002 Oct;10(4):257-66.

Gianelli U, Ponzoni M, Moro A, Alfano RM, Pellegrini C, Giardini R, et al. Mutations of the 5' noncoding region of the BCL-6 gene in primary bone lymphomas. *Ann Hematol*. 2003 Nov;82(11):691-5.

Godon A, Genevieve F, Valo I, Josselin N, Talmant P, Foussard C, et al. Formalin-fixed and paraffin-embedded nodal non-Hodgkin's lymphomas demonstrate the same chromosome changes as those found in frozen samples: a comparative study using interphase fluorescence in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol*. 2004 Jun;13(2):97-104.

Gutierrez MI, Cherney B, Hussain A, Mostowski H, Tosato G, Magrath I, et al. Bax is frequently compromised in Burkitt's lymphomas with irreversible resistance to Fas-induced apoptosis. *Cancer Res*. 1999 Feb 1;59(3):696-703.

Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004 Jan 1;103(1):275-82.

Haralambieva E, Banham AH, Bastard C, Delsol G, Gaulard P, Ott G, et al. Detection by the fluorescence in situ hybridization technique of MYC translocations in paraffin-embedded lymphoma biopsy samples. *Br J Haematol*. 2003 Apr;121(1):49-56.

Haralambieva E, Kleiverda K, Mason DY, Schuurin E, Kluin PM. Detection of three common translocation breakpoints in non-Hodgkin's lymphomas by fluorescence in situ hybridization on routine paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol*. 2002 Oct;198(2):163-70.

Hasselblom S, Sigurdadottir M, Hansson U, Nilsson-Ehle H, Ridell B, Andersson PO. The number of tumour-infiltrating TIA-1+ cytotoxic T cells but not FOXP3+ regulatory T cells predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2007 May;137(4):364-73.

Hedvat CV, Hegde A, Chaganti RS, Chen B, Qin J, Filippa DA, et al. Application of tissue microarray technology to the study of non-Hodgkin's and Hodgkin's lymphoma. *Hum Pathol*. 2002 Oct;33(10):968-74.

Hermine O, Haioun C, Lepage E, d'Agay MF, Briere J, Lavnac C, et al. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood*. 1996 Jan 1;87(1):265-72.

Horsman JM, Thomas J, Hough R, Hancock BW. Primary bone lymphoma: a retrospective analysis. *Int J Oncol*. 2006 Jun;28(6):1571-5.

Horst E, Meijer CJ, Radaszkiewicz T, Ossekoppele GJ, Van Krieken JH, Pals ST. Adhesion molecules in the prognosis of diffuse large-cell lymphoma: expression of a lymphocyte homing receptor (CD44), LFA-1 (CD11a/18), and ICAM-1 (CD54). *Leukemia*. 1990 Aug;4(8):595-9.

Hsu FD, Nielsen TO, Alkushi A, Dupuis B, Huntsman D, Liu CL, et al. Tissue microarrays are an effective quality assurance tool for diagnostic immunohistochemistry. *Mod Pathol.* 2002 Dec;15(12):1374-80.

Huebner-Chan D, Fernandes B, Yang G, Lim MS. An immunophenotypic and molecular study of primary large B-cell lymphoma of bone. *Mod Pathol.* 2001 Oct;14(10):1000-7.

Jaffe E, Harris N, Stein H, Vardiman J. Pathology and Genetics: Tumors of Haematopoietic and lymphoid tissues. In: Vardiman EJNLHHSJW, editor. World Health Organization Classification Tumors. first edition ed. Lyon: IARC press; 2001. p. 171-4.

Kitsoulis P, Vlychou M, Papoudou-Bai A, Karatzias G, Charchanti A, Agnantis NJ, et al. Primary lymphomas of bone. *Anticancer Res.* 2006 Jan-Feb;26(1A):325-37.

Kramer MH, Hermans J, Wijburg E, Philippo K, Geelen E, van Krieken JH, et al. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 1998 Nov 1;92(9):3152-62.

Kusumoto S, Kobayashi Y, Sekiguchi N, Tanimoto K, Onishi Y, Yokota Y, et al. Diffuse large B-cell lymphoma with extra Bcl-2 gene signals detected by FISH analysis is associated with a "non-germinal center phenotype". *Am J Surg Pathol.* 2005 Aug;29(8):1067-73.

Kwong YL. Predicting the outcome in non-Hodgkin lymphoma with molecular markers. *Br J Haematol.* 2007 May;137(4):273-87.

Leroy K, Haioun C, Lepage E, Le Metayer N, Berger F, Labouyrie E, et al. p53 gene mutations are associated with poor survival in low and low-intermediate risk diffuse large B-cell lymphomas. *Ann Oncol.* 2002 Jul;13(7):1108-15.

Linderoth J, Jerkeman M, Cavallin-Stahl E, Kvaloy S, Torlakovic E. Immunohistochemical expression of CD23 and CD40 may identify prognostically favorable subgroups of diffuse large B-cell lymphoma: a Nordic Lymphoma Group Study. *Clin Cancer Res.* 2003 Feb;9(2):722-8.

Liu YX, Yoshino T, Ohara N, Oka T, Jin ZS, Hayashi K, et al. Loss of expression of alpha4beta7 integrin and L-selectin is associated with high-grade progression of low-grade MALT lymphoma. *Mod Pathol*. 2001 Aug;14(8):798-805.

Lopez-Guillermo A, Colomo L, Jimenez M, Bosch F, Villamor N, Arenillas L, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: clinical and biological characterization and outcome according to the nodal or extranodal primary origin. *J Clin Oncol*. 2005 Apr 20;23(12):2797-804.

Lossos IS, Morgensztern D. Prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006 Feb 20;24(6):995-1007.

Maruyama D, Watanabe T, Beppu Y, Kobayashi Y, Kim SW, Tanimoto K, et al. Primary bone lymphoma: a new and detailed characterization of 28 patients in a single-institution study. *Jpn J Clin Oncol*. 2007 Mar;37(3):216-23.

Miguez Sanchez C, Hebrero ML, Mesa C, Villanego I, Sanchez Calzado JA, Errazquin L. Primary bone lymphoma. *Clin Transl Oncol*. 2006 Mar;8(3):221-4.

Milanes-Yearsley M, Hammond ME, Pajak TF, Cooper JS, Chang C, Griffin T, et al. Tissue micro-array: a cost and time-effective method for correlative studies by regional and national cancer study groups. *Mod Pathol*. 2002 Dec;15(12):1366-73.

Miller TP, Grogan TM, Dahlberg S, Spier CM, Braziel RM, Banks PM, et al. Prognostic significance of the Ki-67-associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: a prospective Southwest Oncology Group trial. *Blood*. 1994 Mar 15;83(6):1460-6.

Nakamura S, Yatabe Y, Seto M. Cyclin D1 overexpression in malignant lymphomas; 1997.

Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L, Faitelson Y. CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2002 Nov;39(6):527-79.

Neto AH. Aplicação do índice prognóstico internacional em pacientes com linfoma difuso de grandes células B em uma instituição brasileira *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2005 Março/ 2005;27(1):27-30.

Nicolaides C, Dimou S, Pavlidisa N. Prognostic Factors in Aggressive Non-Hodgkin's Lymphomas. *Oncologist*. 1998;3(3):189-97.

Pagnano KB, Silva MD, Vassallo J, Souza MS, Costa FF, Saad ST. High expression of apoptosis-regulating proteins in Burkitt's lymphomas. *Haematologica*. 2002 Mar;87(3):ELT16.

Paik JH, Jeon YK, Park SS, Kim YA, Kim JE, Huh J, et al. Expression and prognostic implications of cell cycle regulatory molecules, p16, p21, p27, p14 and p53 in germinal centre and non-germinal centre B-like diffuse large B-cell lymphomas. *Histopathology*. 2005 Sep;47(3):281-91.

Pals ST, de Gorter DJ, Spaargaren M. Lymphoma dissemination: the other face of lymphocyte homing. *Blood*. 2007 Nov 1;110(9):3102-11.

Pals ST, Meijer CJ, Radaszkiewicz T. Expression of the human peripheral lymph node homing receptor (LECAM-1) in nodal and gastrointestinal non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia*. 1991 Jul;5(7):628-31.

Perambakam S, Naresh K, Nerurkar A, Nadkarni J. Intra-tumoral cytolytic cells: pattern of distribution in B-cell non Hodgkin s lymphoma. *Pathol Oncol Res*. 2000;6(2):114-7.

Poulsen CB, Borup R, Nielsen FC, Borregaard N, Hansen M, Gronbaek K, et al. Microarray-based classification of diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol*. 2005 Jun;74(6):453-65.

Ramadan KM, Shenkier T, Sehn LH, Gascoyne RD, Connors JM. A clinicopathological retrospective study of 131 patients with primary bone lymphoma: a population-based study of successively treated cohorts from the British Columbia Cancer Agency. *Ann Oncol*. 2007 Jan;18(1):129-35.

Riemersma SA, Oudejans JJ, Vonk MJ, Dreef EJ, Prins FA, Jansen PM, et al. High numbers of tumour-infiltrating activated cytotoxic T lymphocytes, and frequent loss of HLA class I and II expression, are features of aggressive B cell lymphomas of the brain and testis. *J Pathol*. 2005 Jul;206(3):328-36.

Sánchez-Beato M S-AA, Piris MA. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood*. 2003 Feb 15;101(4):1220-35.

Sanchez E, Chacon I, Plaza MM, Munoz E, Cruz MA, Martinez B, et al. Clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma is dependent on the relationship between different cell-cycle regulator proteins. *J Clin Oncol*. 1998 May;16(5):1931-9.

Shergill IS, Arya M. Tissue microarrays. *Expert Rev Mol Diagn*. 2004 Jul;4(4):421-3.

Shergill IS, Shergill NK, Arya M, Patel HR. Tissue microarrays: a current medical research tool. *Curr Med Res Opin*. 2004 May;20(5):707-12.

Siebert R, Rosenwald A, Staudt LM, Morris SW. Molecular features of B-cell lymphoma. *Curr Opin Oncol*. 2001 Sep;13(5):316-24.

Sjo LD, Poulsen CB, Hansen M, Moller MB, Ralfkiaer E. Profiling of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry: identification of prognostic subgroups. *Eur J Haematol*. 2007 Dec;79(6):501-7.

Sohn SK, Jung JT, Kim DH, Kim JG, Kwak EK, Park T, et al. Prognostic significance of bcl-2, bax, and p53 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Hematol*. 2003 Jun;73(2):101-7.

Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 1990 Aug 2;346(6283):425-34.

Staudt LM, Dave S. The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling. *Adv Immunol*. 2005;87:163-208.

Terol MJ, Lopez-Guillermo A, Bosch F, Villamor N, Cid MC, Campo E, et al. Expression of beta-integrin adhesion molecules in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with clinical and evolutive features. *J Clin Oncol*. 1999 Jun;17(6):1869-75.

Terpe HJ, Koopmann R, Imhof BA, Gunthert U. Expression of integrins and CD44 isoforms in non-Hodgkin's lymphomas: CD44 variant isoforms are preferentially expressed in high-grade malignant lymphomas. *J Pathol*. 1994 Oct;174(2):89-100.

Thiele J, Zirbes TK, Kvasnicka HM, Fischer R. Focal lymphoid aggregates (nodules) in bone marrow biopsies: differentiation between benign hyperplasia and malignant lymphoma--a practical guideline. *J Clin Pathol.* 1999 Apr;52(4):294-300.

Tzankov A, Pehrs AC, Zimpfer A, Ascani S, Lugli A, Pileri S, et al. Prognostic significance of CD44 expression in diffuse large B cell lymphoma of activated and germinal centre B cell-like types: a tissue microarray analysis of 90 cases. *J Clin Pathol.* 2003 Oct;56(10):747-52.

Vassallo J, Assuncao MC, Machado JC. Primitive malignant lymphomas of bone. Study of 14 cases. *Ann Pathol.* 1988;8(1):44-8.

Vassallo J, Roessner A, Vollmer E, Grundmann E. Malignant lymphomas with primary bone manifestation. *Pathol Res Pract.* 1987 Jun;182(3):381-9.

Vega F, Chang CC, Medeiros LJ, Udden MM, Cho-Vega JH, Lau CC, et al. Plasmablastic lymphomas and plasmablastic plasma cell myelomas have nearly identical immunophenotypic profiles. *Mod Pathol.* 2005 Jun;18(6):806-15.

Vega F, Medeiros L. Chromosomal translocations involved in non-Hodgkin lymphomas. *Arch Pathol Lab Med.* 2003 Sep;127(9):1148-60.

Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, McParland J, Gesk S, Mason DY, et al. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn.* 2006 May;8(2):141-51.

Villuendas R, Piris MA, Orradre JL, Mollejo M, Algara P, Sanchez L, et al. P53 protein expression in lymphomas and reactive lymphoid tissue. *J Pathol.* 1992 Mar;166(3):235-41.

Wallach-Dayana SB, Grabovsky V, Moll J, Sleeman J, Herrlich P, Alon R, et al. CD44-dependent lymphoma cell dissemination: a cell surface CD44 variant, rather than standard CD44, supports in vitro lymphoma cell rolling on hyaluronic acid substrate and its in vivo accumulation in the peripheral lymph nodes. *J Cell Sci.* 2001 Oct;114(Pt 19):3463-77.

Wu G, Keating A. Biomarkers of potential prognostic significance in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer*. 2006 Jan 15;106(2):247-57.

Xu Y, Kroft SH, McKenna RW, Aquino DB. Prognostic significance of tumour-infiltrating T lymphocytes and T-cell subsets in de novo diffuse large B-cell lymphoma: a multiparameter flow cytometry study. *Br J Haematol*. 2001 Mar;112(4):945-9.

Zinzani PL, Carrillo G, Ascani S, Barbieri E, Tani M, Paulli M, et al. Primary bone lymphoma: experience with 52 patients. *Haematologica*. 2003 Mar;88(3):280-5.

8- APÊNDICE

Quadros com os casos de linfoma provenientes do Brasil.

GG: gânglio

MO: medula óssea

EA: esqueleto axial

OL: ossos longos

ML: múltiplas localizações

OUT: outros

V: vivo

MD: morto pela doença

VD: vivo com doença

M: morto por outras causas

CASO	GRUPO	SEXO	IDADE	LOCALIZACAO	SÍTIO OSSEO	SISTEMA ANN ARBOR	SINTOMAS B	EVOLUÇÃO	SEGUIMENTO A PARTIR DO DIAGNÓSTICO	RECIDIVA APÓS TRATAMENTO	TRATAMENTO (RADIOTERAPIA)	TRATAMENTO (QUIMIOTERAPIA)	TRATAMENTO (CIRURGIA)	TRATAMENTO (TMO)
1	LOP	2	19	OSSO	EA	IV	NAO				SIM	NAO	NAO	NAO
2	LOP	1	30	OSSO	OL	IE	NAO				SIM	NAO	SIM	NAO
3	LOP	2	38	OSSO	OL	IE	NAO				SIM	SIM	NAO	NAO
4	LOP	2	25	OSSO	EA	IE	NAO				NAO	SIM	NAO	NAO
5	LOP	2	32	OSSO	EA	IE	NAO				NAO	SIM	NAO	NAO
6	LOP	1	29	OSSO	EA	IE	NAO				NAO	SIM	SIM	NAO
7	LOP	1	25	OSSO	OL	IE	NAO	V	240	NAO	SIM	SIM	SIM	NAO
8	LOP	1	27	OSSO	OL	IE	NAO	V	84	NAO	SIM	SIM	NAO	NAO
9	LOP	1	69	OSSO	EA	IE	NAO	MD	0,46	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO
10	LOP	2	30	OSSO	OL	IE	NAO		132	SIM	SIM	SIM	NAO	NAO
11	LOP	2	27	OSSO	OL	IE	NAO	V	84	NAO	SIM	SIM	NAO	NAO
12	LOP	1	34	OSSO	OL	IIIE	NAO	V	48	NAO	SIM	SIM	NAO	NAO
13	LOP	2	53	OSSO	EA	IE	NAO	V	72	NAO	SIM	SIM	NAO	NAO
14	LOP	1	18	OSSO	OL	IE	NAO	V	5	NAO	SIM	SIM	SIM	NAO
15	LOP	1	27	OSSO	OL	IE	NAO	V	36	NAO	SIM	SIM	SIM	NAO
16	LOP	1	18	OSSO	OL	IE	NAO	V	23	NAO	SIM	SIM	NAO	NAO
17	LOP	1	22	OSSO	OL	IV	NAO	MD	12	SIM	SIM	SIM	NAO	NAO
18	LOP	1	51	OSSO	OL						SIM	NAO	NAO	NAO
19	LOP	2	22	OSSO							NAO	NAO	NAO	NAO
20	LOP	2	63	OSSO	OL	IIIE	NAO	VD	13	SIM	NAO	SIM	NAO	NAO
21	LOP	2	55	OSSO										
22	LOP	2	52	OSSO	EA									
23	LOP	2	36	OSSO										
24	LOP	1	27	OSSO	EA									
25	LOP	2		OSSO	EA									
26	LOP	1	42	OSSO	OL									
27	LOP	1	40	OSSO	ML	IV	NAO	V	54	NAO	SIM	SIM	NAO	NAO
28	LOP	1	61	OSSO	ML	IV	NAO	VD	8	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
29	LOP	1	47	OSSO	ML	IV	NAO	MD	6	NAO	NAO	SIM	SIM	NAO
30	LOP	1	46	OSSO	OL	IIIE	NAO	V	44	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
31	LOP	1	65	OSSO	OL	IE	NAO	VD	10	NAO	SIM	SIM	NAO	NAO
32	LOP	1	28	OSSO	OL	IV	NAO	V	21	NAO	SIM	SIM	NAO	SIM
33	LOP	2	71	OSSO	ML	IV	NAO	MD	2	NAO	SIM	SIM	NAO	NAO
34	LOP	1		OSSO							NAO	NAO	NAO	NAO
35	LOP	2	72	OSSO	OL	IIIE	NAO	M	3	NAO	NAO	NAO	SIM	NAO
36	LOP	1	43	OSSO	ML	IV	NAO	VD	22	SIM	NAO	SIM	SIM	NAO
37	LOP	2	61	OSSO	OUT						NAO	NAO	NAO	NAO
38	LOP	1	57	OSSO		IE	NAO	VD	9	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
39	LOP	2	50	OSSO	OUT	IIIE	NAO	V	31	SIM	SIM	SIM	SIM	NAO
40	LOP	2	46	OSSO	OL	IE	NAO	V	21	NAO	SIM	SIM	NAO	SIM
41	LOP	1	38	OSSO	OL	IE	NAO	V	31	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO
42	LOP	2	54	OSSO	ML	IV	NAO	MD	12	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO
43	LOP	2	14	OSSO	EA ML	IV	NAO	V	70	NAO	NAO	SIM	SIM	NAO
44	LOP	1	30	OSSO	OL	IE	NAO	V	12	NAO	SIM	SIM	NAO	NAO

CASO	GRUPO	SEXO	IDADE	LOCALIZACAO	SISTEMA ANN ARBOR	SINTOMAS B	EVOLUÇÃO	SEGUIMENTO A PARTIR DO DIAGNÓSTICO	RECIDIVA APÓS TRATAMENTO	TRATAMENTO (RADIOTERAPIA)	TRATAMENTO (QUIMIOTERAPIA)	TRATAMENTO (CIRURGIA)	TRATAMENTO (TMO)
45	ND	1	43	GG	IV	SIM	MD	1	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
46	ND	1	20	GG	II	NAO	V	13	NAO	NAO	SIM	NAO	SIM
47	ND	1	40	GG	IV	SIM	MD	14	SIM	SIM	SIM	NAO	NAO
48	ND	1	67	GG	IV	SIM	MD	2	SIM	NAO	SIM	NAO	
49	ND	1	68	GG	III	NAO	V	47	SIM	NAO	SIM	NAO	
50	ND	2	65	GG	IV	NAO	VD	50	SIM	NAO	SIM	NAO	
51	ND	2	35	GG	III	NAO	MD	25	NAO	NAO	SIM	NAO	SIM
52	ND	2	54	GG	IV	SIM	VD	70	SIM	NAO	SIM	NAO	NAO
53	ND	2	68	GG	IV	SIM	M	12	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
54	ND	1	50	GG	III	SIM	MD	65	SIM	NAO	SIM	NAO	SIM
55	ND	1	67	GG						NAO	NAO	NAO	NAO
56	ND	2	55	GG	IV	SIM	MD	1	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO
57	ND	1	65	GG	IV	SIM	MD	8	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
58	ND	1	35	GG	IV	SIM	M	23	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
59	ND	1	67	GG	IV	SIM	V	29	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
60	ND	1	30	GG	III	NAO	V	69	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
61	ND	1	50	GG	II	NAO	V	7	NAO	NAO	SIM	NAO	SIM
62	ND	1	70	GG	IV	SIM	MD	1	NAO	NAO	NAO	SIM	NAO
63	ND	1	64	GG	IV	NAO	MD	3	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
64	ND	1	67	GG	IV	SIM	VD	32	SIM	SIM	SIM	NAO	NAO
65	ND	2	69	GG	III	SIM	VD	26	SIM	NAO	SIM	NAO	NAO
66	ND	2	74	GG	IV	SIM	MD	13	NAO	SIM	SIM	NAO	NAO
67	ND	1	53	GG	II	NAO	V	40	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
68	ND	2	38	GG									
69	ND	1	40	GG	II	NAO	v	47	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
70	ND	1	42	GG	III	NAO	V	43	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
71	ND	1	42	GG	III	NAO	V	36	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
72	ND	2	76	GG	IV	SIM	MD	1	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO
73	ND	1	35	GG	II	NAO	V	23	NAO	SIM	SIM	NAO	NAO
74	ND	2	70	GG	II	NAO	V	32	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
75	ND	1	34	GG	IV	NAO	V	29	SIM	SIM	SIM	NAO	SIM
76	ND	1	56	GG	III	SIM	M	8	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
77	ND	1	54	GG	III	SIM	V	28	NAO	NAO	SIM	NAO	SIM
78	ND	2	26	GG	II	NAO	MD	10	SIM	NAO	SIM	NAO	NAO
79	ND	1	59	GG	IV	SIM	MD	1	SIM	NAO	SIM	NAO	NAO
80	ND	1	64	GG	III	SIM	M	2	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO
81	ND	2	79	GG	III	SIM	VD	7	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
82	ND	1	62	GG	IV	SIM	V	6	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
83	ND	2	44	GG	III	NAO	V	67	SIM	NAO	SIM	NAO	SIM
84	ND	2	51	GG	IV	NAO	V	22	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
85	ND	2	41	GG	III	NAO	V	22	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
86	ND	2	69	GG	IV	SIM	V	19	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
87	ND	1	63	GG	IV	SIM	V	19	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
88	ND	1	70	GG	II	NAO	MD	49	SIM	SIM	SIM	NAO	NAO
89	ND	1	61	GG	II	NAO	V	18	NAO	SIM	SIM	NAO	NAO
90	ND	2	64	GG	IV	NAO	VD	46	SIM	NAO	SIM	NAO	NAO
91	ND	2	35	GG	III	NAO	V	15	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
92	MO	2	74	MO	IV	SIM	V	32	NAO	SIM	SIM	NAO	NAO
93	MO	2	45	MO	IV	SIM	V	8	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
94	MO	2	46	MO	IV	NAO	MD	20	NAO	NAO	SIM	NAO	SIM
95	MO	2	53	MO	IV	SIM	MD	17	NAO	NAO	SIM	SIM	NAO
96	MO	2	23	MO	IV	SIM	MD	20	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
97	MO	1	62	MO	IV	NAO	V	4	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
98	MO	1	51	MO	IV	SIM	MD	2	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO
99	MO	2	60	MO	IV	SIM	MD	41	SIM	NAO	SIM	NAO	NAO
100	MO	1	71	MO	IV	SIM	VD	9	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
101	MO	1	53	MO	IV	NAO	MD	12	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
102	MO	1	49	MO	IV	SIM	M	14	SIM	NAO	SIM	NAO	NAO
103	MO	2	60	MO	IV	NAO	V	18	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
104	MO	2	51	MO	IV	SIM	MD	20	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
105	MO	1	39	MO	IV	SIM	MD	30	SIM	NAO	SIM	NAO	NAO
106	MO	2	77	MO	IV	SIM	MD	2	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO
107	MO	1	69	MO	IV	SIM	MD	18	SIM	NAO	SIM	NAO	NAO

