

Universidade Estadual de Campinas



*Marcos Damião Alves da Silva*

*Análise da Expressão de Proteínas da Família  
BCL-2 em Linfomas Não Hodgkin*

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato(a)  
*Marcos Damião Alves da Silva*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.  
*15/12/99*

Tese apresentada ao Instituto de Biologia  
para obtenção do Título de Mestre em  
Biologia Funcional e Molecular na área de  
Bioquímica.

Orientador: Profa. Dra. Sara Terezinha Olalla Saad



1999



|              |                                       |
|--------------|---------------------------------------|
| UNIDADE      | BC                                    |
| N.º CHAMADA: | T/11/1999                             |
| Sí38a        |                                       |
| V.           | Ex.                                   |
| TOMBO        | 80/40262                              |
| PREÇO        | 278/00                                |
| C            | D <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO        | R\$ 11,00                             |
| DATA         | 02/02/00                              |
| N.º CPD      |                                       |

CM-00136002-5

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

Sí38a

Silva, Marcos Damião Alves da  
Análise da expressão de proteínas da família BCL-2 em  
linfomas não Hodgkin / Marcos Damião Alves da Silva. --  
Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador : Sara Terezinha Olalla Saad.  
Dissertação (mestrado) ) - Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Hodgkin, Linfoma não. 2. Imunohistoquímica.  
3. Apoptose. I. Saad, Sara Terezinha Olalla. I. Universidade  
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Universidade Estadual de Campinas

---

*Marcos Damião Alves da Silva*

*Análise da Expressão de Proteínas da Família  
BCL-2 em Linfomas Não Hodgkin*

Tese apresentada ao Instituto de Biologia  
para obtenção do Título de Mestre em  
Biologia Funcional e Molecular na área de  
Bioquímica.

Orientador: Profa. Dra. Sara Terezinha Olalla Saad



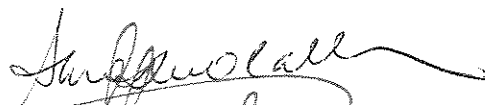
1999

**Data da Defesa: 15.12.1999**

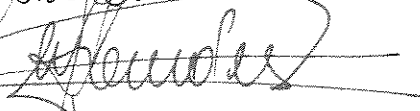
---

**Banca Examinadora**

Profa. Dra. Sara Terezinha Olalla Saad



Profa. Dra. Maria de Lourdes Chauffaille



Prof. Dr. José Vassallo



---

**Suplente**

Profa. Dra. Maria Cláudia Nogueira Zerbini

Prof. Dr. Cármino Antonio de Souza

---

Em memória a meu papaizinho Sr Avelino e mamãe Dona Maria, viva e forte.

Agradeço sincera e indistintamente a todos que puderam colaborar de alguma maneira na difícil realização deste trabalho, acreditando e confiando, com ou sem desprendimento.

Agradeço também aos que não acreditaram nem confiaram e espero que diante deste ainda possam acreditar e confiar.

“ Só pode ter alegria e ser feliz na vida, o homem sem medo.”

Friedrich Wilhelm Nietzsche

**Data da defesa: 15.12.1999**

---

**Banca Examinadora**

Profa. Dra. Sara Terezinha Olalla Saad

Profa. Dra. Maria de Lourdes Chauffaille

Prof. Dr. José Vassallo

---

---

**Suplentes**

Profa. Dra. Maria Cláudia Nogueira Zerbini

Prof. Dr. Cármino Antonio de Souza

---

## *Sumário*

|                                                    |           |
|----------------------------------------------------|-----------|
| <b>Introdução.....</b>                             | <b>1</b>  |
| Linfomas não Hodgkin .....                         | 4         |
| A proteína BCL-2 .....                             | 6         |
| Outras proteínas da família BCL-2.....             | 13        |
| <b>Objetivos .....</b>                             | <b>21</b> |
| <b>Casuística e Métodos .....</b>                  | <b>25</b> |
| Casuística .....                                   | 27        |
| Silanização .....                                  | 27        |
| Reinclusão .....                                   | 28        |
| Imunohistoquímica .....                            | 29        |
| Metodologia estatística .....                      | 33        |
| <b>Resultados .....</b>                            | <b>35</b> |
| Linfomas de baixo grau de malignidade .....        | 37        |
| Linfomas de grau intermediário de malignidade..... | 40        |
| Linfomas de alto grau de malignidade.....          | 43        |
| <b>Discussão .....</b>                             | <b>51</b> |
| <b>Conclusão .....</b>                             | <b>65</b> |
| <b>Referências.....</b>                            | <b>69</b> |
| <b>Anexos .....</b>                                | <b>91</b> |

## *Lista de Figuras*

---

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Ciclo celular e pontos de checagem .....                                     | 7  |
| 2. Estrutura secundária e domínios de ligação de BCL-2 .....                    | 11 |
| 3. Funções de BCL-2.....                                                        | 12 |
| 4. Membros da família BCL-2, estrutura secundária e homologia .....             | 14 |
| 5. Complexos formados por BCL-2 e outras moléculas.....                         | 16 |
| 6. Esquema de gânglio linfático .....                                           | 17 |
| 7. Proteína BAD, regulador negativo de apoptose.....                            | 19 |
| 8. Reação de Imunohistoquímica (IHQ) .....                                      | 32 |
| 9. IHQ em em linfomas não Hodgkin (LNH) de baixo grau: anti-BAK .....           | 38 |
| 10. Distribuição das proteínas em LNH baixo grau de malignidade .....           | 39 |
| 11. IHQ para BCL-2 em linfoma folicular .....                                   | 40 |
| 12. IHQ para BCL-2 em linfoma folicular .....                                   | 41 |
| 13. Distribuição das proteínas em LNH de grau intermediário de malignidade..... | 42 |
| 14. IHQ para BAX em LNH de alto grau de malignidade .....                       | 43 |
| 15. IHQ para MCL-1 em LNH de alto grau de malignidade .....                     | 44 |
| 16. Distribuição das proteínas em LNH de alto grau de malignidade .....         | 44 |
| 17. Distribuição das proteínas em linfomas linfoblásticos.....                  | 46 |
| 18. Distribuição das proteínas em linfomas de Burkitt .....                     | 47 |
| 19. Distribuição de BCL-2 nos diferentes subtipos de LNH.....                   | 48 |
| 20. Distribuição de BAX nos diferentes subtipos de LNH.....                     | 48 |
| 21. Distribuição de BAK nos diferentes subtipos de LNH .....                    | 49 |
| 22. Distribuição de MCL-1 nos diferentes subtipos de LNH.....                   | 49 |

## *Lista de Abreviaturas*

---

|                |                                                                                                                                                                                                 |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>AIF:</b>    | Apoptosis Induction Factor, proteína liberada da mitocôndria como um dos eventos primários da apoptose.                                                                                         |
| <b>AILD:</b>   | Linfoma Angio Imunoblástico                                                                                                                                                                     |
| <b>ANAPL:</b>  | Linfoma Anaplásico                                                                                                                                                                              |
| <b>BAK:</b>    | BCL-2 Associated Killer, proteína pró apoptótica, dimeriza com BCL-XL.                                                                                                                          |
| <b>BAX:</b>    | BCL-2 Antagonist X protein, proteína pró apoptótica, dimeriza com BCL-2.                                                                                                                        |
| <b>BCL-2:</b>  | B-Cell Lymphoma 2, proteína com função anti-apoptótica isolada de linfomas foliculares contendo a t(14;18).                                                                                     |
| <b>BCL-XL:</b> | proteína anti-apoptótica, formato "Large".                                                                                                                                                      |
| <b>BCL-XS:</b> | forma de "splicing" alternativo para o gene <i>Bcl-X</i> formando uma proteína "Small" pró-apoptótica BCL-XS.                                                                                   |
| <b>BH:</b>     | Binding Homology 1 a 4, Domínios $\alpha$ -hélice de homologia de ligação entre membros da família BCL-2, conservados filogeneticamente.                                                        |
| <b>BU:</b>     | Linfoma de Burkitt                                                                                                                                                                              |
| <b>CAM:</b>    | Cell Adhesion Molecules (moléculas de adesão celular).                                                                                                                                          |
| <b>CB:</b>     | Linfoma Centroblástico                                                                                                                                                                          |
| <b>EBV:</b>    | Epstein-Barr Virus, vírus envolvido na carcinogênese de alguns subtipos de linfoma.                                                                                                             |
| <b>GC-B:</b>   | Células-B dos Centros Germinativos de linfonodos.                                                                                                                                               |
| <b>GLM:</b>    | Granuloma de Linha Média                                                                                                                                                                        |
| <b>HTLV:</b>   | Human T-Lymphotropic Virus.                                                                                                                                                                     |
| <b>IB:</b>     | Linfoma Imunoblástico                                                                                                                                                                           |
| <b>IC:</b>     | Imunocitoma.                                                                                                                                                                                    |
| <b>IgH:</b>    | gene de cadeia pesada de imunoglobulinas (Immunoglobulin-Heavy chain), envolvido na t(14;18).                                                                                                   |
| <b>IHQ:</b>    | imunohistoquímica.                                                                                                                                                                              |
| <b>LB:</b>     | Linfoma Linfoblástico                                                                                                                                                                           |
| <b>LF:</b>     | Linfoma Folicular.                                                                                                                                                                              |
| <b>LLC:</b>    | Leucemia Linfóide Crônica.                                                                                                                                                                      |
| <b>MCF:</b>    | Micose Fungoide                                                                                                                                                                                 |
| <b>MCL-1:</b>  | Myeloid-Cell Lymphoma 1, proteína anti-apoptótica, descrita originariamente a partir de linhagens celulares mielóides.                                                                          |
| <b>MYC:</b>    | proteína envolvida em processos de regulação do ciclo celular, seu gene encontra-se mutado em muitos linfomas.                                                                                  |
| <b>NK:</b>     | Natural Killer, células do sistema imune envolvidas no processo de reconhecimento e destruição de células neoplásicas.                                                                          |
| <b>RAF-1:</b>  | quinase que interage com a proteína RAS.                                                                                                                                                        |
| <b>RAS:</b>    | Rous Avian Sarcoma, proteína envolvida em processos de sinalização da regulação do ciclo celular. Seu gene quando alterado pode se tornar oncogênico, processo que ocorre em muitas neoplasias. |

**RC:** remissão completa.

**t(14;18):** translocação recíproca envolvendo os cromossomos humanos 14 e 18, caracterizada inicialmente em Linfomas Foliculares.

**TM:** Trans Membrane, domínio trans-membrânico de uma proteína.

**LCM:** Linfoma de Células do Manto

## *Resumo*

---

Os Linfomas Não Hodgkin (LNH) são neoplasias originárias de linfócitos B e/ou T. A classificação histológica dessas doenças é complexa, sendo que há uma tendência em se agrupar os diferentes subtipos nas categorias de baixo, intermediário ou alto grau de malignidade segundo critérios clínicos.

A proteína BCL-2 foi descoberta a partir de linfomas foliculares (baixo grau de malignidade) que apresentam a translocação t(14;18) a qual aproxima sequências promotoras do gene de cadeias pesadas de imunoglobulinas (*IgH*) ao gene de *bcl-2* (B-Cell Lymphoma 2), tornando-a superexpressa nesses tumores. A proteína BCL-2 está envolvida na resistência a diversos agentes quimioterápicos e na regulação de apoptose.

Sabe-se que células de vida longa em nosso organismo, como os linfócitos B de memória, neurônios, células que margeiam membranas basais, etc, apresentam *bcl-2* superexpresso. Acredita-se que falhas no sistema de recombinação homóloga, no período em que a expressão de *bcl-2* deve ser ativada em linfócitos de memória, sejam responsáveis tanto pela desregulação da apoptose e ciclo celular nos LNH, e ainda um passo inicial para a tumorigênese.

Nós analisamos a expressão de algumas proteínas da família BCL-2, pró (BAX e BAK) ou anti-apoptóticas (BCL-2 e MCL-1) por imunohistoquímica em lâminas de tecido tumoral obtidas de uma série histórica de 128 casos de LNH atendidos no Hospital de Clínicas da UNICAMP com graus de malignidade baixo, intermediário e alto.

Nossos resultados mostraram expressão da proteína BCL-2 em cerca de 55% dos casos nos LNH de alto grau, 85% nos LNH de grau intermediário e 90% nos LNH de baixo grau de malignidade.

Houve uma maior percentagem de células positivas para a proteína BAX, sendo 94% para os casos de LNH de alto grau, 100% nos LNH de grau intermediário e 74% nos casos de LNH de baixo grau de malignidade.

Para a proteína BAK, observamos 88% de positividade para os casos de LNH de alto grau, 75% de positividade para os casos de LNH de grau intermediário e 95% nos LNH de baixo grau. A proteína MCL-1 apresentou os mais altos níveis de detecção, sendo que de

todos os casos estudados, somente 3 casos de LNH de alto grau de malignidade foram negativos.

Neste trabalho observamos a correlação entre os níveis de expressão das proteínas MCL-1 e BAX ( $p=0,0028$ ) e uma tendência de correlação entre BAX e BAK ( $p=0,063$ ) nos LNH de alto grau de malignidade.

A expressão de BCL-2 foi significativamente maior nos LNH de graus baixo e intermediário quando comparados aos LNH de alto grau de malignidade ( $\chi^2=16,294$  e  $p=0,001$ ). A proteína BAX apresentou níveis de expressão semelhantes nos LNH de graus intermediário e alto, mas significativamente menor nos LNH de baixo grau de malignidade ( $p=0,02$ ).

Os dados inéditos deste trabalho, como a expressão aumentada de BAK e MCL-1 em LNH, associados a dados já descritos na literatura como o aumento de expressão de BCL-2 e BAX, sugerem que a expressão aumentada de proteínas reguladoras da apoptose devem estar implicadas na etiopatogenia e fisiopatologia dessas neoplasias. Estudos de regulação gênica dessas proteínas poderão indicar diferenças entre elementos responsivos desses homólogos, relacionados ao controle da apoptose.

Palavras chave: BCL-2, BAX, BAK, MCL-1, LNH, apoptose, IHQ.

## *Summary*

---

Non Hodgkin's Lymphomas (NHL) are neoplasms originated from B and/or T lymphocytes. These lymphomas can be classified into categories named low, intermediate or high malignant risk, according to clinical criteria.

The BCL-2 protein was described in follicular lymphomas (low grade of malignancy) that harbor the t(14;18) translocation. This translocation brings the promoter sequences from immunoglobulin Heavy (*IgH*) chains gene near to *bcl-2* (B-Cell Lymphoma 2) gene, turning it overexpressed in these tumours. The BCL-2 protein is important in the resistance to many chemotherapeutic agents and regulation of apoptotic mechanism.

It has been observed that long lived cells as memory B cells, neurons, stem-cells at the edge of basement membranes, etc, overexpress *bcl-2*. Non Hodgkin's Lymphomas present alterations on apoptosis and cell cycle, probably due to defects in the homologous recombination system, by the time *bcl-2* is expressed in memory cells. This could be an initial step to tumorigenesis.

The aim of our study was to analyse by immunohistochemical techniques the distribution of pro (BAX and BAK) and anti (BCL-2 and MCL-1) apoptotic proteins of the BCL-2's family on tissue slides obtained from 128 cases of NHL seen at Hospital de Clinicas UNICAMP.

We found BCL-2 protein expression in 55% of the NHL high grade, 85% of the NHL intermediate grade and 90% of the NHL low grade. BAX protein was highly expressed in all categories: 94% at high grade NHL, 100% of the intermediate grade and 74% of the low grade NHL. BAK protein showed expression in 88% of the NHL high grade, 75% in NHL intermediate grade and 95% in NHL low grade. MCL-1 protein had the highest levels of expression, being positive in all cases studied, except three cases of NHL high grade.

In this study, we found correlation between MCL-1 and BAX expression levels ( $p=0,0028$ ) and a tendency of correlation between BAX and BAK ( $p=0,063$ ) in high grade NHL tumours.

BCL-2 expression was significantly higher in low and intermediate grade malignancy tumours compared to expression levels of this protein in NHL of high grade malignancy ( $\chi^2=16,294$  and  $p=0,001$ ). BAX protein expression levels were similar in NHL of intermediate and high grade tumours but significantly lower in low grade malignancy tumours ( $p=0,02$ ).

The inedited data of this study as high BAK and MCL-1 expression in NHL, associated to the already published high expression of BAX in high and intermediate grade NHL and BCL-2 in low and intermediate grades NHL, in agreement with the literature, suggest that apoptotic regulating proteins may be implicated in etiopathogeny and physiopathology in these diseases. Studies on genetic regulation of these proteins may indicate differences between homologous responsive elements altering apoptosis control.

Key words: BCL-2, BAX, BAK, MCL-1, NHL, apoptosis, PCD, IHC.

## ***Introdução***

---

Apesar do estudo do câncer remontar épocas tão longínquas quanto das antigas observações egípcias gravadas no papiro de Ebers (acredita-se que date de 1600 A.C.), apenas nas últimas décadas progressos significantes têm sido feitos no entendimento da etiopatogenia dos tumores malignos. Grande parte desses avanços se deve às técnicas de imuno-histoquímica, citometria de fluxo, aplicação de genética e técnicas moleculares para dissecar genes e seu envolvimento nos complexos fenômenos do controle do crescimento celular e oncogênese (Leonard et al, 1995).

A neoplasia maligna pode ser definida como o acúmulo de células anormais que pode levar à perda da homeostase de tecidos afetados ou do indivíduo como um todo. Esse acúmulo de células pode advir de uma perda no controle da proliferação devido a mudanças na taxa de divisão celular, escape ou retardo da senescência ou da morte celular programada ou apoptose (PCD), falha na diferenciação celular (transformação maligna), entre outros (Fung et al, 1993).

Genes supressores de tumores codificam proteínas que coletivamente têm o papel de evitar o acúmulo de mutações no genoma da célula e a replicação de células alteradas. Por outro lado, oncogenes codificam proteínas que controlam diretamente a proliferação celular e quando têm sua expressão alterada estimulam o crescimento desordenado de células malignas. Em geral, mutações estão presentes nas neoplasias tanto em genes supressores de tumores, quanto em oncogenes. Encontram-se identificados cerca de dez genes supressores de tumores e cem oncogenes humanos envolvidos em processos de malignização (Simpson, 1998).

Atualmente acredita-se que os cânceres sejam o resultado de acúmulo sequencial de mutações, levando à progressão de lesões alteradas mas não malignas (displasias e metaplasias) até tumores metastáticos (Fearon and Vogelstein, 1990). Neste contexto, mudanças genéticas que levam à ativação irreversível de vias regulatórias de crescimento seriam também premissas para mutações subsequentes em genes envolvidos com alterações de adesão celular (CAM = Cell Adhesion Molecules), estrutura do citoesqueleto (microtúbulos e microfilamentos) ou o aumento da produção de proteases.

A perda de adesão célula-célula ou célula-substrato poderia, dessa forma, resultar em apoptose. Similarmente, expressão aumentada de proteases que normalmente degradariam tecidos normais, induzindo regressão e apoptose, em células neoplásicas poderiam estar relacionadas com um aumento de invasão tecidual e metástases (Schwartz e Ingber, 1994).

## **LINFOMAS NÃO HODGKIN**

Os Linfomas Não Hodgkin (LNH) se incluem em uma categoria de neoplasias que corresponde a cerca de 7% de todos os cânceres. A incidência de linfomas não Hodgkin (LNH) tem aumentado de 3 a 4% ao ano desde o início dos anos 70 (Marra e cols, 1997) com as taxas de mortalidade aumentando em 2% ao ano; somente as taxas de câncer de pulmão entre mulheres e melanoma cutâneo têm aumentado mais rapidamente (Devesa e Fears, 1992).

As causas precisas desse aumento de incidência permanecem desconhecidas, apesar de vários fatores de risco se mostrarem associados à etiologia dos LNH. Títulos elevados de Epstein Barr Virus (EBV) assim como integração clonal de EBV ao DNA indicam um possível envolvimento patogênico em muitos desses casos. Também linfomas policlonais associados a casos EBV negativos têm sido relatados em LNH relacionados à AIDS.

Pacientes submetidos a transplante de órgãos recebendo terapia de imunossupressão têm um risco estimado entre 26 a 46 vezes maior para LNH. Também uma imunossupressão subclínica associada à idade tem sido relacionada ao aumento de taxas de LNH em populações de maior faixa etária. Predisposição familiar para LNH parece ser rara, apesar de parentesco entre indivíduos portadores de síndromes de instabilidade genética afetados por LNH, estar sendo descrita.

Certos tipos de exposição ambiental ou ocupacional parecem ser fatores importantes no aumento de incidência de LNH e são o foco de estudos epidemiológicos em andamento. Por exemplo, um risco aumentado de 2 a 8 vezes tem sido observado em trabalhadores rurais expostos a pesticidas, especialmente herbicidas baseados em ácido fenoxiacético

### Introdução

como o 2,4-D (dioxina) e compostos relacionados. Aparentemente, a exposição a pesticidas determina um aumento da instabilidade genômica (Fisher et al, 1993).

Os Linfomas Não Hodgkin (LNH) representam um grupo muito heterogêneo de doenças linfóides originárias de células B ou T, ou muito raramente de histiócitos verdadeiros e agrupam-se em baixo, intermediário e alto grau de malignidade para os subtipos histológicos.

A tendência mais atual com relação à classificação de subtipos de LNH, visando melhor padronização de tratamento, consiste em agrupar linfomas de baixo e intermediário graus de malignidade em linfomas indolentes e os linfomas de alto grau de malignidade em agressivos. A terapêutica adotada depende do subtipo tumoral e estadiamento clínico do paciente. Muitos desses subtipos são sensíveis à quimio e radioterapia, podendo-se alcançar até cerca de 80% de remissão completa da doença.

Os LNH de baixo grau de malignidade são, portanto, doenças que se caracterizam por serem indolentes, com acúmulo de células de longa sobrevida, talvez associadas com o aumento de expressão de BCL-2. No tratamento, uma abordagem de observação e espera pode ser inicialmente justificada até a progressão da doença. Apesar de muitos avanços nos últimos 20 anos, as opções terapêuticas para este grupo de pacientes não têm apresentado uma melhora significativa.

Remissões com longa duração podem ser obtidas em 30 a 40% dos casos. Apesar disso, muitos pacientes podem finalmente morrer dessa doença. A intensificação do tratamento quimioterápico em pacientes de alto risco parece produzir resultados superiores, mas está associada a um aumento da toxicidade (Gianni et al, 1994). Este é um problema particularmente importante em pacientes idosos.

Grande parte dos pacientes com recidiva de LNH não alcançam a cura com tratamento convencional. Quimioterapia de altas doses seguida de transplante autólogo de medula óssea ou de células precursoras de sangue periférico têm sido usados para tratar pacientes com recidivas de LNH. Entretanto, somente uma minoria de pacientes com idade inferior a 60 anos e condições orgânicas e hematológicas suficientes, são elegíveis para esse tipo de tratamento.

A principal causa de recidiva tumoral em pacientes portadores de neoplasias de células B e LNH agressivo parece ser o desenvolvimento ou a seleção de novos clones de células neoplásicas resistentes à quimioterapia, aliado ao decréscimo da tolerância do hospedeiro à terapia citotóxica.

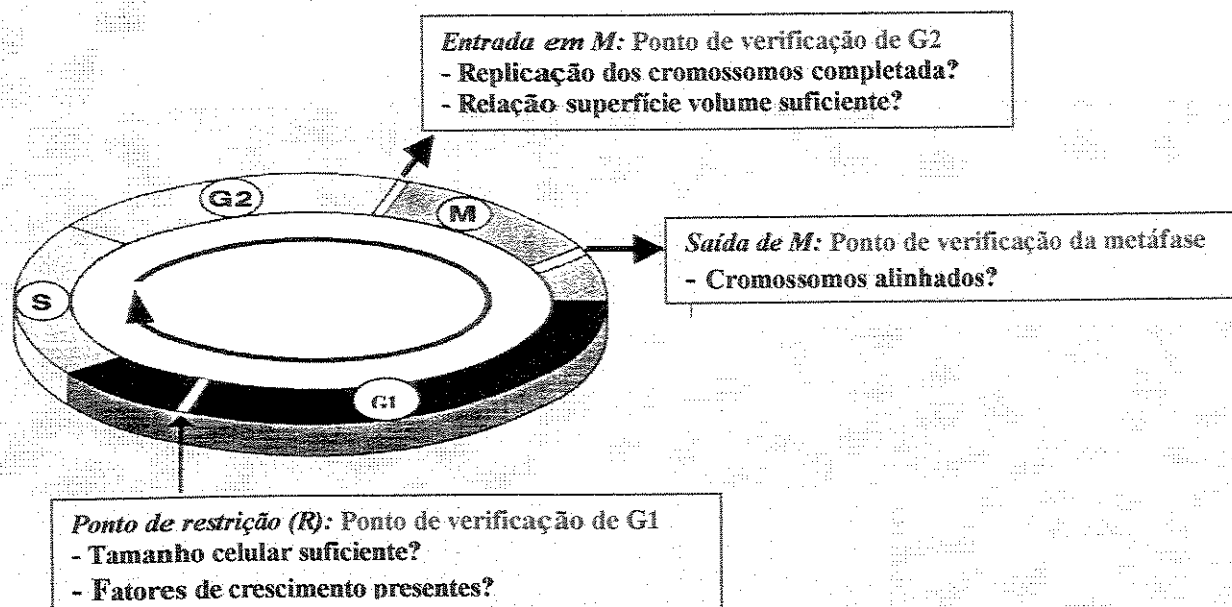
Dentre as inúmeras possibilidades terapêuticas em estudo, podemos citar a imunoterapia, utilizando anticorpos monoclonais nativos; imunotoxinas; radioimunoconjugados; anticorpos biespecíficos estão em fase de teste clínico e novos agentes antineoplásicos, assim como citoprotetores e estimuladores da função imune (células NK = natural killer). Com isso, podemos vislumbrar melhor prognóstico para os portadores dessas doenças num futuro próximo.

## **A PROTEÍNA BCL-2**

O gene *bcl-2* (B-Cell-Lymphoma 2) foi descrito inicialmente a partir da translocação t(14;18) que caracteriza cerca de 85% dos linfomas foliculares e cerca de 30% dos linfomas difusos de grandes células. Nessa translocação o segmento 18q21 é justaposto a alguns loci de promotores da cadeia pesada de imunoglobulinas localizado em 14q32, levando à produção de altos níveis de RNAs quiméricos e a superexpressão da proteína BCL-2, de peso molecular 26kDa.

A homeostase de tecidos normais se faz através do controle entre a proliferação celular e a morte celular (Blandino e Strano, 1997), sendo assim, um dos efeitos de muitas drogas anti-câncer é levar à destruição das células neoplásicas através da apoptose, durante os pontos de checagem, entre as fases do ciclo de divisão celular, uma vez que estas se encontram geralmente com altas taxas proliferativas (Reed, 1995). Os danos ao DNA (alquilações, "nicks" e quebras, intercalações, inibição da topo isomerase, etc.) das células alvo induzidos pelos quimioterápicos, estimularia a entrada das células em apoptose. Assim, as lesões no DNA deveriam interromper o ciclo celular na fase G1, através da proteína p53. Em sendo esses danos irreparáveis, a mesma proteína p53 promoveria a entrada dessas células em apoptose ou PCD (morte celular programada), mecanismo "econômico" de manutenção da integridade do genoma celular (Figura 1).

Esse processo pode ser bloqueado em células neoplásicas expressando altos níveis de BCL-2.



**Figura 1:** Esquema do ciclo celular em suas diferentes fases e os pontos de verificação da divisão celular com os respectivos fatores a serem controlados pela célula a fim de que a mesma possa progredir no ciclo ou entrar em apoptose.

Recentemente, vários genes envolvidos no controle da apoptose têm sido identificados, desde nemátodos até humanos (Stewart, 1994; White, 1996).

A descoberta de que *bcl-2*, diferentemente de outros oncogenes previamente estudados, funcionaria na prevenção da morte celular programada (Thompson, 1995), ao invés de promover a proliferação celular, estabeleceu toda uma nova classe de oncogenes envolvidos na regulação do mecanismo apoptótico (Korsmeyer, 1992; Yang e Korsmeyer, 1996).

Podemos destacar a expressão de BCL-2 numa variedade de tipos celulares, particularmente células de “vida-longa”, tais como linfócitos de memória e alguns tipos de neurônios. Um de seus efeitos é a manutenção de células precursoras que margeiam a membrana basal de vários epitélios, incluindo pele, cólon e próstata (Hockenbery et al, 1991).

Foi observado que a superexpressão de *bcl-2* aumenta a porcentagem de células viáveis de algumas linhagens celulares dependentes de citocinas mesmo após a retirada desse estímulo, tais como as interleucinas 2, 4, 6, além de fator estimulante de colônias para macrófagos e granulócitos. (Nunez et al, 1990). Diferentes fatores de crescimento: IL2, IL4 e IL7 para células T, GM-CSF e IL3 para células mielóides e eritropoietina para a linhagem eritróide, têm sido demonstrados como promotores de sobrevivência, entretanto a expressão de *bcl-2* não parece ser afetada por tais fatores (Harrington et al, 1994).

Hibridomas de células-T transfectados com *bcl-2* e timócitos e células-T periféricas de camundongos transgênicos com superexpressão de *bcl-2* se tornaram protegidos contra vários tipos de agentes apoptóticos, tais como glucocorticóides, radiação gama, ésteres de forbol, ionomicina e ligação cruzada de moléculas de superfície por anti-CD3 (Yang e Korsmeyer, 1996).

Os efeitos "in vivo" de BCL-2 foram inicialmente investigados usando-se camundongos transgênicos com superexpressão de *bcl-2* em células B ou células T. Quando o *bcl-2* transgênico é expresso em linfócitos B, os camundongos desenvolvem hiperplasia folicular, algumas das quais progridem para linfoma monoclonal de alto grau (Mc Donnell e Korsmeyer, 1991). Por esse experimento, um longo tempo de latência entre

### Introdução

a progressão de hiperplasia policlonal para malignidade monoclonal parece compatível com a hipótese de que outros eventos oncogênicos em adição à superexpressão de *bcl-2* sejam necessários para a formação tumoral.

Em linfomas de camundongos transgênicos *bcl-2-Ig*, um segundo evento comum foi descrito como sendo a translocação do oncogene *Myc* (Marin et al, 1995). A progressão para linfoma nesses camundongos *bcl-2*-transgênicos, constitui evidência "in vivo" de que *t(14;18)* e superexpressão de *bcl-2* desempenham um papel primário na oncogênese. Esses experimentos com camundongos transgênicos demonstraram que a morte celular é um processo muito controlado na diferenciação linfóide e a perda desse controle parece ser tumorigênica. Mutações deletérias que poderiam resultar em morte celular poderiam ser mantidas no genoma quando a apoptose fosse inibida.

Estruturalmente BCL-2 compartilha uma homologia limitada com a proteína viral E1B-19kD e pode substituí-la na habilidade de inibir morte celular induzida por E1A (Rao et al, 1992). Também foi relacionada com a inibição de apoptose causada por proteínas de outros vírus, tais como: HTLV-1 (human T-cell lymphotropic virus type 1) e Sindbis alphavirus, permitindo o estabelecimento de infecção viral persistente (Yamada et al, 1994; Levine et al, 1993).

Numerosos exemplos mostram que a superexpressão de *bcl-2* pode inibir a apoptose causada por estímulos tóxicos externos, tais como: drogas quimioterapêuticas (inibidores de síntese de DNA, agentes alquilantes, inibidores de microtúbulos, antimetabólitos), stress oxidativo ( $H_2O_2$ , menadiona, peroxidação membranar) e outros como TGF- $\beta$ , staurosporina e perda de matriz extracelular (Miyashita e Reed, 1992; Desoize, 1994; Lowe et al, 1993; Reed et al, 1994).

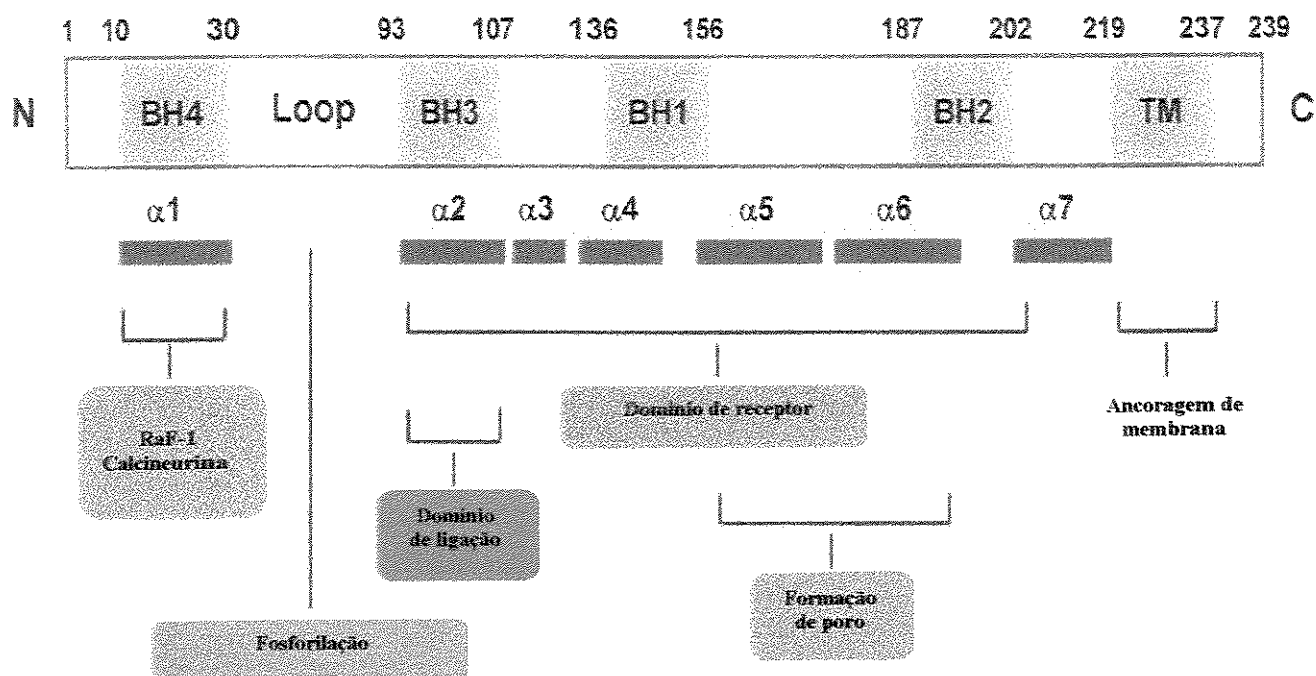
Apesar de numerosos exemplos positivos, BCL-2 não previne toda morte celular. BCL-2 não tem um efeito substancial sobre a seleção negativa de timócitos nem sobre os alvos das células -T-citotóxicas. A superexpressão de *bcl-2* não previne vários exemplos de morte celular, então é teoricamente possível que haja mais de uma via distal apoptótica, e essa proteína agiria após a convergência de muitos sinais no caminho apoptótico, como é demonstrado para outros membros da família BCL-2 (Vaux et al, 1992).

Observações têm sido relatadas no sentido de seu efeito anti-apoptótico ser, algumas vezes, dose relacionado. Estudos de fracionamento celular, imunofluorescência e microscopia confocal, usando anti-BCL-2 indicaram que esta seja uma proteína de membranas intracelulares, cuja distribuição varia de acordo com o tipo celular, o mesmo ocorrendo para outros membros da família (Monaghan et al, 1992).

BCL-2 tem sido mais convincentemente localizada na membrana externa mitocondrial, principalmente nos pontos onde esta se encontra com a membrana interna mitocondrial, seu sítio preferencial nas células hematopoiéticas, assim como no retículo endoplasmático liso e na membrana perinuclear (Krajewski et al, 1993).

A completa atividade de BCL-2 depende de sua localização na membrana subcelular. Apesar de muitas características da apoptose serem observadas no núcleo das células (condensação da cromatina, degradação do DNA mediada por endonucleases em mono ou oligômeros a cada cerca de 200 pares de bases e clivagem característica de proteínas nucleares), tem ficado claro que estruturas não nucleares devem estar envolvidas no controle apoptótico.

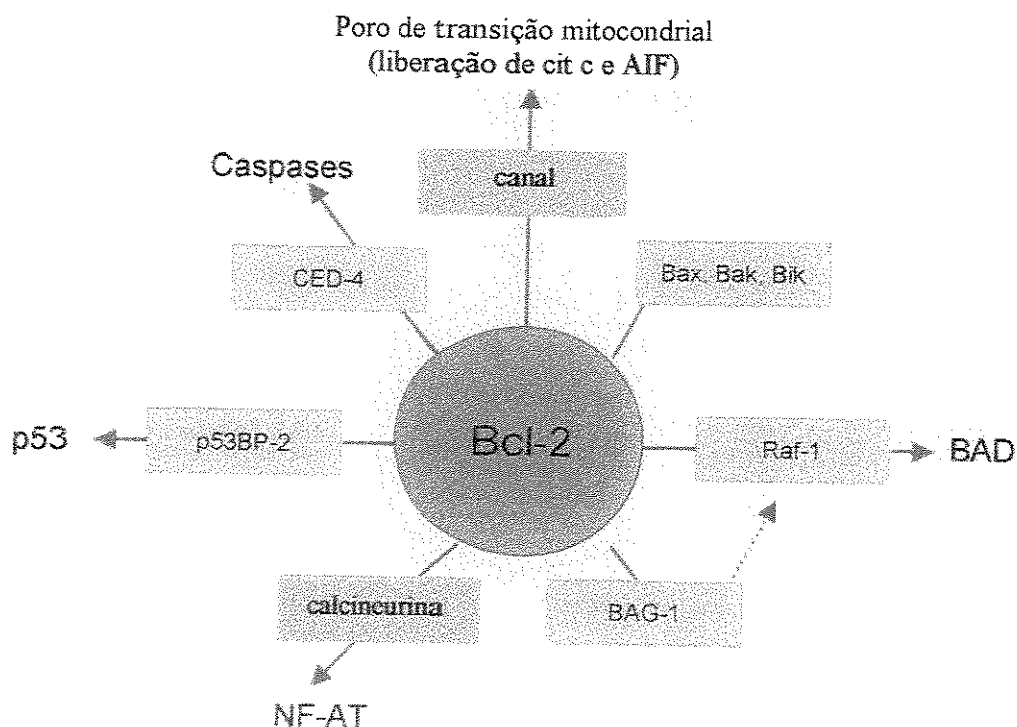
Estudos *in vitro* com mitocôndrias purificadas demonstraram que a porção carboxi-terminal de BCL-2 funciona como uma sequência-âncora responsável pela sua localização e inserção na membrana mitocondrial externa, e pelo domínio trans-membrana (TM domain) (Nguyen et al, 1993). Isso expõe muito da proteína ao citossol, onde permaneceria sensível à digestão por proteases. BCL-2 destituída da sequência de ancoragem se torna apenas parcialmente funcional na proteção contra apoptose, entretanto a porção truncada está ainda ligada ao seu par associado de heterodimerização, a proteína BAX (Jacobson et al, 1993). (Figura 2).



**Figura 2:** Esquema linear da proteína BCL-2 humana mostrando os domínios de homologia de BCL-2 (BH), os segmentos em  $\alpha$ -hélice e o domínio transmembrânico (TM). A ligação de Raf-1 e calcineurina se dá no segmento BH4. Uma alça flexível entre a primeira e segunda  $\alpha$ -hélices é necessária para fosforilação de BCL-2 e pode representar um domínio de regulação negativa. O domínio de ligação BH3 tem papel na dimerização de membros da família e a combinação de BH3 com BH1 e BH2 parece estar envolvida na formação de uma fenda hidrofóbica onde BH3 se insere. A quinta e sexta  $\alpha$ -hélices parecem estar envolvidas na formação de canais, atravessando a bicamada lipídica. (Adaptado de Reed, 1997)

A função de BCL-2 não é dependente da cadeia de fosforilação oxidativa e transporte de elétrons, estímulo conhecido por sua capacidade de formar o poro de transição de permeabilidade (PT), como foi demonstrado por sua habilidade de inibir a apoptose em células sem DNA mitocondrial e incapazes de transportar elétrons (Hockenbery et al, 1993).

Indutores químicos da abertura do megaporo mitocondrial (PT) podem induzir mitocôndrias normais e saudáveis a liberar fatores que resultam em destruição nuclear semelhante à observada em apoptose, tais como o AIF (apoptosis induction factor) (Zamzami et al, 1996). Além do mais, liberação do citocromo “c” da mitocôndria para o citoplasma ocorre durante a apoptose e promove ativação de proteases (caspases) da família de enzimas beta-conversoras de interleucina 1 (Liu et al, 1996) (Figura 3.)



**Figura 3:** Esquema da atividade multifuncional da proteína BCL-2. Além da capacidade de formar canais transmembrânicos que podem influir direta ou indiretamente na formação do megaporo mitocondrial ou liberação do citocromo-c e fator indutor de apoptose (AIF) da mitocôndria, BCL-2 ou BCL-XL também podem se ligar a várias outras proteínas envolvidas na regulação da morte celular. (Adaptado de Reed, 1997).

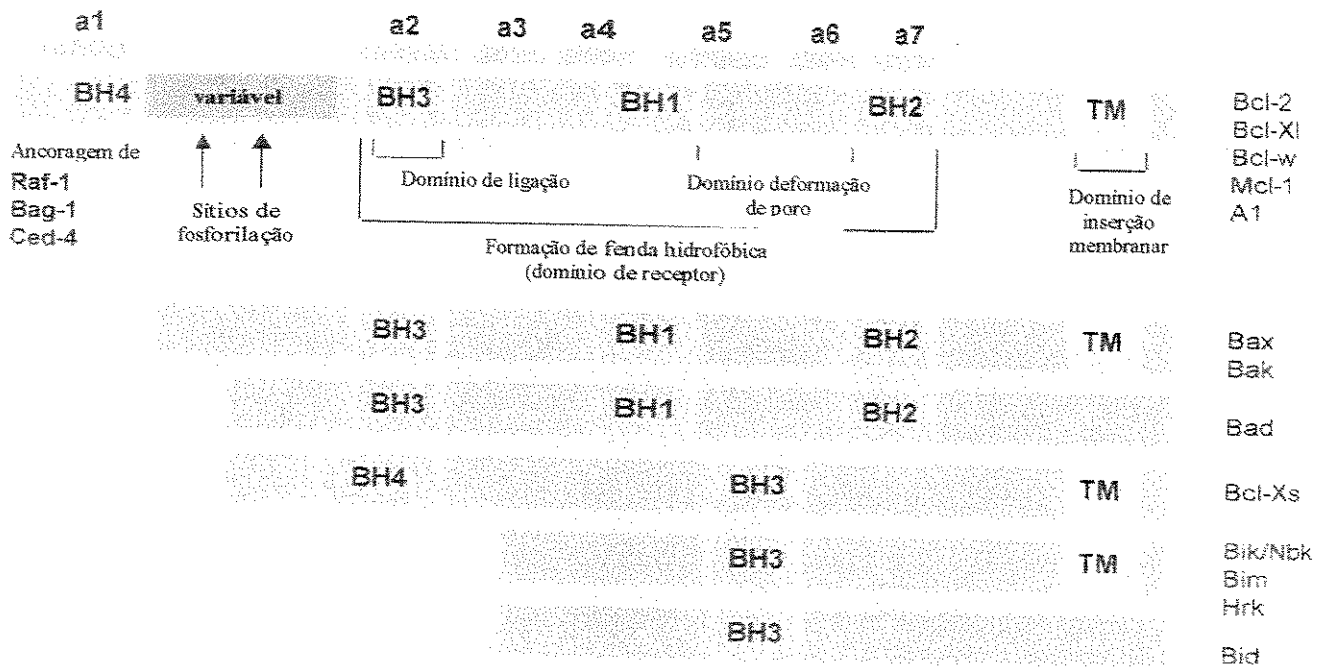
A BCL-2 localizada no retículo endoplasmático pode estar envolvida na homeostase de  $\text{Ca}^{++}$ . Esse íon parece estar envolvido na apoptose, pois certas fragmentações internucleossomais de DNA dependem desse cátion e ionóforos de Ca e ionomicina induzem apoptose em linfócitos. Estudos usando thapsigargina, um inibidor de bomba de  $\text{Ca}^{++}$  associada ao retículo endoplasmático, indicaram que a apoptose está associada com um efluxo de  $\text{Ca}^{++}$  para o citoplasma e BCL-2 pode bloquear esse efluxo através da membrana do retículo endoplasmático (Lam et al, 1994; Baffy et al, 1993).

## **OUTRAS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA BCL-2**

A família de genes relacionados a bcl-2 tem crescido e assumido grande importância no estudo da viabilidade celular nos últimos tempos e assim várias proteínas da família BCL-2 têm sido descritas. Algumas com funções pró (BAX, BAK, BCL-XS, entre outras) ou anti-apoptóticas (BCL-XL, MCL-1, etc). Esta família de proteínas possui grande conservação filogenética em domínios de ancoragem de membrana, resíduos fosforiláveis, domínios em alça (loop-domains) e regiões de homologia de ligação (Binding Homology BH1, BH2, BH3, BH4) (Figura 4).

Acredita-se que durante o processo evolutivo essas proteínas tornaram-se específicas para determinados tipos celulares, com expressão diferenciada em diversas fases da embriogênese e por toda a vida dos indivíduos. A identificação de proteínas homólogas ao BCL-2, algumas das quais se ligam a ela, sugere, pelo menos em parte, uma interação proteína-proteína. O primeiro desses homólogos, BAX, foi identificado por coimunoprecipitação com a proteína BCL-2. BAX é uma proteína de 21kD que compartilha homologia com BCL-2 principalmente em dois domínios, BH1 e BH2.

## Introdução



**Figura 4:** Esquema bidimensional apresentando relações estruturais e funcionais entre membros da família BCL-2. Domínios estruturais para cada membro são mostrados e podem ter algumas variações entre si. Pode-se observar que algumas regiões de homologia (BH1 a BH4) assim como sequências de inserção de membrana C-terminais estão ausentes em alguns membros. (Adaptado de Kroemer, 1997).

A proteína BAX forma dímeros e também se associa com BCL-2 formando heterodímeros. Quando *bax* foi superexpresso em células, a apoptose em resposta a um sinal de morte foi acelerada, designando a proteína como pró-apoptótica. Quando *bcl-2* foi superexpresso no mesmo sistema, dimerizou com BAX e a morte celular foi suprimida. Acredita-se então que a taxa de BCL-2 em relação a BAX determine a quantidade de heterodímeros BCL-2/BAX versus homodímeros BAX/BAX e isso determinaria a suscetibilidade da célula à morte por apoptose (Oltvai et al, 1993; e Yin et al, 1994).

O gene *bax* é bastante expresso em vários tecidos, incluindo alguns cujas células podem morrer durante o processo de maturação do órgão (Krajewski et al, 1994). Recentemente foi descrito que a proteína p53 ativaria a transcrição simultânea do gene *bax* ligando-se à região de consenso deste e o aumento de seu dímero com BCL-2 em células

normais, sendo então este um dos mecanismos pelos quais p53 ativaria a apoptose. Quando há superexpressão do gene *bcl-2*, haveria maior composição de homodímeros dessa proteína favorecendo a sobrevivência de células mutadas (Selvakumaran et al, 1994; Miyashita et al, 1994).

Um outro homólogo cuja função é similar a BCL-2 é a proteína BCL-X, que foi clonada por hibridização de baixa estringência, usando-se o gene *bcl-2* como sonda. BCL-X mostra 44% de homologia de amino-ácidos com BCL-2.

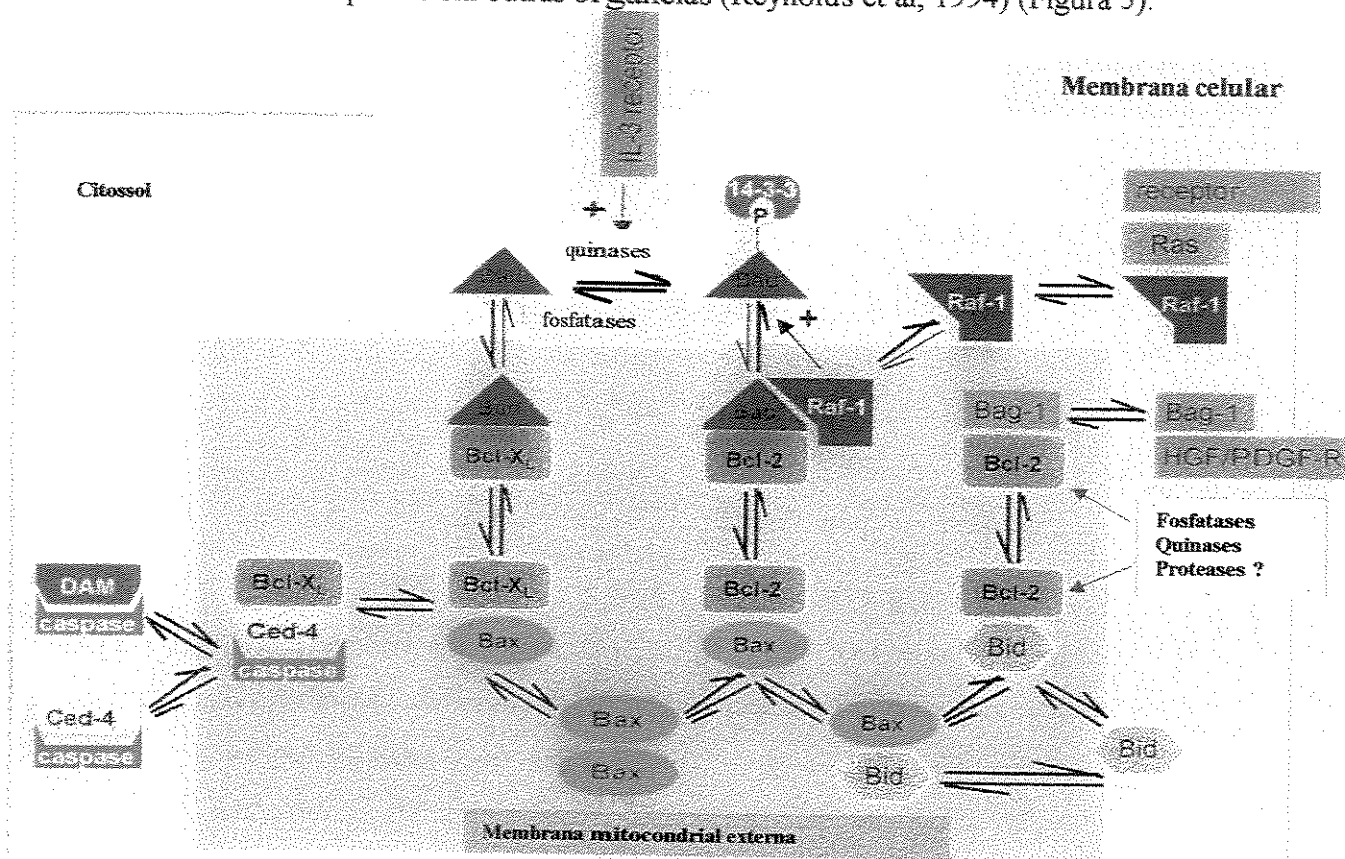
O produto gênico de *bcl-x* existe em duas formas: L=large, S=small. BCL-XL, que codifica 233 amino-ácidos e contém os domínios altamente conservados BH1 e BH2 (domínios anti-apoptóticos) e uma forma com "splicing" alternativo de seu mRNA, BCL-XS, que perde uma região referente a 63 amino-ácidos, compreendendo os domínios BH1 e BH2, mas mantendo BH3 (pró-apoptótico).

BCL-XL, similarmente a BCL-2, inibe apoptose em muitos ensaios. BCL-XS, por outro lado contraria o efeito de BCL-XL e BCL-2, por apresentar o domínio BH3, comum a essas três proteínas e relacionado com a dimerização de proteínas favoráveis à entrada em apoptose (Boise et al, 1993; Chao et al, 1995). BCL-XL pode ainda heterodimerizar com BAX, tendo o mesmo efeito de BCL-2 (Sedlak et al, 1995). Os padrões de expressão sugerem que BCL-2 possa ser mais importante para manter a homeostase de células-T latentes e BCL-XL ter maior envolvimento na pós-ativação de decisões de sobrevivência, ou seja, a jusante de BCL-2 (Gonzalez-Garcia, 1994).

A expressão de BCL-XL é notadamente alta em cérebros de adultos (Krajewski et al, 1994). Em um estudo com uma linhagem celular superexpressando o gene *mdr-1* (multiple drug resistance 1), observou-se um aumento do produto do gene *bcl-x<sub>L</sub>*, estando essas células também resistentes à apoptose induzida por radiação gama (Datta et al, 1995).

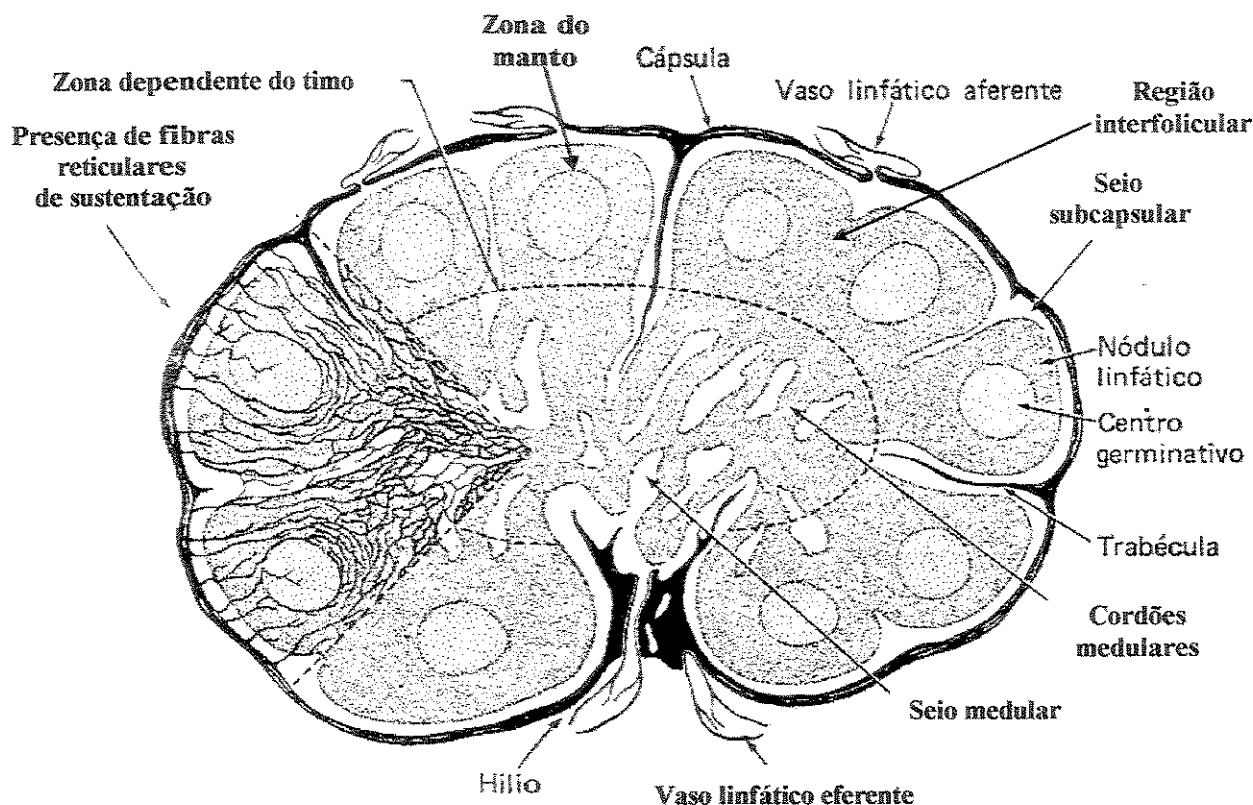
MCL-1 é uma proteína com função anti-apoptótica e se apresenta aumentada nas linhagens mielóides precursoras em diferenciação na medula óssea e linfócitos de sangue periférico (Craig et al, 1994; Krajewski et al, 1995; Zhou et al, 1997; 1998). MCL-1 tem sido descrito como também capaz de dimerizar com BAX em algumas linhagens celulares, no entanto essa proteína exibe dois domínios PEST que parecem relacionados com a

indução de rápida degradação, ao contrário de BCL-2 (Bodrug et al, 1995). Essa proteína apresenta-se muitas vezes próxima a BCL-2 nos diferentes compartimentos celulares com membrana e também aparece em outras organelas (Reynolds et al, 1994) (Figura 5).



**Figura 5:** Formação de complexos funcionais entre membros da família BCL-2 e outras moléculas. Membros pró-apoptóticos (verde) ou anti-apoptóticos (alaranjado) atuam ao nível da membrana mitocondrial externa. A abundância relativa entre membros pró ou anti-apoptóticos parece determinar a susceptibilidade da célula à apoptose. Os membros da família interagem entre si e até com homólogos conservados filogeneticamente (CED-4), ou proteínas inibitórias de apoptose não relacionadas (BAG-1 e RAF-1). Também serina ou treonina quinases agem sobre sítios específicos em BAD ou BCL-2. Receptores de fatores de crescimento podem modular a composição de complexos com BCL-2 de três diferentes maneiras: (1) regulação da atividade de quinases (ex: receptor de interleucina-3), (2) regulação da distribuição de RAF-1 via RAS, ou (3) ligação de BAG-1 quando da retirada de fator de crescimento de hepatócitos ou fator de crescimento derivado de plaquetas. O complexo BCL-2 tem efeitos em funções mitocondriais locais e pode neutralizar efeitos de morte como os de CED-4 (que interage com caspases). A sigla DAM representa moléculas adaptadoras de morte (exemplo FADD) que causam ativação de caspases. (Adaptado de Kroemer, 1997).

Nos linfonodos, estudos utilizando imunohistoquímica revelam expressão de MCL-1 no centro germinativo de linfócitos e em alguns linfócitos inter-foliculares, particularmente os que parecem estar ativados. Já a proteína BCL-2 se apresenta positiva nos linfócitos da zona do manto que representam a população de células B recirculantes relacionadas com a memória imunológica e que apresentam tempo de vida indeterminado por serem responsáveis pela resposta imune anamnésica (Figura 6). Esta proteína está também presente nos folículos neoplásicos, onde as células se tornam imortalizadas pela superexpressão de *bcl-2* (Krajewski et al, 1994).



**Figura 6:** Desenho esquemático de um gânglio linfático mostrando suas diferentes regiões e estruturas. Note os centros germinativos onde devem se encontrar as células dendríticas que parecem estar envolvidas na estimulação de processos de recombinação homóloga em linfócitos, processos esses que, quando mau-acabados podem ser responsáveis por alterações genéticas (ex.: translocações, deleções, mutações pontuais, etc) provavelmente envolvidas em processos iniciais de transformações malignas nessas células e frequentemente observados nas respectivas neoplasias.

A proteína BAD regula negativamente BCL-2 e BCL-XL e desloca BAX, por ligar-se mais fortemente a seus homólogos e a nível molecular não possui o domínio carboxi-terminal, sugerindo que esta não seja uma proteína transmembrânica (Gajewski e Thompson, 1996).

A proteína BCL-2 interage com produtos de outros oncogenes. Foi demonstrado que a sua expressão constitutiva inibe a apoptose induzida pela proteína MYC, permitindo a imortalização da célula por esse oncogene; dessa maneira a cooperação sinérgica entre oncogenes de classes diferentes favoreceria uma transformação (malignização celular) mais potente do que a ação de um único oncogene (Harrington et al, 1994).

Um outro membro dessa família é o gene *bak* que teria um efeito similar ao efeito do produto do gene *bax*, porém com preferência de dimerização com BCL-XL ao invés de BCL-2 que tem maior afinidade a BAX. Suas especificidades para tipos celulares também diferem.

A proteína BAK é expressa em epitélios complexos (nasofaringe, esôfago, cólon e bexiga) verificando-se níveis aumentados nas camadas mais voltadas para a luz, consistente com seu caráter pró-apoptótico. Nas linhagens mielóides de células hematopoiéticas a imunodeteção dessa proteína é maior em granulócitos bem diferenciados (Krajewski et al, 1996).

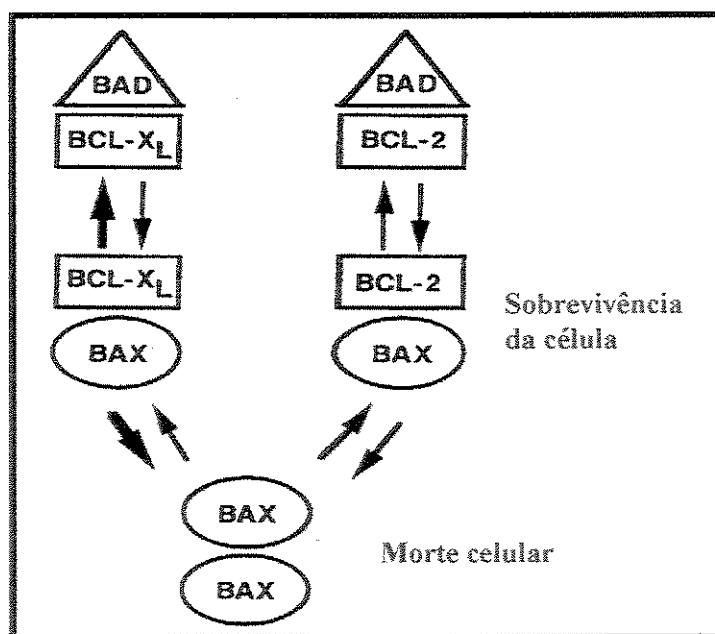
A relação entre a função de BCL-2 e as vias conhecidas de transdução de sinal mediadas por receptores não é clara, pois BCL-2 é fosforilado em resíduos de serina em resposta a vários estímulos. Apesar das funções dessa fosforilação serem controversas, várias observações sugerem que BCL-2 possa ser inativado por fosforilação. Células de linfoma folicular com a translocação t(14;18) não contém BCL-2 fosforilado (Haldar et al, 1995).

O tratamento de células com a droga quimioterapêutica Taxol ou o inibidor de fosfatase, ácido okadaico, induzem fosforilação de BCL-2 o que resulta em morte celular (Haldar et al, 1995; Haldar et al, 1997). Taxol agiria ativando a serina-treonina quinase Raf-1, que por sua vez ativaria Ras, promovendo a apoptose (Blagosklonny et al, 1995). Além disso, BCL-2 se apresenta fosforilado na linhagem de células pré-B WEHI-231, um

sistema onde BCL-2 não protege bem contra apoptose (May et al, 1994; Haldar et al, 1995; Chen e Faller, 1996).

Estudos com paclitaxel (análogo de Taxol) mostraram que a mesma estabiliza microtúbulos, impedindo sua despolimerização, o que leva a célula a um aprisionamento em G2-M com grumos de microtúbulos, ativação da quinase Raf-1 e fosforilação de BCL-2 que perderia sua função anti-apoptótica com consequente acúmulo de proteína BAX livre para formar homodímeros que levariam à morte celular (Blagosklonny et al, 1997).

De maneira contrária, a fosforilação da proteína BAD, também nos seus resíduos de serina, resultaria em sua ligação com a proteína 14-3-3, que interage com várias proteínas sinalizadoras (Gajewski and Thompson, 1996). A proteína 14-3-3 possuiria um “pocket” para associação com proteínas contendo resíduos de serina fosforiláveis presentes no citoplasma, assim impedindo que BAD se ligasse a BCL-XL na membrana mitocondrial, o que, nesse caso impediria a apoptose (Muslin et al, 1996) (Figura 7).



**Figura 7:** Efeito da proteína BAD como regulador negativo da apoptose. O aumento do número de moléculas de BAD desloca BAX da ligação com BCL-2 ou BCL-XL, substituindo-o (BAX) e fazendo com que esta se torne livre para homodimerizar e promover assim a apoptose. Fosforilações específicas das proteínas BCL-2 e BAD também interferem em suas funções.

O conhecimento da estrutura tridimensional da proteína BCL-XL auxiliou na compreensão da função de outras proteínas da família BCL-2. Essa estrutura revelou duas alfa-hélices centrais, rodeadas por cinco hélices anfipáticas, assim como 60 resíduos correspondentes a uma alça flexível. Essa conformação tridimensional tem homologia com os domínios de translocação de colicinas e da toxina diftérica. Este último domínio, ao dimerizar formaria um poro que seria regulado pelo pH. Por analogia, BCL-2 e BAX formariam póros seletivos, para íons ou para proteínas, respectivamente, envolvidos na homeostase de organelas celulares, principalmente a mitocôndria, protegendo a célula de mudanças eletroquímicas que ocorrem sob condições de estresse fisiológico.

Uma interação das proteínas da família BCL-2 com determinadas quinases (fosforilando sítios de serina) e proteinases (caspases), expondo sítios específicos ou inativando as proteínas com sua clivagem, parece formar o cenário para o controle da homeostase celular, daí surgindo opções várias para a entrada ou não, da célula em apoptose.

A análise da expressão das proteínas da família BCL-2 em neoplasias malignas tem sido objeto de estudo em várias populações, com resultados controversos. Entretanto, não há na literatura dados relativos à população brasileira. Até o momento, também não há dados na literatura sobre a expressão da proteína BAK em linfomas não Hodgkin. Assim, foi objetivo deste estudo analisar a expressão de proteínas da família BCL-2 em linfomas não Hodgkin numa população brasileira.

## ***Objetivos***

---

### Objetivos

O presente estudo teve o objetivo de analisar, pela técnica de Imunohistoquímica (IHQ), a expressão e distribuição de algumas proteínas envolvidas no processo de regulação de apoptose em Linfomas Não Hodgkin. As proteínas alvo foram BCL-2 e MCL-1 (anti-apoptóticas) e BAX e BAK (pró-apoptóticas), todas da família de BCL-2.

## *Casuística e Métodos*

---

## **Casuística**

Para este trabalho foi selecionado material de biópsia de 128 casos de Linfomas Não Hodgkin, de uma série histórica dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UNICAMP (1978 a 1998), emblocados em parafina, classificados segundo a classificação REAL e agrupados clinicamente em subtipos de malignidade.

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Foram considerados como baixo grau os casos de Leucemia Linfóide Crônica (LLC), Imunocitoma (IC), Micose Fungóide (MCF) e Linfoma de Células do Manto (LCM). Como grau intermediário, os Linfomas Foliculares (LF) e como alto grau, os Centroblasticos (CB), Imunoblasticos (IB), Angioimunoblasticos (AILD), Anaplásicos (ANAPL) e Granuloma de Linha Média (GLM), vide Anexos Tabela 7.

## **Métodos**

### **1. Silanização:**

A silanização das lâminas (recobrimento com uma camada finíssima de aderente organosilano) é a primeira etapa a ser cumprida e deve ser feita cuidadosamente para serem obtidos bons resultados em Imunohistoquímica. Após esta etapa, os cortes de tecido devem aderir a cada lâmina de maneira a não descolar durante as várias etapas subsequentes nas quais os mesmos são submetidos sucessivamente a variações de temperatura entre 15° a 130°C, pH 6,2 a 7,6, exposição a solventes orgânicos como xilol e diferentes concentrações de álcoois.

### **Protocolo de silanização:**

Inicialmente procede-se ao desengorduramento da superfície de cada lâmina com gaze embebida em álcool 70 (GL), posiciona-se as lâminas em berços histológicos, submergindo-os em solução de detergente neutro a 10% em água destilada deionizada quente, (entre 60° e 100°C “overnight”), a seguir enxágua-se com água corrente em

abundância e três vezes em água destilada deionizada. Em seguida imerge-se os berços em solução sulfocrômica por 40 minutos, e novamente enxágua-se em água corrente abundante, e três vezes em água destilada deionizada. Imerge-se então os berços em solução de HCl 1N por 40 minutos, e enxágua-se como descrito anteriormente. Imerge-se os berços em uma sequência de: álcool absoluto por 20 minutos, solução álcool absoluto-ácido acético 3:1 por 20 minutos. Seca-se as lâminas em estufa a 40°C e imerge-se cada berço 3 a 5 vezes em cubas contendo solução de organosilano a 2% em acetona. Deixa-se secar escorrendo em papel toalha por cerca de 10 a 60 segundos de maneira que se visualize uma opacidade sobre a lâmina que deve corresponder ao filme de silicone (organosilano = Sigmacote, MERCK). A seguir mergulha-se rapidamente os berços em duas cubas contendo acetona pura e em outras duas cubas contendo cerca de 1 litro de água destilada deionizada. Neste momento observar-se-ão bolhas grandes de água sobre as lâminas, devido à impermeabilização, denotando uma boa silanização. Finalmente mergulha-se por duas vezes cada berço em cuba contendo formaldeído a 4% em tampão fosfato salina (PBS=Phosphate Buffer Saline), coloca-se os berços em bandeja forrada com papel toalha de qualidade que não desprenda fiapos, cobre-se com papel alumínio e deixa-se secar muito bem. Esta secagem pode ser acelerada em estufa a 37°C. Não manusear as lâminas caso não estejam perfeitamente secas, e quando secas usar luvas, procurando não tocar a superfície onde vai ser aderido o corte de tecido. Embrulhar as lâminas (10 a 10, ou 50 a 50, conforme a necessidade) em papel alumínio e guardá-las ao abrigo de luz, calor, umidade e condições adversas. Este protocolo tem garantido a possibilidade de trabalho com cortes de tecido de espessura entre 0,5 a 6,0 ou 10 micra e com área mínima de até 1mm<sup>2</sup>, sem perda de adesão dos cortes.

## **2. Reinclusão dos tumores:**

Coloca-se cada bloco de interesse em recipientes adequados contendo parafina histológica em volume cinco vezes superior ao volume do bloco em estufa entre 55 e 58 °C "overnight". Reprocede-se o emblocamento em suportes apropriados e leva-se o mais rápido possível à temperatura de -20°C (freezer doméstico) para uma perfeita cristalização da parafina que facilita o feitio dos cortes. Para isso os blocos devem estar a uma

temperatura entre -5 a +5°C. O reemblocamento de cerca de 60 tumores foi necessário pois os blocos se encontravam em mau estado de conservação por ser um material de série histórica.

### **3. Imunohistoquímica (IHQ) para detecção de BCL-2, BAX, MCL-1 e BAK:**

Os tumores emblocados em parafina, têm seus cortes histológicos (15 por tumor, total de mais de 3500 lâminas) feitos em micrótomo a uma espessura de 3 micrômetros e daí colocados em banho-maria a 42°C, com somente água destilada e deionizada. A pescagem dos cortes em suspensão no banho-maria se faz com lâminas histológicas silanizadas conforme descrito. Essa solução forma uma película super aderente livre de cargas elétricas sobre a lâmina.

Uma vez feitas as lâminas com os cortes, procede-se à técnica, conforme protocolo a seguir :

Anticorpos primários - (todos provindos de “Santa Cruz Biotechnology” - CA - USA).

- IgG1 anti-proteína **BCL-2**, monoclonal obtida da fusão de células de mieloma de camundongo com células esplênicas de camundongo imunizado com proteína BCL-2 de origem humana.
- Anticorpos policlonais purificados em coluna cromatográfica de afinidade contra uma porção amino terminal de proteína **BAX** de origem murina (reativo com proteína humana).
- Anti-**BAK** - policlonal purificado por coluna de afinidade e obtido a partir da imunização de carneiros contra o peptídeo correspondente aos aminoácidos assim numerados na porção 82 a 104 da proteína de origem humana.
- Anti-**MCL-1** - policlonal originado em coelho imunizado com um peptídeo de origem humana correspondendo aos amino-ácidos 121 - 139, e purificado por coluna de afinidade.

Anticorpo secundário (Multilink) e complexo avidina-biotina (ABC) provindos de Dako Corporation (Dinamarca), substrato para revelação diaminobenzina (DAB) da marca SIGMA - USA. Vide tabela 6 em anexos.

### **3.a. Desparafinização e reidratação dos cortes:**

Coloca-se as lâminas em berço apropriado e imerge-se as mesmas em xilol, em estufa a 60°C por 30 minutos. Seguem-se duas passagens em xilol a temperatura ambiente por cinco minutos cada, duas passagens em álcool absoluto, uma em álcool 96 (GL) e uma em álcool 70 (GL), todas por cinco minutos. Finalmente faz-se lavagem em água corrente, não incidindo diretamente sobre os cortes, por 1 minuto e lavagem em água destilada por 2 minutos.

### **3.b. Bloqueio da peroxidase endógena, recuperação antigênica, incubações e contra coloração:**

Incuba-se as lâminas por 15 minutos à temperatura ambiente na seguinte solução: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% + Metanol (1:9), lava-se em água corrente e depois em água destilada, incuba-se em autoclave a 120 °C em H<sub>2</sub>O por 5 minutos e deixa-se esfriar por no mínimo 2 horas. A seguir, circunda-se os cortes com silicone (DAKOPEN), para que as soluções não escorram, incuba-se por 30 minutos a temperatura ambiente com soro normal suíno (1:20), deixa-se escorrer o soro e procede-se à incubação primária pingando-se cerca de 100 µl por corte, com os respectivos anticorpos primários em diluições apropriadas (ver tabela reagentes), em câmara úmida a temperatura ambiente, por 30 minutos e depois a 4°C “overnight”. Retira-se as lâminas da incubação com anticorpo primário e faz-se três lavagens com tampão PBS em berço com agitação, por 5 minutos cada. É muito importante o cuidado para que os cortes não ressequem ao ar livre, durante as passagens.

Incuba-se com anticorpo secundário MULTI-LINK (DAKO) por 1 hora a 37 °C, lava-se 3 vezes por 5 minutos em PBS à temperatura ambiente, incuba-se por 40 minutos com ABC (Avidin-Biotin-Complex) a 37 °C. Logo após submerge-se as lâminas em PBS e prepara-se a solução de diamino benzidina (DAB): DAB (60mg) + PBS (100ml) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

30% (0,5ml). Mistura-se a solução e incuba-se as lâminas por 5 minutos (figura 8). Lava-se em água corrente e depois em água destilada. A contracoloração é feita com Hematoxilina de Mayer, por 30 a 60 segundos, lava-se em água corrente e destilada, desidrata-se e monta-se as lâminas em resina apropriada (PERMOUNT - MERCK).

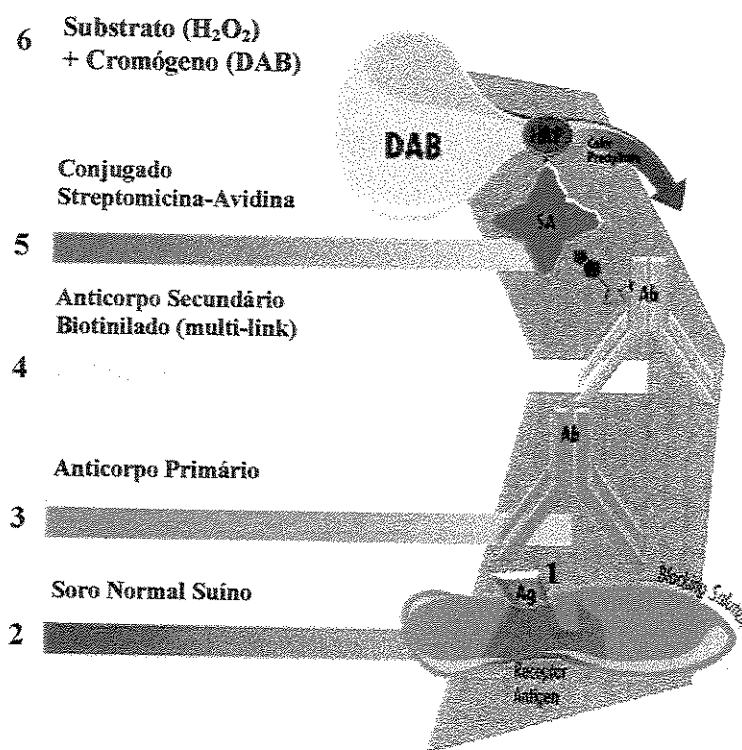
### **3.c. Análise das lâminas:**

Na visualização ao microscópio ótico (200 a 400 x), as células que se apresentam positivas para o respectivo anticorpo primário devem ter um precipitado marrom de aspecto granuloso e cor intensa sobre o seu citoplasma (BAK, BAX e MCL-1). Para BCL-2 a coloração é nuclear e perinuclear.

A análise das lâminas em imunohistoquímica foi realizada por três observadores diferentes e procurou levar em conta apenas os padrões de coloração das células neoplásicas e a porcentagem de células coradas por campo visualizados ao microscópio ótico em aumento de 400 vezes. Os seguintes critérios foram definidos: zero a dez por cento de células neoplásicas coradas equivale ao “score” negativo, 10 a 30 por cento de células neoplásicas coradas equivalendo a uma cruz de positividade (fraco), 30 a 50 por cento de células neoplásicas coradas equivalendo a duas cruzes de positividade (moderado), mais de 50% de células neoplásicas coradas equivalem a três cruzes; “score” máximo (forte).

Cada anticorpo usado apresentou células do tecido como controles positivos dentro de cada reação e para cada lâmina. Assim, para a proteína BCL-2, usamos as células endoteliais, para a proteína BAX, células endoteliais e macrófagos tissulares, para a proteína MCL-1 células endoteliais e para a proteína BAK células endoteliais e também neutrófilos, quando presentes. Como descrito na literatura, a positividade para as células neoplásicas (que corresponde a um aumento de expressão de determinada proteína) era determinada para cada lâmina em relação aos controles positivos internos de cada lâmina e de cada reação. Toda bateria de lâminas testadas possui ainda controles negativos da reação, onde se é omitido o anticorpo primário em uma lâmina tumoral. O controle negativo não pode e não deve apresentar qualquer intensidade de coloração em qualquer

célula, a não ser em casos muito específicos como por exemplo alguns histiócitos – macrófagos tissulares – que podem apresentar altíssimos níveis de peroxidase endógena e esta reagir com a diaminobenzidina causando uma coloração, mesmo na ausência do anticorpo primário. Entretanto, isto não foi problema em nosso estudo.



**Figura 8.** Esquema das etapas da reação de Imunohistoquímica pelo método imunoperoxidase-diaminobenzidina. De baixo para cima: (1) Em rosa o antígeno (proteínas BCL-2, BAX, MCL-1, ou BAK). (2) Em azul soro normal suíno, para neutralização de reações inespecíficas ("quenching"). (3) Em verde o anticorpo primário, mono ou policlonal anti-proteínas, antígenos-alvo. (4) Em amarelo o anticorpo secundário marcado com biotina que complexa com o anticorpo primário ligado ao antígeno. (5) Em cor de laranja e roxo o complexo estreptoavidina (SA) conjugado com peroxidase de beterraba (HRP). A estreptoavidina tem grande afinidade pela biotina, com quatro sítios de ligação para esta. (6) Em lilás a solução reveladora de diaminobenzidina, que forma um precipitado na presença de peroxidase e seu substrato  $H_2O_2$ .

#### **4. Metodologia estatística:**

Com a finalidade de se avaliar a relação entre a presença das proteínas estudadas em cada grau de malignidade tumoral e compará-las, executamos alguns testes estatísticos.

Para se verificar a associação ou comparar proporções entre as proteínas foi utilizado o teste de Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher (quando os critérios de aplicação do Qui-quadrado não foram satisfeitos). Foram considerados resultados significantes diferenças com  $p < 0,05$  (two-tail).

O coeficiente de concordância Kappa foi utilizado para avaliar resultados entre duas proteínas. A interpretação de magnitude deste coeficiente é definida como: valores maiores ou iguais a 0,75 indicam excelente concordância, valores entre 0,75 e 0,40 indicam boa concordância e valores menores ou iguais a 0,40 não indicam concordância.

Quando encontramos distribuição de proteínas com proporções que divergiram significativamente entre diferentes graus de malignidade, procedemos à identificação de amostras ou grupos de amostras que contribuíram para essa diferença significativa através do método ilustrado por Fleiss, (1981).

## ***Resultados***

---

## **LINFOMAS DE BAIXO GRAU DE MALIGNIDADE**

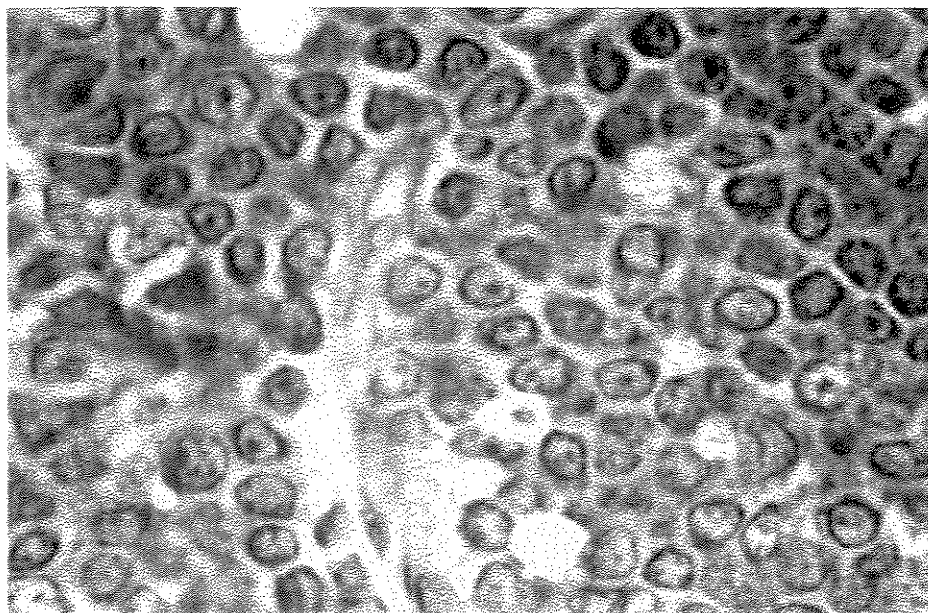
A proteína BCL-2 se apresentou com um nível de expressão aumentado em 18 de 21 casos (86%), sendo que 6 em 21 tiveram uma cruz, 8 em 21, 2 cruze e 4 em 21, 3 cruze e apenas três casos negativos. Vide anexos, tabela 1.

A proteína BAX apresentou expressão aumentada em 15 de 21 casos (71%), sendo em todos esses casos com 2 ou 3 cruze, nenhum caso uma cruz e 5 casos foram negativos.

Um dado interessante, mostrou que para os quatro casos BAX negativos a proteína BCL-2 também esteve indetectável em 2 casos, e 1 cruz em outros dois casos. Apenas no Linfoma de Células do Manto (LCM) houve BAX negativo e BCL-2, 3 cruze.

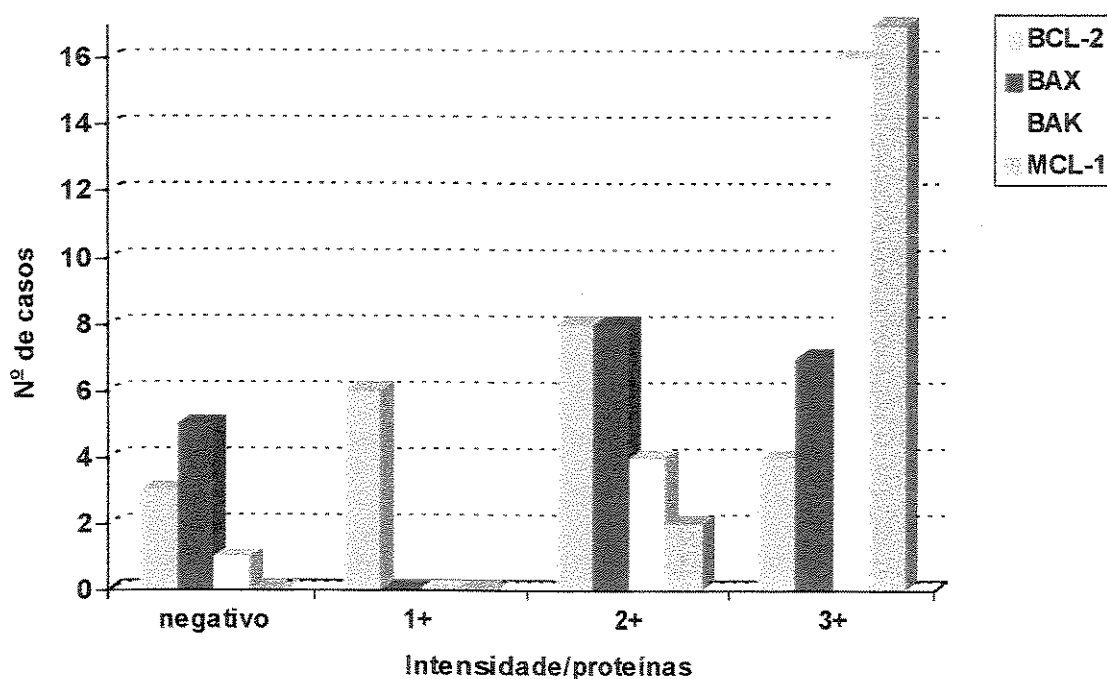
A proteína MCL-1 se apresentou altamente expressa em 100% dos casos, sendo que em 16 de 18 casos com 3 cruze e nos outros 2 casos, 2 cruze.

A proteína BAK se apresentou superexpressa em praticamente 100% dos casos, sendo 2 cruze em 4 de 21 casos, e 3 cruze em 16 de 21 casos. Um caso de LLC se apresentou negativo para essa proteína (Figura 9).



**Figura 9:** Imunodeteção em corte de tecido de Linfoma de Baixo Grau. Os tumores embebidos em parafina foram seccionados em cortes de 3  $\mu$ m e aderidos a lâminas de microscopia e submetidos à imunodeteção para as diferentes proteínas reguladoras de apoptose (BCL-2, BAX, MCL-1 e BAK), usando-se para BCL-2 um anticorpo monoclonal e policlonais para as restantes. A revelação se fez usando um método colorimétrico com diaminobenzidina (DAB) que forma um precipitado de cor marrom onde houver imunocomplexos antígeno-anticorpo específicos na presença de peroxidase, os núcleos das células são contracolorados com hematoxilina a fim de se facilitar a visualização das células. Esta figura mostra um linfoma de baixo grau corado com policlonal anti-BAK mostrando intensa coloração marrom (3 cruzes) no citoplasma e perinuclear em muitas das células neoplásicas, ampliado 1000x.

A figura 10 resume estes resultados.



**Figura 10:** Distribuição das proteínas BCL-2; BAX; BAK e MCL-1 detectadas por imunohistoquímica nos LNH de baixo grau de malignidade, conforme intensidade de coloração e número de casos.

A análise estatística revelou uma tendência de significância entre as proporções das proteínas BCL-2 e BAX (Kappa= 0,352 e  $p=0,141$ ). Não houve correlação entre os níveis de expressão entre BCL-2 e BAK (Kappa= -0,099 e  $p=1,000$ ) ou BAX e BAK (Kappa= -0,096 e  $p=1,000$ ).

Algumas proteínas não mostraram uma distribuição relevante para se realizar testes de significância associativa, ou seja, apresentaram uma distribuição muito desproporcional: BCL-2 e MCL-1, BAX e MCL-1 e BAK e MCL-1.

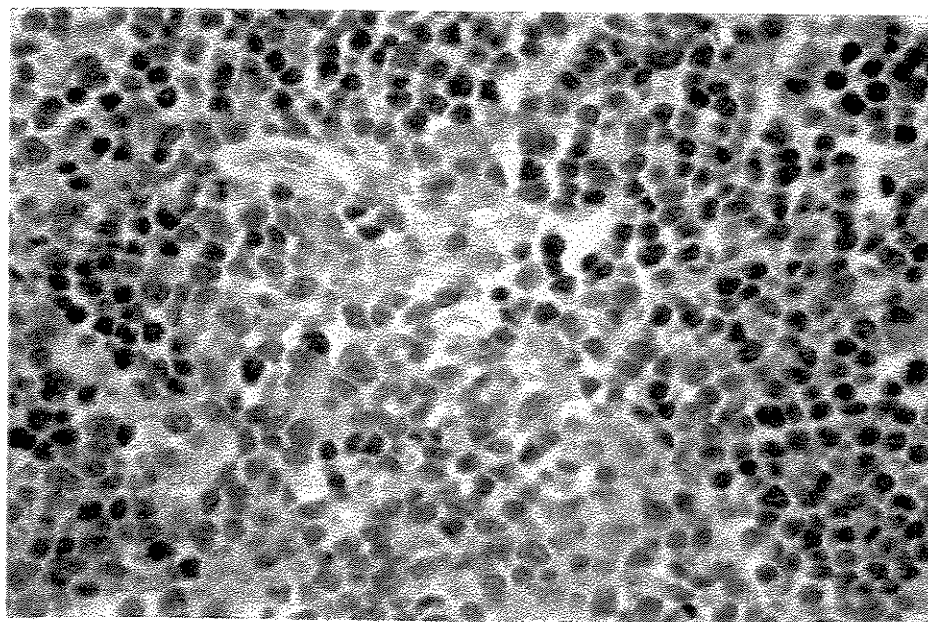
## **LINFOMAS DE GRAU INTERMEDIÁRIO DE MALIGNIDADE**

A proteína BCL-2 apresentou alta expressão em 9 de 10 casos (90%), sendo 2 casos com 1 cruz, 3 casos com 2 cruzeiros, 4 casos com três cruzeiros e somente um caso negativo (Figuras 11 e 12). Vide anexos, tabela 2.

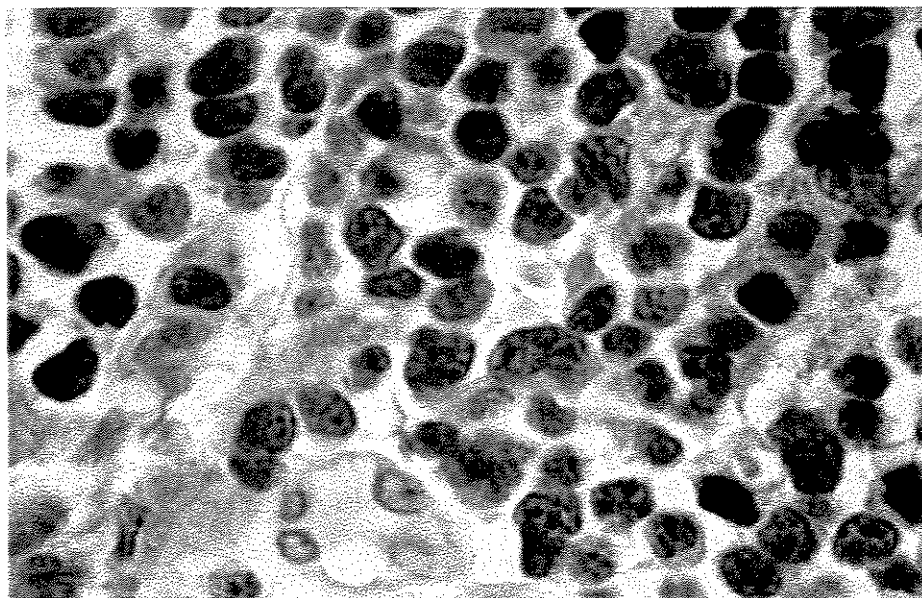
A proteína BAX se apresentou altamente expressa (3 cruzeiros) em 9 de 10 casos e 2 cruzeiros em um caso. Não observamos nenhum caso com expressão negativa para essa proteína.

A proteína BAK também mostrou alto nível de expressão nos casos analisados: sendo 3 cruzeiros em 3 casos e 2 cruzeiros nos demais.

Também a proteína MCL-1 mostrou alta expressão nos 10 casos analisados, sendo 3 cruzeiros em 6 casos e 2 cruzeiros em 4 casos.

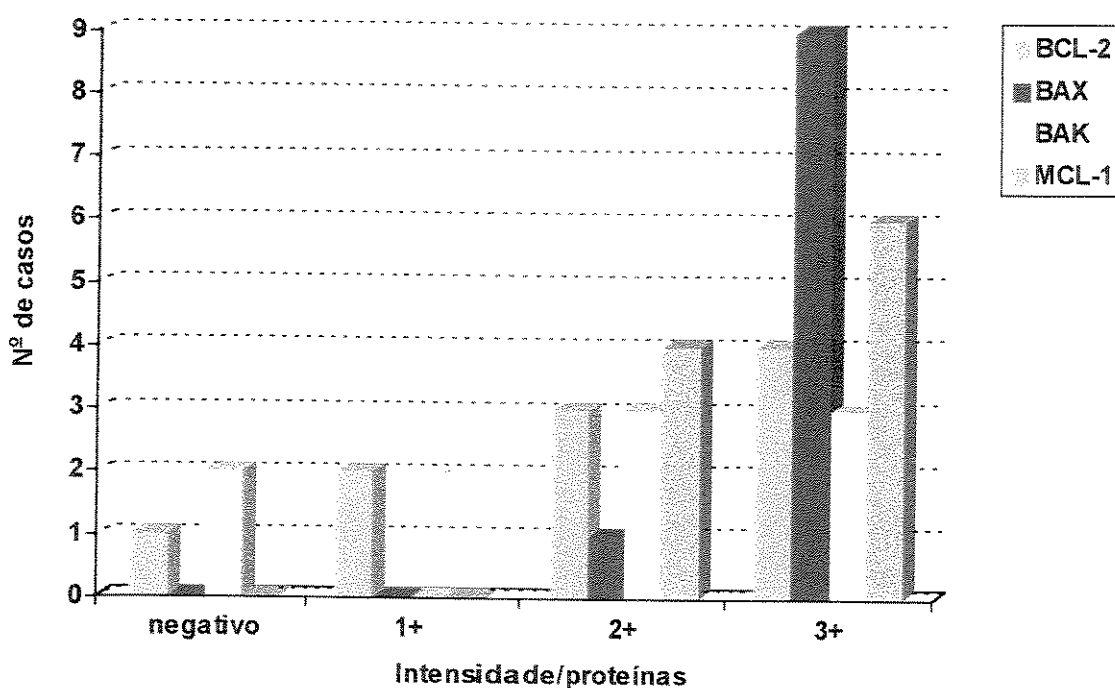


**Figura 11:** Imunodeteção para BCL-2 em um caso de Linfoma Folicular mostrando coloração nuclear e perinuclear para muitas das células neoplásicas (3 cruzeiros). Corte de parafina, peroxidase-diaminobenzidina, ampliação de 400x.



**Figura 12:** Linfoma Folicular: imunohistoquímica com monoclonal anti-BCL-2. Observa-se uma intensa coloração perinuclear (3 cruces) denotando grande quantidade dessa proteína nessas neoplasias. Corte de parafina, peroxidase-diaminobenzidina, ampliado 1000x.

A figura 13 resume os resultados obtidos para os LNH de grau intermediário de malignidade.



**Figura 13:** Distribuição das proteínas BCL-2, BAX, BAK e MCL-1 por imunohistoquímica nos LNH grau intermediário de malignidade, conforme intensidade de coloração e número de casos.

Não houve correlação dos níveis de expressão de BCL-2 e BAK (Kappa= 0,333 e  $p= 0,464$ ). As outras proteínas não mostraram distribuição relevante para se realizar testes de significância associativa, ou seja, apresentaram uma distribuição muito desproporcional: BCL-2 e BAX, BCL-2 e MCL-1, BAX e BAK, BAX e MCL-1, BAK e MCL-1.

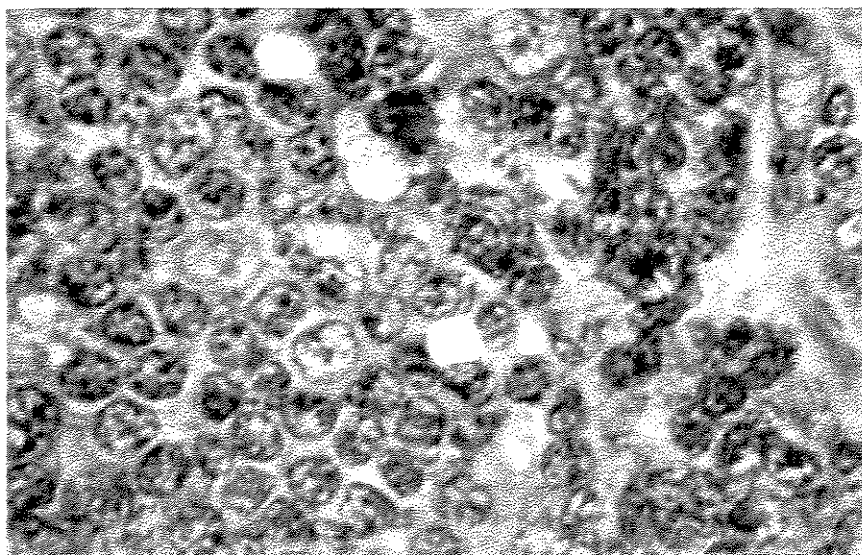
### **LINFOMAS DE ALTO GRAU DE MALIGNIDADE:**

Para estes casos, BCL-2 se apresentou indetectável em 32 de 67 casos (48%), 1 cruz em 15 de 67 (22%), 2 cruces em 13 de 67 (19%) e 3 cruces em apenas 7 de 67 casos (10%). Portanto, houve detecção de BCL-2 em 35 de 67 casos (52%). Vide anexos, tabela 3.

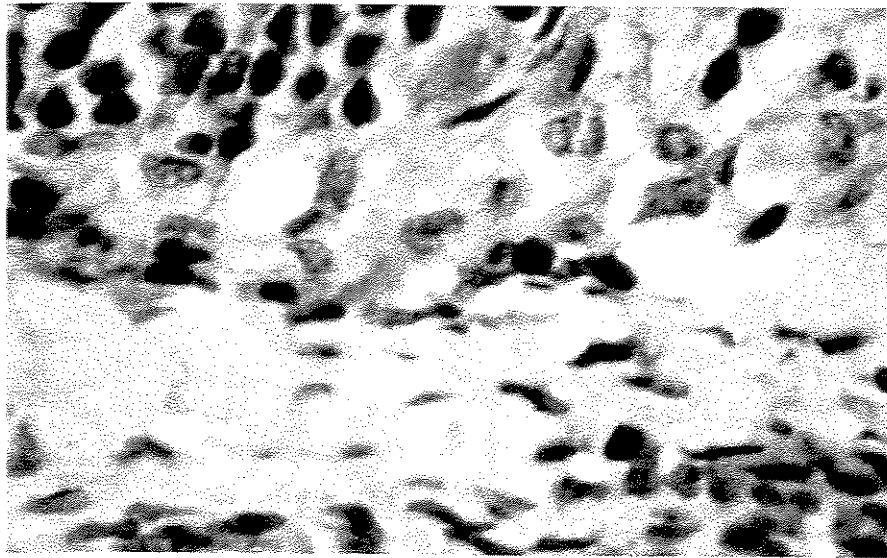
A proteína BAX mostrou expressão aumentada em 67 de 73 casos (92%) (Figura 14).

A proteína BAK esteve aumentada na maioria dos casos, 32 de 38 (84%), sempre com nível de expressão entre 2 e 3 cruces. Alguns casos foram negativos para essa proteína, em geral acompanhando uma negatividade para BAX e também BCL-2.

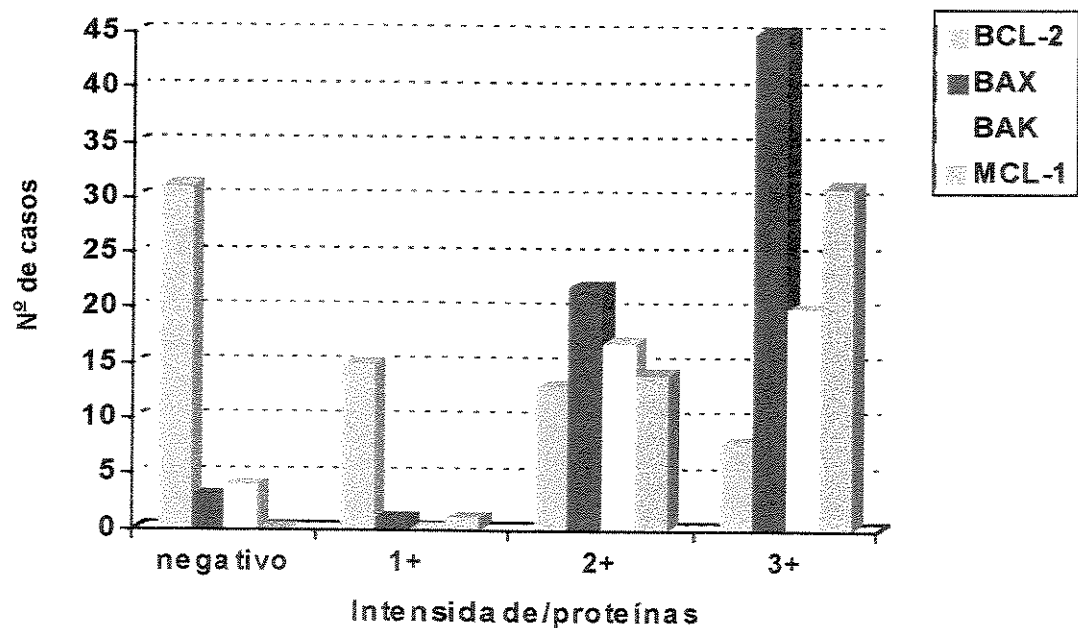
A proteína MCL-1 se apresentou muito aumentada em cerca de 100% dos casos (Figura 15), em 31 de 46 casos (65%) 3 cruces e em 14 de 46 casos 2 cruces e somente um caso com uma cruz de nível de expressão. Nenhum caso estudado se apresentou negativo para essa proteína.



**Figura 14:** Linfoma de Alto Grau: imunohistoquímica com policlonal anti-BAX. Observa-se forte coloração perinuclear e citoplasmática das células neoplásicas (3 cruces). Corte de parafina, peroxidase-diaminobenzidina, ampliado 1000x.



**Figura 15:** Linfoma de Alto Grau: imunohistoquímica com policlonal anti-MCL-1, observa-se intensa coloração no citoplasma das células neoplásicas (3 cruzes), enquanto células do estroma se apresentam negativas. Corte de parafina, peroxidase-diaminobenzidina, ampliado 1000x.



**Figura 16:** Distribuição das proteínas BCL-2; BAX; BAK e MCL-1 por imunohistoquímica nos LNH de alto grau de malignidade, conforme intensidade de coloração e número de casos.

Observamos correlação entre os níveis de expressão de BAX e MCL-1 (Kappa= 0,789 e  $p= 0,0028$ ).

Houve tendência a significância entre as proporções das proteínas BAX e BAK (Kappa= 0,379 e  $p= 0,063$ ) e BAK e MCL-1 (Kappa= 0,303 e  $p= 0,132$ ).

Não houve correlação entre os níveis de expressão de BCL-2 e BAX (Kappa= 0,058 e  $p= 0,298$ ), BCL-2 e BAK (Kappa= -0,014 e  $p= 1,000$ ), BCL-2 e MCL-1 (Kappa= 0,030 e  $p= 1,000$ ).

## **LINFOMAS LINFOBLÁSTICOS**

Para esses tumores BCL-2 se apresentou negativo em 4 de 5 casos (57%), e somente em um caso com três cruces. Vide anexos, tabela 4.

A proteína BAX esteve superexpressa nos cinco casos estudados, sendo 3 em 5 casos com 3 cruces e 2 com 2 cruces.

A proteína BAK mostrou o mais alto nível de expressão para estes casos, sendo 5 de 5 casos com 3 cruces.

A proteína MCL-1 mostrou 3 cruces em 3 de quatro casos estudados e 2 cruces em 1 de 4 casos.

A figura 17 resume os resultados obtidos para os Linfomas linfoblásticos.

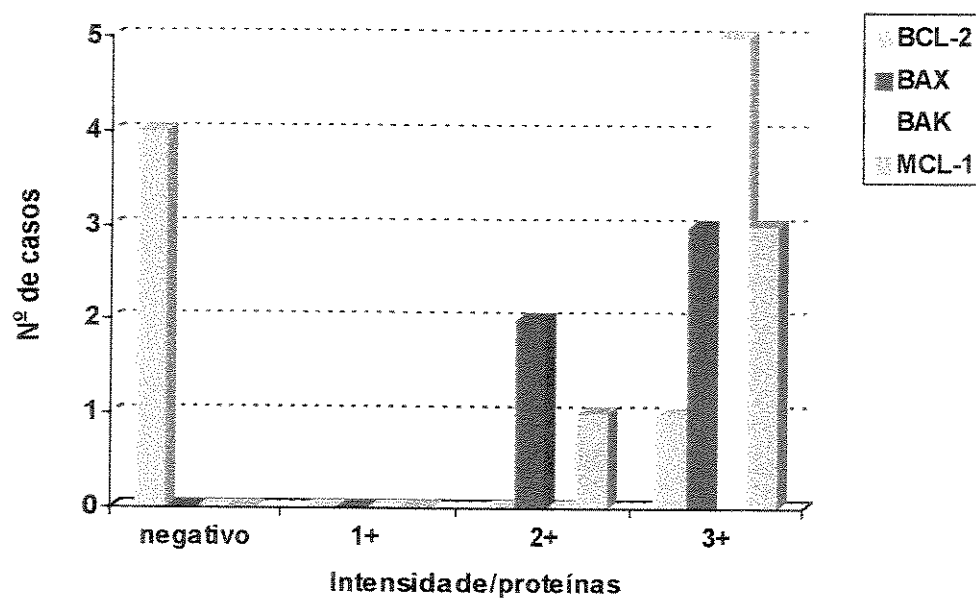


Figura 17: Distribuição das proteínas BCL-2, BAX, BAK, MCL-1 por imunohistoquímica nos Linfomas Linfoblásticos.

## LINFOMAS DE BURKITT

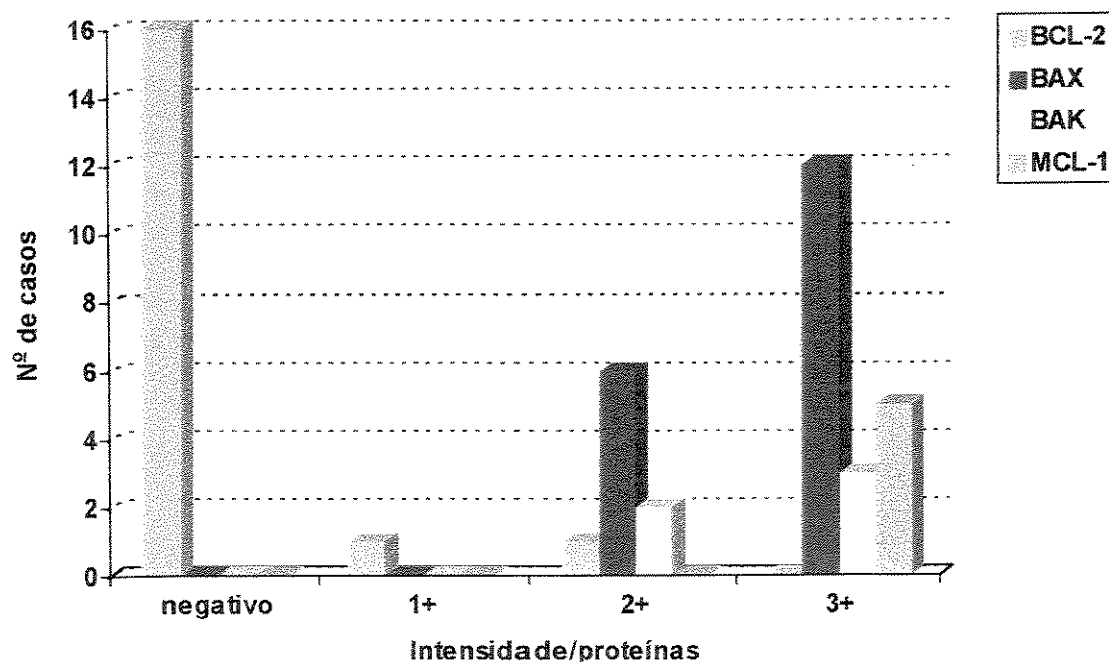
Em nossa casuística de 18 casos apenas 2 mostraram BCL-2 aumentado, sendo 1 com 1 cruz e outro com 2 cruces. Nos demais casos (16 em 18 = 89%) a expressão foi negativa. Vide anexos, tabela 5.

A proteína BAX se mostrou sempre com alta expressão, ou seja, 6 de 18 casos com 2 cruces (cerca de 33%) e 13 de 18 com 3 cruces (cerca de 72%).

Para a proteína BAK, 2 de cinco casos analisados foram 2 cruces e 3 de 5 casos foram 3 cruces.

A proteína MCL-1 mostrou-se sempre com o mais alto nível de expressão em todos os casos analisados, ou seja, 3 cruces em 5 de 5 casos (100%).

A figura 18 resume os resultados obtidos para os Linfomas de Burkitt.

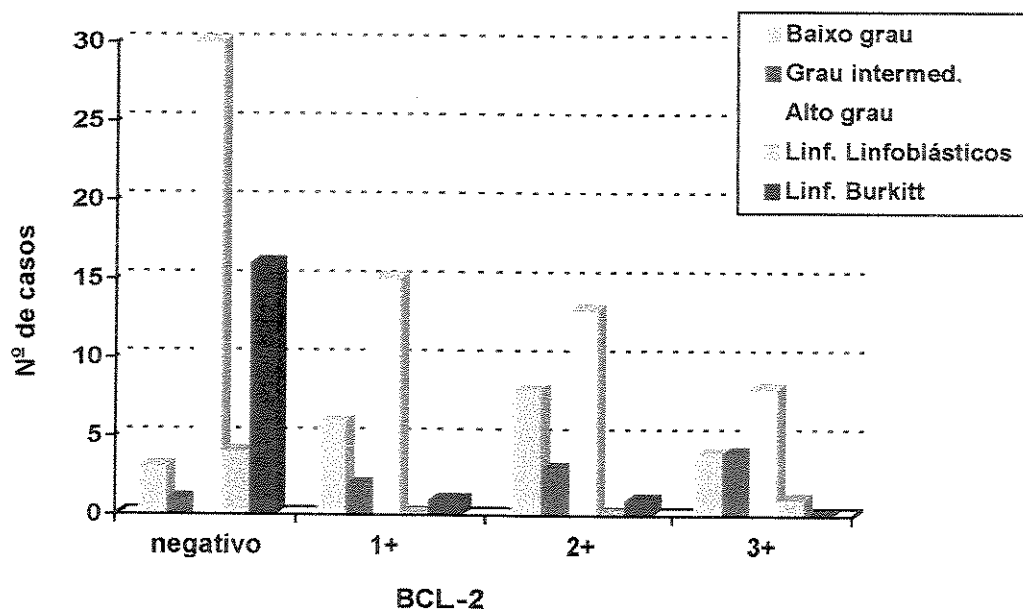


**Figura 18:** Distribuição das proteínas BCL-2; BAX; BAK e MCL-1 por imunohistoquímica nos Linfomas de Burkitt, de acordo com a intensidade de coloração e número de casos.

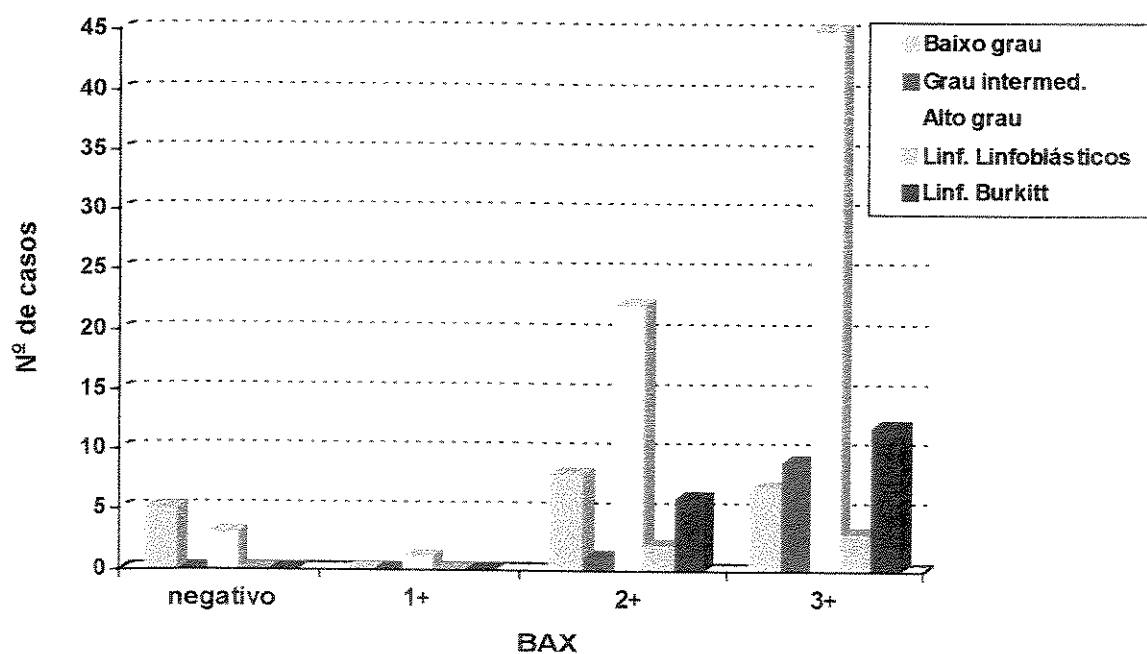
As figuras 19 a 22 mostram os resultados obtidos para cada proteína estudada: BCL-2 (fig 19),

## Resultados

BAX (fig.20), BAK (fig.21), MCL-1 (fig.22) de acordo com intensidade de coloração em relação ao número de casos para cada subtipo de LNH.



**Figura 19:** Distribuição da proteína BCL-2 nos diferentes subgrupos de LNH de acordo com a intensidade de coloração e número de casos



**Figura 20:** Distribuição da proteína BAX por IHQ nos diferentes subgrupos de LNH de acordo com a intensidade de coloração e número de casos.

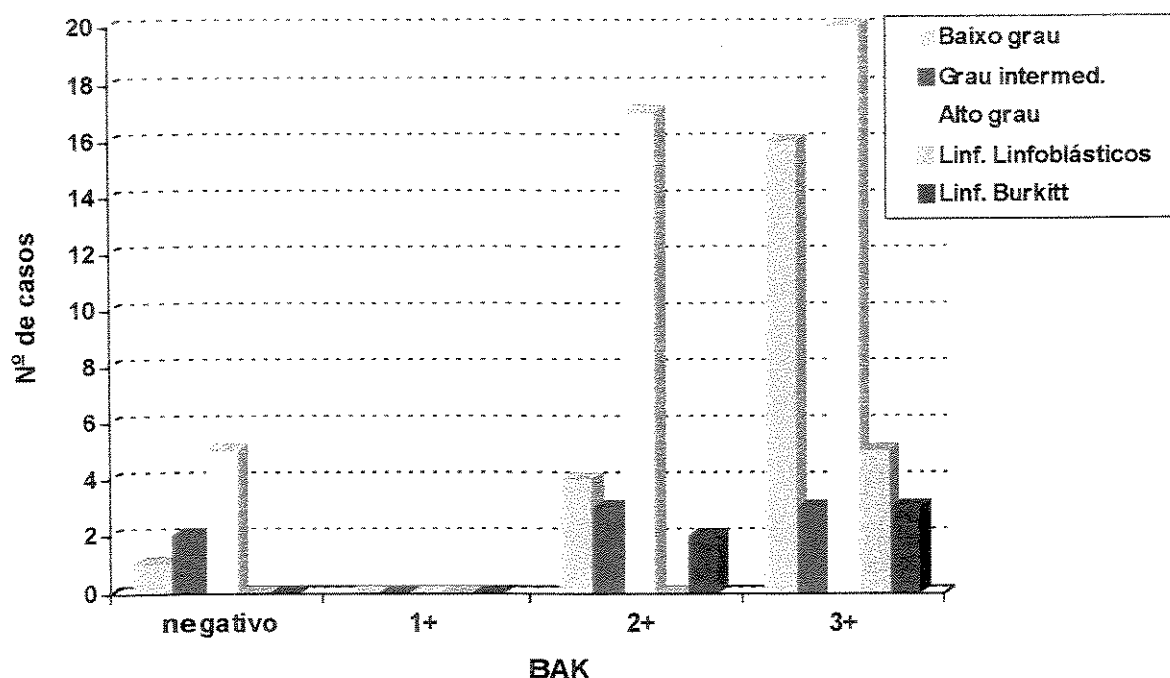


Figura 21: Distribuição da proteína BAK nos diferentes subgrupos de LNH de acordo com a intensidade de coloração e número de casos

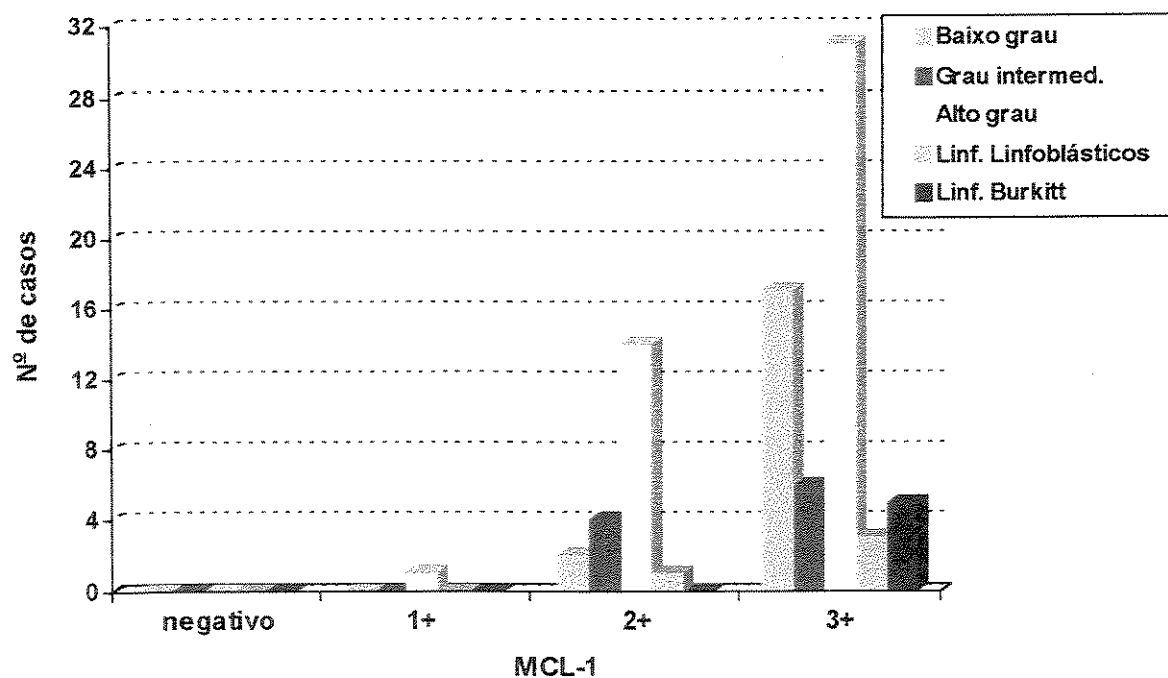


Figura 22: Distribuição da proteína MCL-1 nos diferentes subgrupos de LNH de acordo com a intensidade de coloração e número de casos

## **ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS ENTRE OS DIFERENTES GRAUS DE MALIGNIDADE TUMORAL.**

**BCL-2:** Observamos distribuição significativamente inferior nos linfomas de graus alto e muito alto de malignidade, comparados com os linfomas de grau baixo e intermediário ( $\chi^2 = 16,294$ ,  $p=0,001$ ).

**BAX:** A expressão de BAX foi significativamente inferior nos linfomas de baixo grau quando comparados com os demais subtipos de linfomas ( $p=0,02$ , Teste Exato de Fisher).

**BAK e MCL-1:** Não houve diferença significativa entre os níveis de expressão de BAK e MCL-1 nos diferentes subtipos de linfoma (BAK  $p=0,291$ ; MCL-1  $p=1$ , Teste exato de Fisher).

## ***Discussão***

---

Os LNH têm-se mostrado um bom modelo para analisar o envolvimento da apoptose espontânea no sistema de auto-regulação de tumores malignos, devido à sua relativa monoclonalidade em relação a outras neoplasias malignas (Takano et al, 1997). Em células normais ou neoplásicas, membros pró e anti-apoptóticos da família BCL-2 podem homodimerizar ou heterodimerizar entre si e dessa maneira modular suas respectivas funções, na regulação da apoptose e retardo ou aceleração do ciclo celular, que se encontram geralmente desregulados em neoplasias em geral (Green e Reed, 1998).

Neste trabalho tivemos o objetivo de analisar a expressão e distribuição de quatro proteínas da família BCL-2 em LNH divididos em graus baixo, intermediário e alto de malignidade de acordo com a classificação REAL.

**BCL-2:** Sabe-se que cerca de 85% dos linfomas foliculares e 30% dos linfomas de alto grau apresentam a translocação t(14;18). Essa translocação aproxima o gene *Bcl-2* aos sítios promotores do gene de cadeia pesada de imunoglobulinas (*IgH*), originando um RNAm quimérico estável, com consequente superexpressão de BCL-2. Entretanto, a expressão aumentada de BCL-2 tem sido observada em vários subtipos de linfoma, sem no entanto apresentarem a t(14;18) ou outra equivalente.

A translocação t(14;18) não é o único mecanismo que pode perturbar o equilíbrio entre proteínas supressoras e promotoras da morte celular da família BCL-2. Por exemplo, ainda que esta translocação seja rara em leucemia linfóide crônica (LLC), cerca de 85% destes casos apresentam expressão de BCL-2 igual ou maior que os linfomas apresentando a translocação (Reed, 1998). Outros mecanismos como a amplificação do cromossomo 18q, deleção de uma região não conservada (resíduos 51-85) ou mutações no gene *bcl-2* (Nicolaidis et al, 1998; Monni et al, 1999) também estão envolvidos nos processos de superexpressão de BCL-2.

Estudos de expressão de BCL-2 nos LNH têm descrito diferentes níveis de expressão dessa proteína, variando entre 51 a 85% de acordo com os subtipos inclusos nas casuísticas (Pezella et al, 1993; Piris et al, 1994; Kramer et al, 1996; Takano et al, 1997; Winter et al, 1998).

No presente estudo, observamos expressão aumentada de BCL-2 em cerca de 85% dos linfomas de baixo grau de malignidade, 90% dos linfomas foliculares, 55% dos linfomas de alto grau de malignidade, exceto nos linfomas linfoblásticos e de Burkitt com cerca de 10%. Esses dados são compatíveis com a literatura que mostram expressão aumentada de BCL2 em 95% a 100% das Leucemias Linfóides Crônicas (Hanada et al, 1993 e Wheaton et al, 1998), 80 a 88% dos Linfomas Foliculares (Wheaton et al, 1998; Logsdon et al, 1999), 44 a 75% em LNH de alto grau (Schlaifer et al, 1996; Hermine et al, 1996; Hill et al, 1996; Gascoyne et al, 1997; Sanchez et al, 1998; Wheaton et al, 1998). Altos níveis de expressão de BCL-2, no entanto, não têm sido detectados em Linfomas Linfoblásticos e Linfomas de Burkitt (Wheaton et al, 1998).

A expressão de BCL-2 foi significativamente diferente entre os graus de malignidade dos LNH ( $\chi^2=16,294$  e  $p=0,001$ ), indicando maior expressão nos linfomas de graus baixo e intermediário, comparados aos linfomas de alto grau. De fato, esses dados corroboram os resultados de Wheaton e colaboradores (1998) que observaram níveis de expressão crescente para BCL-2 em diferentes tipos de LNH, quais sejam: **Linfomas Linfocíticos de Pequenas Células (LLC) > Linfomas Centro Foliculares (LF) > Linfomas Difusos de Grandes Células (CB), (IB) e (ANAPL) > Linfomas de Alto Grau Tipo Burkitt > Pré B Linfoblásticos (LB) > Linfoma de Burkitt (BU).**

A alta expressão de BCL-2 favoreceria o acúmulo de novos clones neoplásicos e assim explicaria uma boa parte dos casos de linfomas foliculares que evoluem para tumores de alto grau com alta expressão de BCL-2 (Bentz et al, 1996). Camundongos transgênicos para o rearranjo *Bcl-2-Ig* apresentam, com o envelhecimento, acúmulo de células B de memória, com consequente hiperplasia de linfonodos. Apesar disso, nenhum desses camundongos desenvolve linfoma folicular e somente alguns evoluem para linfoma de alto grau onde se constatou um rearranjo subsequente do oncogene *myc* (Mc Donnell e Korsmeyer, 1991; Lovec et al, 1994). Esses dados são consistentes com a hipótese da translocação de *bcl-2* por si só não ser suficiente para conferir um fenótipo neoplásico. Além do mais, clones possuindo a translocação  $t(14;18)$  têm sido localizados em tecidos linfóides secundários, assim como sangue periférico de indivíduos normais e a frequência dessas translocações parece aumentar significativamente com a idade (Liu et al, 1994).

Apesar da literatura se mostrar consistente com relação à menor sobrevida livre de doença em indivíduos portando tumores com alta expressão de BCL-2 (Takano et al, 1997; Sanchez et al, 1998; Logsdon et al, 1999), o mesmo não parece ser verdadeiro para a sobrevida global e o impacto de BCL-2 em relação a esta permanece controverso (Krajewski et al, 1994; Hermine et al, 1996; Kramer et al, 1996; Takano et al, 1997; Gascoyne et al, 1997; Wheaton et al, 1998; Logsdon et al, 1999).

A superexpressão de BCL-2 é contrabalanceada pela dimerização com BAX, que modula o papel anti-apoptótico de BCL-2.

**BAX:** “BCL-2 Antagonist X-protein” é uma proteína indutora de apoptose com cerca de 22% de homologia com BCL-2 e pode ser transativada pela proteína supressora de tumores p53, que se une a quatro consensos de ligação no promotor de BAX. Sendo assim, mutações no gene *p53* devem alterar os níveis de expressão de BAX (Schlaifer et al, 1996). Os níveis de expressão de BAX também podem ser alterados por diferentes citocinas e agentes químicos (Ichikawa et al, 1992; Newcomb, 1995; Sanchez et al, 1998).

BAX tem localização citoplasmática até receber estímulo apoptótico quando migra para a membrana mitocondrial externa, indicando que esta proteína se apresente como um regulador de apoptose e não um efetor da mesma. A ancoragem de BAX à membrana se dá, aparentemente, através de sequências de aminoácidos específicos presentes em alguns membros da família BCL-2. Modificações na conformação tridimensional dessas proteínas e ainda formação de homo e heterodímeros podem promover alterações físico-químicas de membranas com formação de poros, dependentes do pH (Antonsson et al, 1997).

Em nosso estudo, a proteína BAX mostrou aumento de expressão em cerca de 90% dos casos, mesmo naqueles onde BCL-2 se apresentou indetectável. Estes dados são compatíveis com a literatura, que demonstra níveis de expressão da proteína BAX variando de 75 a 96% em diferentes estudos, de acordo com os graus de malignidade dos linfomas (Schlaifer et al, 1996; Wheaton et al, 1998; Gascoyne et al, 1997; Winter et al, 1998; Logsdon et al, 1999). A proteína BAX esteve aumentada em todos os casos de linfoma de Burkitt, sendo a grande maioria com 3 cruzeiros (70%), e outros 30% com 2 cruzeiros, também

compatível com a literatura (Wheaton et al, 1998). Os linfomas de baixo grau tiveram expressão de BAX significativamente menor ( $p=0,02$ ), quando comparados aos LNH de graus intermediário e alto.

É interessante ressaltar que os casos apresentando baixo ou indetectável nível de BAX, exceto linfoma de zona do manto, também se apresentaram negativos para BCL-2. Outros autores já haviam notado esse paralelo em tumores de mama (Krajewski et al, 1995) e sugeriram que tumores BCL-2 (-) podem progredir para uma maior independência desta proteína para sua sobrevivência, devido, entre outras causas, a uma diminuição de BAX. Aparentemente, níveis correlatos dessas proteínas mantêm a grande maioria das células num estado não proliferativo entre G0 e G1 e a presença de heterodímeros e não de homodímeros pró ou anti-apoptóticos criaria tal microambiente celular impedindo ou dificultando a progressão do ciclo, com consequente acúmulo de células e perda de homeostase corpórea (Wheaton et al, 1998). A perda de expressão de BAX pode ser explicada por mutações em seu gene, entretanto, Peng et al (1998) demonstraram que mutações no gene *bax*, incluindo seu promotor, são raras em linfomas em geral (cerca de 10%). Indicadores de pior prognóstico, tais como superexpressão de p53 e ausência de BCL-2 podem ser correlacionados com proliferação, mas a ligação com apoptose tem sido mais difícil de se explicar (Takano et al, 1997).

A ausência de expressão de BAX associada a altos níveis de BCL-2, como observado em nosso caso de Linfoma de Células do Manto, favoreceria o acúmulo de mutações subsequentes, compatível com as freqüentes perdas e ganhos cromossômicos e amplificações de DNA observadas nesses tumores em um estudo recente de 45 casos, além de cerca de 50% de mutações do gene *p53*. (Beà et al, 1999; Ichikawa et al, 1992; Newcomb, 1995; Hernandez et al, 1996). Os Linfomas de Células do Manto têm classificação difícil e comportamento indolente e em geral apresentam células pequenas como os de baixo grau também, porém são bastante agressivos e atualmente há uma tendência em tratá-los como os de alto grau de malignidade. Eles apresentam uma taxa proliferativa intermediária e baixo índice apoptótico. Muitos desses tumores apresentam uma translocação típica t(11;14) que aproxima o promotor do gene de cadeia pesada de imunoglobulinas (*IgH*) ao gene da ciclina D1 (*CCND-1*), fazendo com que esta seja super-

expressa. É possível que a ciclina D1, de alguma maneira esteja inibindo a expressão de *bax*, compatível com sua função cíclica, uma vez que, como visto anteriormente, esta parece acompanhar a expressão desregulada de *bcl-2* em muitos casos. (Ichikawa, 1992; Newcomb, 1995; Hernandez, 1996).

Dados da literatura mostram que a expressão de BAX influi de maneira variável no prognóstico dos linfomas de alto grau de malignidade (Gascoyne et al, 1997; Nicolaidis et al, 1998; Longsdon et al, 1999; Wheaton et al, 1998; Soini et al, 1998). Parece não haver também correlação da expressão de BAX com outras variáveis clínicas e laboratoriais estudadas (Gascoyne et al, 1997; Nicolaidis et al, 1998; Wheaton et al, 1998), entretanto Hogarth e Hall (1999) correlacionam a alta expressão de BAX com aumento de risco de recaída, um fator de mau prognóstico em crianças portadoras de Leucemia Linfocítica Aguda (LLA).

Alguns estudos têm demonstrado que pacientes com neoplasias BCL-2 e BAX imunonegativos experimentaram sobrevida livre de doença e sobrevida total menores que pacientes com tumores onde BAX foi imunopositivo e BCL-2 negativo ( Gascoyne et al, 1997; Nicolaidis et al, 1998). Isso foi explicado como uma maior desregulação do controle apoptótico nessas células, uma vez que essas proteínas se encontram comumente expressas em células B normais. Esses tumores têm um fenótipo mais agressivo e consistente com a noção de que BAX pode funcionar como supressor de tumores, promovendo o "turnover" de células e também agindo como radio e quimiossensibilizador. Em contraste, linfomas BCL-2 imunopositivos com baixas porcentagens de células tumorais positivas para BAX foram associados com aumento de sobrevida livre de doença, aumento no tempo para recidiva e também maior sobrevida total (Gascoyne et al, 1997), quando comparados aos casos com alta expressão de BAX. A resposta para o paradoxo entre baixos níveis de expressão de BAX e melhores taxas de sobrevida para os pacientes com tumores de alto grau e BCL-2 imunopositivo deve residir na observação da superexpressão dessa proteína poder desacelerar o ciclo celular em sua fase G1 em pelo menos alguns tipos celulares. Entretanto BAX pode superar o ponto de checagem do ciclo celular em G1-S por BCL-2 e desse modo, os tumores que coexpressam BCL-2 e BAX teriam uma vantagem de crescimento (Schlaifer et al, 1996; Gascoyne et al, 1997). Isso poderia ser verdade em

havendo suficientes níveis de BAX para reduzir os efeitos de BCL-2 sobre o ciclo celular, sem no entanto interferir completamente com o seu efeito supressor de morte celular (Gascoyne et al, 1997).

Em vista desses aspectos, é possível que a relação entre os níveis de expressão entre BCL-2 e BAX (**BCL-2/BAX Protein Ratios = BBPR**, Oltvai et al, 1993) seja fator importante na apoptose celular. Em outras palavras, células com um alto índice BBPR tendem a sobreviver, enquanto outras com baixo índice BBPR tenderão à apoptose mais rapidamente. Pepper e colaboradores (1996) descreveram um aumento do índice BBPR em pacientes portadores de leucemia linfóide crônica com ou sem tratamento, em relação a um grupo controle normal. A partir disto, vários estudos têm demonstrado que a superexpressão de BCL-2 em relação a BAX corresponde a uma pior resposta quimioterápica, e progressão da doença (Wheaton et al, 1998; Nicolaides et al, 1998; Sanchez et al, 1998; Winter et al, 1998). Esse índice tem mostrado boa correlação com os LNH estudados, pois os linfomas indolentes (LLC, IC, LF), os quais apresentam um alto índice BBPR, se mostram mais resistentes à quimioterapia, com uma menor taxa de remissão completa e são raramente curados. Por outro lado, os LNH de alto grau (B) possuem um baixo índice BBPR, respondem mais rapidamente à quimioterapia e têm uma taxa de cura entre 30 a 50% (Wheaton et al, 1998).

Em resumo, apesar de altos índices de expressão de BAX levarem à apoptose, essa proteína por si só não apresenta significado prognóstico nos linfomas agressivos. Porém, nos casos onde BAX se apresenta negativo a recidiva é mais precoce e o tempo de sobrevida é menor (Gascoyne et al, 1997; Nicolaides et al, 1998). Aparentemente outros fatores como índice mitótico e taxa proliferativa, fatores estes condicionados por outras proteínas e outras alterações genéticas, devem também ser importantes nesse quadro complexo (Takano et al, 1997).

**MCL-1:** A proteína MCL-1 tem sua expressão aumentada em linhagens mielóides precursoras, alguns linfócitos T de sangue periférico e linfoblastos do centro germinativo até a sua maturação. É quando a ativação da expressão da proteína BCL-2 assumirá o papel de tornar algumas dessas células “long-lived” (Ghia et al, 1998).

Em nosso estudo, verificamos um aumento de expressão dessa proteína em todos os subtipos de linfomas estudados (praticamente 100% dos casos). MCL-1 apresentou um alto nível de expressão, sendo cerca de 68% dos casos com 3 cruces e cerca de 29% com 2 cruces. Foi indetectável em apenas 3 casos. Os dados da literatura são escassos, mas mostram em LNH uma expressão aumentada em pelo menos 60% dos casos (Krajewski et al, 1994).

Falhas na inativação desse gene durante a recombinação homóloga ou manutenção de sua expressão por outras vias ainda desconhecidas poderiam explicar esses achados. A alta taxa de expressão da proteína MCL-1 pode ter relação com o descontrole na passagem de expressão de *mcl-1* para *bcl-2* em determinados tipos tumorais (Lomo et al, 1996). Krajewski et al, em 1994, demonstraram que tanto BCL-2 quanto MCL-1 são expressos pelas mesmas células em linfomas foliculares, particularmente as células que devem apresentar a t(14;18), além de que parecem interagir entre si e com BAX.

Essa coexpressão, assim como a interação dessas proteínas, explicaria o caráter indolente dos linfomas foliculares (LF), onde a t(14;18) seria fruto de um erro no sistema recombinase no tempo em que os linfoblastos do centro germinativo (MCL-1 positivos) estariam sendo estimulados pelas células dendríticas a sofrer as primeiras recombinações homólogas para expressão de imunoglobulinas, assim como expressão simultânea de BCL-2 para as células que deveriam passar a um estado “long-lived” com migração para a zona do manto e regiões interfoliculares (Krajewski et al, 1994).

Neste estudo observamos associação entre os níveis de expressão das proteínas BAX e MCL-1 nos linfomas de alto grau de malignidade ( $p=0,0028$ ). O acúmulo de células apresentando expressão aumentada de MCL-1 poderia levar ao aumento simultâneo de expressão da proteína BAX numa tentativa do organismo de eliminar essas células, a fim de se resgatar a homeostase do indivíduo. De fato, Schlaifer et al (1996) descrevem também uma expressão simultânea de proteínas anti-apoptóticas tais como BCL-2 e / ou MCL-1 nos tumores onde se encontrou alta expressão de BAX, sugerindo que as proteínas anti-apoptóticas podem contrabalancear a função pró-apoptótica de BAX. Esses autores observaram que os LNH expressam altas taxas de BCL-2 e ou BCL-X (provavelmente BCL-XL, anti-apoptótico), enquanto células B normais expressam MCL-1 e BAX.

Em trabalho recente Borner e colaboradores (1999) encontraram associação positiva para as proteínas MCL-1 e BAX ( $p=0,06$ ) em carcinomas pulmonares de células não pequenas, compatível com nossas observações para essas proteínas em LNH de alto grau. Zhan e colaboradores (1997), em trabalho com linhagens de leucemia mieloide, afirmam que a expressão de MCL-1 pode ser aumentada de maneira independente de p53 em células submetidas a agentes nocivos ao DNA, e também em células mielóides em diferenciação, ou seja, os mecanismos de regulação dessa proteína envolvida na sobrevivência de linhagens celulares parece não depender da proteína p53.

Nos linfomas de Burkitt, a proteína MCL-1 apresentou altos níveis de expressão (3 cruces) em 100% dos casos por nós estudados. Esse dado é compatível com a biologia desses tumores, constituído por células muito imaturas, que normalmente estariam expressando a proteína MCL-1. Essa alta expressão de MCL-1 poderia substituir o efeito da proteína BCL-2 nesses tumores, ou seja, inibiria a apoptose e ou retardaria o ciclo celular. Este efeito favoreceria o acúmulo de mutações subsequentes, como do próprio gene supressor de tumores *p53*, que apresenta taxa de mutação de cerca de 40% (Newcomb, 1995; Peng et al, 1998).

**BAK:** “BCL-2 Associated Killer” é uma proteína pró-apoptótica com peso molecular de cerca de 22kDa e 216 amino-ácidos com similaridade de 28% a BCL-2, principalmente em relação aos domínios BH1 e BH2. Assim como BCL-2, seu domínio hidrofóbico C-terminal indica que deva estar localizada em membranas. Essa proteína tem a capacidade de auto-dimerização e heterodimerização preferencialmente com BCL-XL.

Em nosso estudo, a proteína BAK se apresentou altamente expressa na grande maioria dos tumores (cerca de 90%) e indetectável em cerca de 10%, seguindo praticamente os padrões de expressão de BAX, porém com um nível até mais elevado. Houve tendência à correlação entre os níveis de expressão de BAX e BAK nos linfomas de alto grau ( $p=0,063$ ), sugerindo talvez, uma regulação simultânea de BAK por p53, como já demonstrado para BAX (Miyashita and Reed, 1995). De fato, em trabalho recente, Pohl e colaboradores (1999) demonstraram em células transfectadas com *p53* selvagem, aprisionamento em G2/M com conseqüente acúmulo da proteína BAK. No entanto, os

autores não observaram modulação consistente para outros membros da família BCL-2 como BAX, BCL-2, BCL-X, MCL-1, tanto por p53 selvagem ou mutado.

Recentemente, Kitamura e colaboradores (1999) observaram aumento de expressão da proteína BAK dependente de p53 em linhagens de glioblastoma submetidas a estresse oxidativo, sem aumento significativo de BAX ou BCL-2. Entretanto, Schoelch e colaboradores (1999) afirmam ter encontrado aumento significativo de níveis da proteína BAK, de acordo com a progressão da doença em casos de carcinomas espinocelulares orais e sugerem ainda que esse aumento seja independente do "status" de p53.

Os linfomas linfoblásticos apresentaram o mais alto nível de expressão para a proteína BAK. Apesar de outros tipos de linfoma mostrarem alto grau de expressão para essa proteína, em nosso estudo todos os casos de linfomas linfoblásticos mostraram três cruces de positividade, sugerindo um possível papel no comportamento agressivo desses tumores.

Não há dados na literatura sobre a expressão de BAK em LNH, entretanto, a expressão dessa proteína em outras neoplasias apresenta resultados ainda controversos: enquanto Krajewska et al (1996) revelaram baixos níveis de expressão de BAK em adenocarcinomas colorretais em relação a tecidos normais, Ogura et al (1999) detectaram aumento de expressão em 70% dos casos desses carcinomas. Por outro lado, Rochaix e colaboradores (1999) mostraram aumento de expressão em cerca de 70% dos casos de carcinoma de ducto mamário invasivo, enquanto Tomkova et al (1997) relatam 75% de casos com ausência de expressão para BAK em carcinomas baso-celulares cutâneos e afirmam que a perda de expressão de BAK, aliada a altos níveis de expressão de BCL-2, devam contribuir para a etiopatogenia dessas neoplasias.

Em geral, as células normais dificilmente expressam simultaneamente proteínas com a mesma função. A expressão simultânea de várias proteínas reguladoras da apoptose em LNH, sugere a desregulação do ciclo celular e apoptose. Os linfócitos "long-lived" devem passar por transição de expressão de diferentes proteínas reguladoras do ciclo celular e apoptose, e defeitos nesta transição podem induzir erros de recombinação homóloga nos linfomas.

Apesar da proteção das células contra morte por apoptose ser influenciada em grande parte pelos níveis de expressão de BCL-2 e BAX, mudanças pós-traducionais nos membros da família BCL-2 parecem ser também muito importantes. Por outro lado, alterações na tradução de *Bcl-2* também podem interferir no ciclo celular (Nicolaidis et al, 1998).

Todos os genes anti-apoptóticos da família de *Bcl-2* têm um potencial oncogênico e algumas mutações, inclusive na região promotora, provavelmente aumentam sua expressão direta ou indiretamente (Monni et al, 1999). Em células hematopoiéticas, oncoproteínas tais como MYB, Ras e AML1-ETO induzem expressão de *Bcl-2*. O reconhecimento de potenciais sítios de ligação para MYB (Ki-67) no promotor de *Bak* é interessante, uma vez que MYB (um fator de transcrição) tem sido implicado em apoptose pela ligação ao promotor de *bcl-2* com aumento de expressão de BCL-2 (Taylor et al, 1996; Frampton et al, 1996).

A resposta de células neoplásicas a sinais apoptóticos iniciados por drogas anti-câncer parece ser um reflexo das concentrações relativas de proteínas pró e anti apoptóticas, incluindo as da família BCL-2. Taxas relativas elevadas entre essas proteínas nas diversas doenças hematológicas devem contribuir para sua resistência a agentes quimioterápicos. (Wheaton et al, 1998).

Entendemos que a regulação do comportamento biológico de células circulantes como as de linhagens hematopoiéticas seja bem diferente da observada em células que vivem permanentemente em contato com células vizinhas e / ou com a matriz extra-celular. Diferentes tecidos possuem diferentes interações com diferentes tipos celulares e características (como adesão, longevidade, descamação, ciclo celular, apoptose, etc) podem ser compartilhadas ou não, conforme a função evolutiva de tais células e tecidos. Esse quadro complexo torna os LNH neoplasias com características únicas entre todas as outras, ou seja, cada novo clone neoplásico, por seu caráter circulante com alterações de apoptose e do ciclo celular, pode ser considerado uma metástase ambulante, limitando assim as abordagens terapêuticas para essas doenças.

Questiona-se a correlação entre a taxa de incidência de apoptose com o grau de malignidade (Takano et al, 1997; Wheaton et al, 1998; Sanchez et al, 1998; Nicolaidis et

al, 1998; Longsdon et al, 1999), no entanto é sabido que o envolvimento da apoptose em relação à atividade proliferativa varia de tumor para tumor

Os dados inéditos deste trabalho como a expressão aumentada de BAK e MCL-1 em LNH, associados ao aumento de expressão de BCL-2 e BAX, corroborando dados da literatura, sugerem que a expressão de proteínas reguladoras de apoptose devem estar implicadas na etiopatogenia e fisiopatologia dessas neoplasias. Estudos de regulação gênica dessas proteínas poderão indicar diferenças entre elementos responsivos desses homólogos alterando o controle da apoptose.

## ***Conclusão***

---

### Conclusão

A análise da expressão de proteínas reguladoras de apoptose em LNH mostrou:

- 1- A expressão aumentada da proteína anti-apoptótica BCL-2 em torno de 60% dos LNH.
- 2- Aumento de expressão proteína BAX e BAK (pró-apoptóticas) e MCL-1 (anti-apoptótica) mostraram um padrão de expressão aumentado em cerca de 90% dos casos estudados, sendo os dados para a proteína BAK inéditos na literatura.
- 3- Expressão diminuída de BAX em alguns poucos casos concomitante com menor expressão de BCL-2.

Dessa forma concluímos que estudos moleculares dos mecanismos de morte e sobrevivência celulares relacionados às proteínas reguladoras de apoptose da família BCL-2, nos diferentes tipos de linfomas, devem contribuir para um melhor entendimento na biologia dessas doenças com consequente melhora na abordagem terapêutica das mesmas.

## ***Referências Bibliográficas***

---

### Referências

- ALLSOPP TE, WYATT S, PATERSON HF, DAVIES AM: The proto-oncogene bcl-2 can selectively rescue neurotrophic factor-dependent neurons from apoptosis. *Cell* 73: 295-298, 1993.
- ANDERSON T; CHABNER BA; YOUNG RC; BERARD C & GARVIN AJ, SIMON RM; De VITA VT- Malignant lymphoma I. The histology and staging of 473 patients at the National Cancer Institute. *Cancer* 50: 2699-2707, 1982.
- ANTONSSON B, CONTI F, CIAVATTA A, MONTESSUIT S, LEWIS S, MARTINOU I, BERNASCONI L, BERNARD A, MERMOD J-J, MAZZEI G, MAUNDRELL K, GAMBALE F, SADOUL R AND MARTINOU J-C. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science*, 277: 370-372, 1997.
- BAFFY G, MIYASHITA T, WILLIAMSON JR, REED JC: Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL3) from an IL3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. *Journal of Biochemical Chemistry* 268: 6511-6515, 1993.
- BANKS PM. Diagnostic applications of an immunoperoxidase method in hematopathology. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 27: 1192-1194, 1979.
- BANKS, PM, WILLIAMS JW, BEUTLER E, ERSLEV AJ, LICHTMAN MA. Histopathology of malignant lymphomas. *Hematology*. 4th Ed, New York, McGraw-Hill Publishing Company: 1031-1039, 1990.
- BARCLAY AN; WILLIS AC and WILLIAMS AF. Lymphocyte specific heterogeneity in the rat leucocyte common antigen (T 200) is due to differences in polypeptide sequence near the NH<sub>2</sub>-terminus. *The EMBO Journal* 6: 1259-1264, 1987.
- BASERGA R. The Biology of cell reproduction, Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 1985.

### Referências

- BÈA S, RIBAS M, HERNÁNDEZ JM, BOSCH F, PINYOL M, HERNÁNDEZ L, GARCIA JL, FLORES T, GONZÁLEZ M, LÓPEZ-GUILLERMO A, PIRIS MA, CARDESA A, MONTSERRAT E, MIRÓ R and CAMPO E: Increased number of chromosome imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood* 93: 4365-4374, 1999.
- BENTZ M, WERNER CA, DOHNER H, JOOS S, BARTH TFE, SIEBERT R, SCHRODER M, STILGENBAUER S, FISCHER K, MOLLER P and LICHTER P: High incidence of chromosomal imbalances and gene amplifications in the classical follicular variant of follicle center lymphoma. *Blood* 88: 1437-1444, 1996.
- BHATIA K, GUTIERREZ MI and MAGRATH IT. A novel mutation in the p53 gene in a Burkitt's lymphoma cell line. *Human Molecular Genetics* 1: 207-208, 1992.
- BLAGOSKLONNY MV, GIANNAKAKOU P, EL-DEIRY WS, KINGSTON DGI, HIGGS PI, NECKERS L and FOJO T. Raf-1 Bcl-2 phosphorylation: a step from microtubule damage to cell death. *Cancer Research* 57: 130-136, 1997.
- BLAGOSKLONNY MV, SCHULTE TW, NGUYEN P, MIMNAUGH EG, TREPEL J and NECKERS L. Taxol induction of p21 Waf1 and p53 requires c-raf-1. *Cancer Research* 55: 4623-4627, 1995.
- BLANDINO G and STANO S. BCL-2: the pendulum of cell fate. *Journal of Experimental Clinical Cancer Research* 16(1): 3-10, 1997.
- BLUTH RF; CASEY TT & McCURLEY TL- Differentiation of reactive from neoplastic small-cell lymphoid aggregates in paraffin-embedded marrow particle preparations using L-26 (CD 20) and UCHL-1 (CD 45 RO) monoclonal antibodies. *American Journal of Clinical Pathology* 99: 150-156, 1993.
- BODRUG SE, AIME-SEMPE C, SATO T, KRAJEWSKI S, HANADA M, REED JC: Biochemical and functional comparisons of Mcl-1 and Bcl-2 proteins: Evidence for a novel mechanism of regulating Bcl-2 family protein function. *Cell Death and Differentiation* 2: 173-178, 1995.

### Referências

- BOISE LH, GONZALEZ-GARCIA M, POSTEMA CE, DING L, LINDSTEN T, TURKA LA, MAO X, NUNEZ G, THOMPSON CB: bcl-x, a bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74: 597-601, 1993.
- BORING, CC; SQUIRES, TS & TONG, T- Cancer statistics. *Cancer Journal of Clinics* 41: 19-36, 1991.
- BORNER MM, BROUSSET P, PFANNER-MAYER B, BACCHI M, VONLANTHEN S, HOTZ MA, ALTERMATT HJ, SCHLAIFER D, REED JC and BETTICHER DC. Expression of apoptosis regulatory proteins of the BCL-2 family and p53 in primary resected non-small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer* 79(5-6): 952-958, 1999.
- BRIZEL DM, WINER EP, PROZNITZ LR. Improved survival in advanced Hodgkin's disease with the use of combined modality therapy. *International Journal on Radiation Oncology and Biological Physics* 19:535-542, 1990.
- BROWN DC; HERYET A; GATTER KC; MANSON RA- The prognostic significance of immunophenotype in high grade non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 14: 621-627, 1989.
- BROWN TC; PETERS MV; BERGSAGEL DE & REID J- A retrospective analysis of clinical results in relation to the Rappaport histological classifications. *British Journal of Cancer* 31 (Suppl. II): 174-186, 1975.
- BRUIN PC; NOORDUYN AL; van der VALK P; van HEERDE P; van DIEST PJ; van de SANDT M; OSSENKOPPELE GJ.- Non-cutaneous T cell lymphomas. *Cancer* 71: 2604-2612, 1993.
- BRUMINI, R (Ed.)- Câncer no Brasil: dados histopatológicos (1976-1980). Rio de Janeiro, Cia Nac. Combate Câncer, Min. Saúde, 1982.
- CARTUN RW; COLES FB & PASTUSZAK WT- Utilization of monoclonal antibody L-26 in the identification and confirmation of B cell lymphomas. A sensitive and specific marker applicable to formalin and B5 fixed, paraffin embedded tissues. *American Journal of Pathology* 129: 415-421, 1987.
- CATOVSKY D- Immunological markers. Catovsky D, Foa R, (Eds.) *The lymphoid leukaemias*. 1th Ed, London, Butterworths: 2-31, 1990.

### Referências

- CHADBURN A; HUSAIN S and KNOWLES DM- Monoclonal antibody OPD4 detects neoplastic T cells but does not distinguish between CD4 and CD8 neoplastic T cells in paraffin sections. *Human Pathology* 23: 940-947, 1992.
- CHAO DT LINETTE GP, BOISE LH, WHITE LS, THOMPSON CB, KORSMEYER SJ: Bcl-XL and Bcl-2 repress a common pathway of cell death. *Journal of Experimental Medicine* 182: 821-827, 1995.
- CHEN CY and FALLER DV: Phosphorylation of BCL-2 protein and association with p21Ras in Ras induced apoptosis. *Journal of Biochemical Chemistry* 271: 2376-2379, 1996.
- CLARK JR; WILLIAMS ME and SWERDLOW SH. Detection of B and T cells in paraffin-embedded tissue sections. Diagnostic utility of commercially obtained 4KB5 and UCHL-1. *American Journal of Clinical Pathology* 93: 53-69, 1990.
- CLEARY ML and SKLAR J. Nucleotide sequence of t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 82; 7439-7443, 1985.
- CLEARY ML, SMITH SD and SKLAR J: Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2 immunoglobulin transcript resulting from the t(14-18) translocation. *Cell* 47: 19-28 (1986).
- COIFFER B; BERGER F; BRYON PA and MAGAND JP- T cell lymphomas immunologic, histologic, clinical and therapeutic analyses of 63 cases. *Journal of Clinical Oncology* 6: 1584-1589, 1988.
- COIFFER B; BROWSE N; PENCHMAUR M; BERGER F; BRYON PA and DIEBOLD J. Peripheral T cell lymphomas have a worse prognosis than B cell lymphomas: a prospective study of 361 immunophenotyped patients treated with the LNH84 regimen. *Annual Oncology* 1: 45-50, 1990.

### Referências

- COSMANN J; JAFFE ES & FISCHER KI- Immunological phenotypes of diffuse, aggressive non-Hodgkin's lymphomas: correlation with clinical features. *Cancer* 54: 1310-1317, 1984.
- COTTER F, PRICE C, ZUCCA E AND YOUNG BD: Direct sequence analysis of the 14 q+ and 18q- chromosome junctions in follicular lymphoma. *Blood* 76: 131-135, 1990.
- CRAIG RW, JABS EW, ZHOU P, KOZOPAS KM, HAWKINS AL, ROCHELLE JM, SELDIN MF and GRIFFIN CA: Human and mouse mapping of the Myeloid Cell Leukemia-1 gene: MCL-1 maps to human chromosome 1q21, a region that is frequently altered in preneoplastic and neoplastic disease. *Genomics* 23: 457-463, 1994.
- CUNNINGHAM-RUNDLES C; SIEGAL FP; CUNNINGHAM-RUNDLES S & LIEBERMAN P. Incidence of cancer in 98 patients with common variable immunodeficiency. *Journal of Clinical Immunology* 7: 294-301, 1987.
- DATTA R, MANOME Y, TANEJA N, BOISE LH, WEISHSELBAUM R, THOMPSON CB, SLAPAK CA, KUFER D: Overexpression of Bcl-XL by cytotoxic drug exposure confers resistance to ionizing radiation-induced internucleosomal DNA fragmentation. *Cell Growth and Differentiation* 6: 363, 1995.
- DAVEY FR; GATTER KC; RALFKIAER E; PULFORD KAF; KRISSANSEN GW & MANSON DY- Immunophenotyping of non-Hodgkin's lymphomas using a panel of antibodies on paraffin-embedded tissues. *American Journal of Pathology* 129: 54-63, 1987.
- DEBBAS M, WHITE E: Wild type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Development* 7: 546-549, 1993.
- DECAUDIN D, GELEY S, HIRSCH T, CASTEDO M, MARCHETTI P, MACHO A, KOFLER R and KROEMER G. Bcl-2 and bcl-X-L antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Research* 57: 62-67, 1997.

### Referências

- DESOIZE B: Anticancer drug resistance and inhibition of apoptosis. *Anticancer Research* 14: 2291-2297, 1994.
- DEVESSE, SS and FEARS, T- Non-Hodgkin's lymphoma time trends: United States and international data. *Cancer Research* 52 (suppl.): 5432s-5440s, 1992.
- DEVESSE SS, SILVERMAN DT, YOUNG JL, POLLACK ES, BROWN CC, HORM JW, PERCY CL, MYERS MH, NICKAY FW and FRAUMARIJ F. Cancer incidence and mortality trends among whites in the United States, 1947-1984. *Journal of National Cancer Institutes* 79: 701-779, 1987.
- ELGHETANY MT; KUREC AS; SCHUEHFER MS; FORBES BA; DUGGAN DB and DAVEY FR. Immunophenotyping of non-Hodgkin's lymphomas in paraffin-embedded tissue sections. A compararison with genotypic analysis. *American Journal of Clinical Pathology* 95: 517-525, 1991.
- ERSBOLL J and SCHULTZ HB. Non-Hodgkin's lymphomas: Recent concepts on classification and treatment. *European Journal of Haematology* 48: 15-29, 1989.
- ERSBOLL J, SCHULTZ HB, HONGAARD P, NISSEN NL, HOU-JESEN K. Comparison of the Working Formulation of LNH with the Rappaport, Kiel, and Lukes & Collins Classification. Translational value and prognostic Significance Based an Review of 658 Patients Treated at a Single Institution. *Cancer* 55: 2442-2458, 1985.
- FABIAN C, DAHLBERG S, MILLER T. Efficacy of low dose involved field XRT in producing and maintaining CR following PR induction with MOP-BAP chemotherapy in Hodgkin's disease. Results of Southwest Oncology Group Study 7808. *Proceedings of American Society of Clinical Oncology* 8: 253-257, 1989.
- FALINI B and TAYLOR CR- New developments in immunoperoxidase techniques and their applications. *Archives on Pathological Laboratory Medicine* 107: 105-117, 1983.
- FEARON ER, VOGELSTEIN B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767, 1990.

### Referências

- FILIPOVICH AH, MATHUR A, KAMAT D and SHAPIRO RS. Primary immunodeficiencies: genetic risk factors for lymphoma. *Cancer Research* 52 (suppl.): 5465-5472, 1992.
- FISHER RI, GAYNOR ER and DAHLBERG S. Comparison of standard regimens (HOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced Non-Hodgkin's lymphoma. *The New England Journal of Medicine* 328:1002-1006, 1993.
- FITCHETT M, GRIFFITHS MJ, OSCIER DG, JOHNSON S and SEABRIGHT M: Chromosome abnormalities involving band 13q14 in haematologic malignancies. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 24: 143-150, 1987.
- FLEIS JL. Statistical methods for rates and proportions. 2<sup>nd</sup> edition, John Wiley & Sons Inc, New York, 1981.
- FRAMPTON J, RAMQVIST T and GRAFT T: V-myb of E26 leukemia virus upregulates bcl-2 and suppresses apoptosis in myeloid cells. *Genes Development* 10: 2720- 2731, 1996.
- FUNG Y-K T, T'ANG A, MURPHREE AL, ZHANG F-H, QIU W-R, WANG S-W, SHI X-H, LEE L, DRISCOLL B and WU K-J. The Rb gene suppresses the growth of normal cells. *Oncogene* 8: 2659-2663, 1993.
- GAJEWSKI TF and THOMPSON CB: Apoptosis meets signal transduction: Elimination of a BAD influence. *Cell* 87: 589-592, 1996.
- GASCOYNE R, ADOMAT S, KRAJEWSKI S: Prognostic significance of bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 90: 244-251, 1997.
- GASCOYNE RD, Krajewska M, Krajewski S, Connors JM and Reed JC. Prognostic significance of Bax protein expression in diffuse aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood* 90: 3173-3178, 1997.

### Referências

- GHIA P, BOUSSIOTIS VA, SCHULTZE JL, CARDOSO AA, DORFMAN DM, GRIBBEN JG, FREEDMAN AS, and NADLER LM. Unbalanced expression of Bcl-2 family proteins in follicular lymphoma: contribution of CD40 signaling in promoting survival. *Blood* 91: 244-251, 1998.
- GIANNI AM, BREGNI M, SIENA S. 5-year update of the Milan cancer institute randomized trial of high-dose sequential (HDS) vs MACOP-B therapy for diffuse large cell lymphomas. *Proceedings of American Society for Clinical Oncology* 13: 1263-1267, 1994.
- GONZALEZ-GARCIA M, PEREZ-BALLESTERO R, DING L, DUAN L, BOISE LH, THOMPSON CB, NUNEZ G. Bcl-X-L is the major bcl-X mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria. *Development* 120: 3033-3038, 1994.
- GREEN DR and REED JC: Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1326, 1998.
- GREINER TC, MOYNIHAN MJ, CHAN WC, LYTLE DM, PEDERSEN A, ANDERSON JR, WEISENBURGER DD: P53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood* 87: 4302-4308, 1996.
- HAGENBEEK A, CARDE P, SOMERS R et al: Maintenance of remission with human recombinant alpha-2 interferon (Roferon-A) in patients with stage III and IV low grade malignant non-Hodgkin's lymphoma. Results from a prospective randomised phase III clinical trial in 331 patients. *Blood* 10 (suppl 1): 288-295, 1992.
- HALDAR S, JENA N, and CROCE CM. Inactivation of bcl-2 by phosphorylation. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* 92: 4507-4511, 1995.
- HALDAR S., BASU A., CROCE CM. Bcl-2 is the guardian of microtubule integrity. *Cancer Research* 57: 229-233, 1997.
- HANADA M, DELIA D, AIELLO A, STADTMAUER E and REED JC: Bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 82: 1820-1828, 1993.

### Referências

- HARRINGTON EA, BENETT MR, FANIDI A, EVAN GI: c-myc induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines. *The EMBO Journal* 13: 3286-3291, 1994.
- HERMINE O, HAIOUN C, LEPAGE E: Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 87: 265-272, 1996.
- HERNANDEZ L, FEST T, CAZORLA M, TERUYA-FELDSTEIN J, BOSCH F, PEINADO MA, PIRIS MA, MONTSERRAT E, CARDESA A, JAFFE ES, CAMPO E, RAFFOLD M: P53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* 87: 3351- 3357, 1996.
- HILL ME, MacLENNAN KA, CUNNINGHAM DC: Prognostic significance of Bcl-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 90: 244-251, 1996.
- HOCKENBERY DM, OLTVAI ZN, YIN X-M, MILLIMAN CL, KORSMEYER SJ: Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75: 241, 1993.
- HOCKENBERY DM, ZUTTER M, HICKEY W, NHM M and KORSMEYER SJ. BCL-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* 88: 6961-6968, 1991.
- HOGHART LA and HALL AG: Increased BAX expression is associated with increased risk of relapse in childhood acute lymphocytic leukemia. *Blood* 93: 2671-2678, 1999.
- HUA C, ZORN S, JENSEN JP et al. Consequences of the t(14;18) chromosomal translocation in follicular lymphoma: deregulation expression of a chimeric and mutated bcl-2 gene. *Oncogene Research* 2: 263-275, 1988.
- IBRADO A M, LIU L and BHALLA K. BCL-XL overexpression inhibits progression of molecular events leading to paclitaxel-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia. *Cancer Research* 57: 1109-1115, 1997.
- ICHIKAWA A, HOTTA T, TAKAGI N: Mutations of p53 gene and their relation to disease progression in B-cell lymphoma. *Blood* 79: 2701-2707, 1992.

Referências

- ICHIKAWA A, KINOSHITA T, WATANABE T, KATO H, NAGAI H, TSUSHITA K, SAITO H, and HOTTA T: Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. *The New England Journal of Medicine* 337: 529-534, 1997.
- JACOBSON MD, BURNE JF, KING MP, MIYASHITA T, REED JC, RAFF MC: Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* 361: 365-369, 1993.
- KIRSCH IR, MORTON CC, NAKAHARA K AND LEDER P: Human immunoglobulin heavy chain genes map to a region of translocations in malignant B-lymphocytes. *Science* 216: 301-303, 1982.
- KITAMURA Y, OTA T, MATSUOKA Y, TOOYAMA I, KIMURA H, SHIMOHAMA S, NOMURA Y, GEBICKE-HAERTER PJ, TANIGUCHI T. Hydrogen peroxide-induced apoptosis mediated by p53 protein in glial cells. *Glia* 25(2): 154-164, 1999.
- KNOWLES DM, ATHAN E, UBRIACO A et al: Extranodal noncutaneous lymphoid hyperplasias represent a continuous spectrum of B-cell neoplasia: Demonstration by molecular genetic analysis. *Blood* 73: 1635-1645, 1989.
- KORSMEYER SJ. Chromosomal translocation in lymphoid malignancies reveal novel protooncogenes. *Annual Review of Immunology* 10: 785-807, 1992.
- KORSMEYER SJ: Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: Regulators of cell death. *Blood* 80: 879-885, 1992.
- KRAJEWSKA M, KRAJEWSKI S, EPSTEIN JI, SHABAIK A, SAUVAGEOT J, SONG K, KITADA S and REED JC. Immunohistochemical analysis of BCL-2, BAX, BCL-X and MCL-1 expression in prostate cancers. *American Journal of Pathology* 148: 1567-1576, 1996.
- KRAJEWSKA M, MOSS SF, KRAJEWSKI S, SONG K, HOLT PR and REED JC.: Elevated Expression of Bcl-X and reduced Bak in primary colorectal adenocarcinomas. *Cancer Research* 56: 2422-2427, 1996.

### Referências

- KRAJEWSKI S, BODRUG S, GASCOYNE R, BEREAN K, KRAJEWSKA M and REED JC. Immunohistochemical analysis of Mcl-1 and Bcl-2 proteins in normal and neoplastic lymph nodes. *American Journal of Pathology* 145: 515-525, 1994.
- KRAJEWSKI S, BODRUG S, KRAJEWSKA M, SHABAIK A, GASCOYNE R, BEREAN K and REED JC: Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. *American Journal of Pathology* 146: 1309-1319, 1995.
- KRAJEWSKI S, KRAJEWSKA M and REED JC: Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of BAK expression , a proapoptotic member of the BCL-2 protein family. *Cancer Research* 56(12): 2849-2855, 1996.
- KRAJEWSKI S, KRAJEWSKA M, SHABAIK A, MIYASHITA T, WANG HG and REED JC. Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *American Journal of Pathology* 145: 1323-1327, 1994.
- KRAJEWSKI S, KRAJEWSKA M, SHABAIK A, WANG H-G, IRIE S, FONG L, REED JC: Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-X expression. *Cancer Research* 54: 5501-5505, 1994.
- KRAJEWSKI S, TANAKA S, TAKAYAMA S, SCHIBLER MJ, FENTON W, REED JC: Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: Residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Research* 53: 4701, 1993.
- KRAMER M, HERMANS J, PARKER J: Clinical significance of Bcl-2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population based study. *Journal of Clinical Oncology* 14: 2131-2138, 1996.
- KROEMER G: The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Medicine* 3: 614-621, 1997.
- LAM M, KUBIAK G, CHEN L, NUNEZ G, MIESFELD RL, DISTELHORST CW: Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated  $Ca^{++}$  fluxes. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* 91: 6569-6573, 1994.

### Referências

- LEONARD CJ, CANMAN CE and KASTAN MB. The role of p53 in cell-cycle control and apoptosis: Implications for cancer. *Important Advances in Oncology*: 33-41, 1995.
- LEVINE B, HUANG Q, ISAACS JT, GRIFFIN DE, HARDWICK M: Conversion of lytic to persistent alphavirus infection by the bcl-2 cellular oncogene. *Nature* 361: 739-741, 1993.
- LIU X, KIM C, YANG J and WANG X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome "c". *Cell* 86: 147-152, 1994.
- LOGSDON MD, MEYN RE Jr, BESA PC, PUGH WC, STEPHENS LC, PETERS LJ, MILAS L, COX JD, CABANILLAS F, BRISBAY S, ANDERSEN M, McDONNELL TJ: Apoptosis and the Bcl-2 gene family: patterns of expression and prognostic value in stage I and II follicular center lymphoma. *International Journal of Radiation Biology and Physics* 44: 19-29, 1999.
- LOMO J, SMELAND EB, KRAJEWSKI S, REED JC and BLOMHOFF HK: Expression of the Bcl-2 homologue correlates with survival of peripheral blood B lymphocytes. *Cancer Research* 56: 40-43, 1996.
- LOVEC H, GRZESCHICZEK, KOWALSKI MB, MOROY T: Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. *The EMBO Journal* 13: 3487-3991, 1994.
- LOWE SW, RULEY HE, JACKS T, HOUSMAN DE: p-53 dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74: 957-962, 1993.
- MARIN MC, HSU B, STEPHENS LC, BRISBAY S, MC DONNELL TJ: The functional basis of c-myc and bcl-2 complementation during multistep lymphomagenesis in vivo. *Experimental Cell Research* 217: 240-244, 1995.
- MARRA V e SOUZA MHFO: Linfomas não-Hodgkin: Classificação e terapêutica atualizados. *Revista IEHE* 14 (suplemento): 27-35, 1997.
- MAY WS, TYLER PG, ITO T, ARMSTRONG, DK, QATSHA KA, DAVIDSON NE. *Journal of Biochemical Chemistry* 269: 6865-6872, 1994.

### Referências

- MC DONELL TJ, KORSMEYER SJ: Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature* 349: 6306-6309, 1991.
- MC DONNELL TJ, DEANE N, PLATT EM. Bcl-2 immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B-cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 57: 79-88, 1989.
- MC MANAWAY ME, NECKERS LM, LOKE SL. Tumour-specific inhibition of lymphoma growth by an antisense oligodeoxynucleotide. *The Lancet* 335: 808-811, 1990.
- MEIJERINK JPP, MENSINK EJB, WANG K, SEDLAK TW, SLOETJES AW, DE WITTE T, WAKSMAN G, KORSMEYER SJ. Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood* 91: 2991-2998, 1998.
- MENDELSON ML: Autoradiographic analysis of cell proliferation in spontaneous breast cancer of C3H mouse. The growth fraction. *Journal of The National Cancer Institute* 28: 1015-1029, 1992.
- MIYASHITA T, KRAJEWSKI S, KRAJEWSKA M, WANG HG, LIN HK, LIEBERMANN DA, HOFFMAN B, REED JC: Tumor suppressor p53 is regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9:1799-1805, 1994.
- MIYASHITA T and REED JC: Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human *bax* gene. *Cell* 80: 293-299, 1995.
- MIYASHITA T, REED JC: Bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer Research* 52: 5407-5411, 1992.
- MONAGHAN P, ROBERTSON D, AMOS T, DYER M, MASON D, GREAVES M. Ultrastructural localization of Bcl-2 protein. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 40: 1819-1824, 1992.
- MONNI O, FRANSSILA K, JOENSUU H and KNUUTILA S. BCL-2 overexpression in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukaemia and Lymphoma* 34(1-2): 45-52, 1999.

### Referências

- MUSLIN AJ, TANNER JW, ALLEN PM, SHAW AS. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* 84: 889-897, 1996.
- NEWCOMB EW: P53 gene mutations in lymphoid diseases and their possible relevance to drug resistance. *Leukemia and Lymphoma* 17: 211-221, 1994.
- NGUYEN M, MILLAR DG, YONG VW, KORSMEYER SJ, SHORE GC: Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *Journal of Biochemical Chemistry* 268: 25265-25261, 1993.
- NICOLAIDES C, DIMOU S, PAVLIDIS N: Prognostic factors in aggressive Non Hodgkin's Lymphomas. *The Oncologist* 3: 189-197, 1998.
- NIELSEN M, KAESTEL CG, ERIKSEN KW, WOETMANN A, STOKKEDAL T, KALTOFI K, GEISLER C, ROPKE C, ODUM N: Inhibition of constitutively activated Stat3 correlates with altered Bcl-2/Bax expression and induction of apoptosis in mycosis fungoides tumor cells. *Leukemia* 13: 735-738, 1999.
- NUNEZ G, LONDON L, HOCKENBERY D, ALEXANDER M, MC KEARN J, KORSMEYER SJ: Deregulation bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *Journal of Immunology* 144: 3602-3608, 1990.
- NUNEZ G, SETO M, SEREMETIS S et al (1989) Growth- and tumour-promoting effects of deregulated BCL-2 in human B-lymphoblastoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 86: 4589-4593, 1989.
- OGURA E, SENZAKI H, YAMAMOTO D, YOSHIDA R, TAKADA H, HIOKI K and TSUBARA A: Prognostic significance of Bcl-2, Bcl-x L/S, Bax and Bak expression in colorectal carcinomas. *Oncology Report* 6: 365-369, 1999.
- OLTVAI ZN, MILLIMAN CL, KORSMEYER SJ: Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, That accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-614, 1993.

### Referências

- PEARSON GR, LUKA J, PETT L et al: Identification of an Epstein-Barr virus gene encoding a second component of the restricted early antigen complex. *Virology* 82: 7439-7443, 1987.
- PENG H, AIELLO A, PACKHAM G, ISAACSON PG and PAN L: Infrequent bax gene mutations in b-cell lymphomas. *Journal of Pathology* 186: 378-382, 1998.
- PEPPER C, BENTLEY P, HOY T: Regulation of clinical chemoresistance by bcl-2 and bax oncoproteins in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *British Journal of Haematology* 95: 513-517, 1996.
- PEZELLA F, MORRISON H, JONES M: Immunohistochemical detection of p53 and bcl-2 proteins in Non Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 22: 39-44, 1993.
- PEZZELLA F, TSE AGD, CORDELL JL: Expression of the Bcl-2 oncogene protein is not specific for 14;18 chromosomal translocation. *American Journal of Pathology* 137: 225-232, 1990.
- PIRIS M, PEZELLA F, MARTINEZ-MONTERO J: p53 and bcl-2 in high-grade B-cell lymphomas: correlation with the survival time. *British Journal of Cancer* 69: 337-341, 1994.
- POHL U, WAGENKNECHT B, NAUMANN U, WELLER M. p53 enhances Bak and CD95 expression in human malignant glioma cells but does not enhance CD95L-induced apoptosis. *Cell Physiology and Biochemistry* 9(1): 29-37, 1999.
- RAO L, DEBBAS M, SABBATINI P, HOCKENBERY D, KORSMEYER S, WHITE E: The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19kDA and Bcl-2 proteins. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* 89: 7742-7751, 1992.
- REED JC, CUDDY M, SLABIAK T, CROCE CM and NOWELL PC: Oncogenic potential of bcl-2 demonstrated by gene transfer. *Nature* 336: 259-261, 1988.
- REED JC, KITADA S, TAKAYAMA S, MIYASHITA T: Regulation of chemoresistance by the BCL-2 oncoprotein in non-Hodgkin's lymphoma and lymphocytic leukemia cell lines. *Annals of Oncology* 5: 61-67, 1994.

### Referências

- REED JC. Double identity for the proteins of Bcl-2 family. *Nature* 387: 773-781, 1997.
- REED JC. Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia: implications for therapy. *Seminars in Hematology* 35 (suppl 3): 3-13, 1998.
- REED JC. Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Current Opinions on Oncology* 7: 541-546, 1995.
- REYNOLDS JE, YANG T, QIAN L, JENKINSON JD, ZHOU P, EASTMAN A, CRAIG RW: Mcl-1, a member of the Bcl-2 family, delays apoptosis induced by c-Myc overexpression in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Research* 64: 6348-6353, 1994.
- ROCHAIX P, KRAJEWSKI S, REED JC, BONNET F, VOIGT JJ and BROUSSET P: In vivo patterns of BCL-2 family protein expression in breast carcinomas in relation to apoptosis. *Journal of Pathology* 187 (4): 410-415, 1999.
- SANCHEZ E, CHACON I, PLAZA MM, MUNÓZ E, CRUZ MA, MARTINEZ B, LOPEZ L, MARTINEZ-MONTERO JC, ORRADRE JL, SAEZ AI, GARCIA JF, PIRIS MA: Clinical outcome in Diffuse Large B-Cell Lymphoma is dependent on the relationship between different cell-cycle regulator proteins. *Journal of Clinical Oncology* 16: 1931-1939, 1998.
- SCHLAIFER D, KRAJEWSKI S, GALOIN S, RIGAL-HUGUET, LAURENT G, MASSIP P, PRIS J, DELSOL G, REED JC and BROUSSET P. Immunodetection of apoptosis-regulating proteins in lymphomas from patients with and without Human Immunodeficiency Virus infection. *American Journal of Pathology* 149: 177-185, 1996.
- SCHOELCH ML, LE QT, SILVERMAN S Jr, McMILLAN A, DEKKER NP, FU KK, ZIOBER BL, REGEZI JA. Apoptosis-associated proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 35(1): 77-85, 1999.
- SCHWARTZ MA and INGBER DE. Integrating with integrins. *Molecular Biology of the Cell* 5: 389-392, 1993.
- SEDLAK TW, OLTVAI ZN, YANG E, WANG K, BOISE LH, THOMPSON CB,

### Referências

- KORSMEYER SJ: Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92: 7834, 1995.
- SELVAKUMARAN M , LIN HK, MIYASHITA T , WANG HG, KRAJEWSKI S, REED JC, HOFFMANN B, LIEBERMANN D: Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF Beta 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene* 9: 1791-1795, 1994.
- SETO M, JAEGER U, HOCKETT RD: Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of bcl-2/Ig fusion gene in lymphoma. *The EMBO Journal* 7: 123-131, 1988.
- SHIBASAKI F, KONDO E, AKAGI T, McKEON F: Suppression of signalling through transcription factor NF-AT by interactions between calcineurin and Bcl-2. *Nature* 386: 728-731, 1997.
- SIMPSON AJG: A genética molecular de sarcomas de partes moles e sua aplicação à clínica. *Acta Oncológica Brasileira* Vol. 18-nr1: 15-23, 1998.
- SOINI Y, RAUNIO H, PAAKKO P: High-grade malignant non-Hodgkin's lymphomas differ from low-grade lymphomas in the extent of apoptosis and their expression of bcl-2, mcl-1, bax and p53. *Tumour Biology* 19: 176-185, 1998.
- STEWART, B.W. Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical and cellular factors. *J. Natl. Cancer Inst.*, 86: 1286-1295, 1994.
- SUBRATA H, CHINTAPALLI J and CROCE CM: Taxol induces Bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells. *Cancer Res.* 56: 1253-1255, 1996.
- TAKANO Y, SAEGUSA M, IKENAGA M AND OKAYASU I. Apoptosis and proliferative activity of non-Hodgkin's lymphomas: comparison with expression of Bcl-2, p53 and c-myc proteins. *Pathology International* 47: 90-94, 1997.
- TAYLOR D, BADIANI P, and WESTON K: A dominant interfering Myb mutant causes apoptosis in T cells. *Genes Development* 10: 2732-2744, 1996.

Referências

- TOMKOVA H, FUJIMOTO W and ARATA J: Expression of BCL-2 antagonist BAK in inflammatory and neoplastic skin diseases. *British Journal of Dermatology* 137: 703-708, 1997.
- TSUJIMOTO Y: Overexpression of the human bcl-2 gene product results in growth enhancement of epstein-Barr virus-immortalized B cells. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* 86: 1958-1962, 1989.
- TYCKO B AND SKLAR J: Chromosomal translocations in lymphoid neoplasia: a reappraisal of the recombinase model. *Cancer Cells* 1: 1-8, 1995
- ULRICH E, KAUFFMANN-ZEH A, HUEBER A-O, WILLIAMSON J, CHITTENDEN T and EVAN G. Gene structure, cDNA sequence, and expression of murine BAK, a proapoptotic BCL-2 family member. *Genomics* 44: 195-200, 1997.
- VAUX DL, AGUILA HL, WEISSMAN IL: Bcl-2 prevents death of factor-deprived cells but fails to prevent apoptosis in targets of cell mediated killing. *International Immunology* 4: 821-827, 1992.
- WANG HG, RAPP UR and REED JC. *Cell* 87: 589-593, 1996.
- WHEATON S, NETSER J, GUINEE D, RAHN M and PERKINS S: BCL-2 and BAX protein expression in indolent versus aggressive B-cell Non-Hodgkin's lymphomas. *Human Pathology* 29: 820-825, 1998.
- WHITE, E. Life, death and the pursuit of apoptosis. *Genes Development* 10: 1-15, 1996.
- WILLIAMS GT: Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* 65: 1097-1098, 1991.
- WINTER JN, ANDERSEN J, REED JC, KRAJEWSKI S, VARIAKOJIS D, BAUER KD, FISHER RI, GORDON LI, OKEN MM, JIANG S, JEFFRIES D, DOMER P: Bcl-2 expression correlates with lower proliferative activity in the intermediate- and high-grade non-Hodgkin's lymphomas: An eastern cooperative oncology group and southwest oncology group cooperative laboratory study. *Blood* 91: 1391-1398, 1998.

Referências

- YAMADA T, YAMAOKA S, GOTO T, NAKAI M, TSUJIMOTO Y, HATANAKA M:  
The human T-Cell leukaemia virus type I Tax protein induces apoptosis which is blocked by the Bcl-2 protein. *Journal of Virology* 68: 3374-3379, 1994.
- YANG E, KORSMEYER J: Molecular thanatopsis: A discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood* 88: 386-391, 1996.
- YIN X-M, OLTVAI ZN, KORSMEYER SJ: BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369: 321-325, 1994.
- ZAMZAMI N, SUSIN A, MARCHETTI P, HIRSCH T, GOMEZ-MONTERREY I, CASTEDO M and KROEMER G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 183: 1533-1537, 1996.
- ZHAN Q, BIESZCZAD CK, BAE I, FORNACE AJ Jr and CRAIG RW. Induction of BCL-2 family member MCL-1 as an early response to DNA damage. *Oncogene* 14(9): 1031-1039, 1997.
- ZHOU P, QIAN L, BIESZCZAD CK, NOELLE R, BINDER M, LEVY NB and CRAIG RW. MCL-1 in transgenic mice promotes survival in a spectrum of hematopoietic cell types and immortalization in the myeloid lineage. *Blood* 92: 3226-3239, 1998.
- ZHOU P, QIAN L, KOZOPAS KM and CRAIG RW. MCL-1, a BCL-2 family member, delays the death of hematopoietic cells under a variety of apoptosis-inducing conditions. *Blood* 89: 630-643, 1997.

*Anexos*

---

**Tabela 1.** LNH- Baixo Grau de Malignidade

|    | <b>BCL2</b> | <b>BAX</b> | <b>BAK</b> | <b>MCL 1</b> | <b>Diagnóst.</b> |
|----|-------------|------------|------------|--------------|------------------|
| 1  | 2           | 2          | 3          | 3            | LLC              |
| 2  | -           | 3          | 3          | 3            | LLC              |
| 3  | 2           |            | 3          | 3            | LLC              |
| 4  | 2           | 2          | 3          | 3            | LLC              |
| 5  | -           | -          | 3          | 3            | LLC              |
| 6  | 3           | 3          | -          | 2            | LLC              |
| 7  | 1           | 2          | 3          | 2            | IC               |
| 8  | 1           | 2          | 3          | 3            | IC               |
| 9  | 1           | -          | 3          | 3            | IC               |
| 10 | 2           | 2          | 3          | 3            | IC               |
| 11 | 3           | 3          | 3          | 3            | IC               |
| 12 | 1           | 3          | 3          | 3            | IC               |
| 13 | -           | -          | 2          | 3            | IC               |
| 14 | 2           | 2          | 3          | 3            | IC               |
| 15 | 3           | 3          | 3          | 3            | IC               |
| 16 | 2           | 2          | 2          |              | IC               |
| 17 | 1           | 3          | 3          | 3            | IC               |
| 18 | 1           | -          | 2          | 3            | IC               |
| 19 | 2           | 2          | 2          |              | IC               |
| 20 | 2           | 3          | 3          | 3            | MCFTlow          |
| 21 | 3           | -          | 3          | 3            | LCM              |

LLC- leucemia linfóide crônica

IC- imunocitoma

IC B - imunocitoma de células B

MCF- micose fungóide (linfoma T de baixo grau)

LCM-linfoma de células do manto

**Tabela 2.** LNH-Grau Intermediário de Malignidade

|    | <b>BCL2</b> | <b>BAX</b> | <b>BAK</b> | <b>MCL 1</b> | <b>Diagnóst</b> |
|----|-------------|------------|------------|--------------|-----------------|
| 1  | 3           | 3          | 3          | 3            | LF              |
| 2  | 1           | 3          | -          | 3            | LF              |
| 3  | 3           | 3          | 3          | 3            | LF              |
| 4  | 2           | 3          | 2          | 2            | LF              |
| 5  | 2           | 3          | -          | 3            | LF              |
| 6  | 2           | 3          | 3          | 2            | LF              |
| 7  | 3           | 3          |            | 2            | LF              |
| 8  | 1           | 3          | 2          | 3            | LF              |
| 9  | -           | 3          |            | 3            | LF              |
| 10 | 3           | 2          | 2          | 2            | LF              |

LF - linfoma folicular = CBCC FOL -Linfoma de células centroblásticas e centrocíticas de arranjo folicular.

**Tabela 3.** LNH- Alto Grau de Malignidade

|    | <b>BCL2</b> | <b>BAX</b> | <b>BAK</b> | <b>MCL 1</b> | <b>Diagnóst.</b> |
|----|-------------|------------|------------|--------------|------------------|
| 1  | 2           | 2          |            | 3            | B                |
| 2  | 1           | 3          | 3          | 3            | B                |
| 3  | -           | 3          | 2          | 3            | B                |
| 4  | 1           | 3          | 3          | 3            | B                |
| 5  | -           | 3          | 3          | 3            | B                |
| 6  | 2           | 3          | 3          | 2            | B                |
| 7  | 3           | 2          | -          | 2            | B                |
| 8  | -           | 3          | 2          | 2            | B                |
| 9  | 1           | 2          |            | 2            | B                |
| 10 | -           | 3          | 2          | 2            | B                |
| 11 | -           | 3          |            | 2            | B                |
| 12 | 1           | 3          | 3          | 3            | B                |
| 13 | 1           | 1          | 3          |              | B                |
| 14 | 1           | 3          |            |              | B                |
| 15 | -           | 2          |            |              | B                |
| 16 | -           | 3          |            |              | B                |
| 17 | 2           | 3          | 3          | 2            | B                |
| 18 | 2           | 3          | 3          | 3            | B                |
| 19 | 1           | 3          |            |              | B                |
| 20 | 1           | 3          |            |              | B                |
| 21 | -           | 2          |            |              | B                |
| 22 | 1           | 2          | 2          | 3            | B                |
| 23 | 2           | 3          | 3          | 2            | B                |
| 25 | -           | 2          | 3          | 3            | B                |
| 26 | 1           | 2          |            |              | B                |
| 27 | 2           | 2          |            |              | B                |
| 28 |             | 2          |            |              | B                |
| 29 | 1           | 3          |            |              | B                |

**Tabela 3 Continuação.** LNH- Alto Grau de Malignidade

|    | <b>BCL2</b> | <b>BAX</b> | <b>BAK</b> | <b>MCL 1</b> | <b>Diagnóst.</b> |
|----|-------------|------------|------------|--------------|------------------|
| 30 | -           | 2          | 2          | 3            | B                |
| 32 | -           | 2          | 2          |              | B                |
| 33 | 1           | -          | 2          |              | B                |
| 34 | 2           | 3          | 2          | 3            | B                |
| 35 | 3           | 2          | 2          | 3            | B                |
| 36 | -           | -          | -          | 1            | B                |
| 37 | -           | -          | -          | 3            | B                |
| 38 | 2           | 3          | 3          | 3            | B                |
| 39 | -           | 2          |            | 3            | B                |
| 40 |             | -          |            | -            | B                |
| 41 | 2           | 3          |            |              | B                |
| 42 | 3           | 3          |            | 3            | B                |
| 43 | -           | 3          | 2          |              | B                |
| 44 | -           | 2          | 2          | 3            | B                |
| 45 | 2           | 3          | 2          | 2            | B                |
| 46 | -           | 3          |            | 2            | B                |
| 47 | -           | 3          |            |              | B                |
| 48 | -           | 3          |            |              | B                |
| 49 | 2           | 3          |            | 2            | B                |
| 50 | -           | 3          |            | 3            | B                |
| 51 |             | 2          |            |              | B                |
| 52 |             | 3          | 3          | 3            | B                |
| 53 |             | 2          |            |              | B                |
| 54 | -           | 3          | 3          | 2            | B                |
| 55 | 3           | 3          | 3          | 3            | B                |
| 56 | 3           | 3          | 3          | 3            | B                |

**Tabela 3 Continuação.** LNH- Alto Grau de Malignidade

|    | <b>BCL2</b> | <b>BAX</b> | <b>BAK</b> | <b>MCL 1</b> | <b>Diagnóst.</b> |
|----|-------------|------------|------------|--------------|------------------|
| 57 | 3           | 3          | 3          | 3            | B                |
| 58 | 1           | 3          | 2          | 3            | B                |
| 59 | 3           | 3          |            |              | B                |
| 60 | -           | 2          | -          | 2            | B                |
| 61 |             | 2          |            |              | B                |
| 62 | 2           | 2          | 3          | 3            | T P              |
| 63 | -           | 3          | 3          | 3            | T P              |
| 64 | 3           | 3          | -          | 3            | AILD             |
| 65 | -           | 2          |            |              | AILD             |
| 66 | -           | 3          | 2          | 3            | AILD             |
| 67 | -           | 3          |            |              | AILD             |
| 68 | 1           | 3          | 3          | 3            | ANAPL T          |
| 69 | 1           | 3          |            |              | ANAPL T          |
| 70 | -           | 3          | 3          | 3            | NK               |
| 71 | -           | 3          | 2          | 2            | ANAPL T          |
| 72 | -           | 3          | 2          | 3            | ANAPL            |
| 73 | -           | 2          |            |              | ANAPL            |
| 74 | 2           | 3          | 2          | 3            | ANAPL            |

B- Linfoma Difuso de Grandes Células B

T P-linfoma T periférico = T hi .

AILD- linfoma angio imunoblástico de células T

T pleo- linfoma de alto grau de células “T” polimorfas (morfologia celular diversificada)

ANAPL- linfoma anaplásico ( alto grau.) = linfoma T pleomórfico

ANAPL T- linfoma anaplásico de células T

LNK= linfoma de células NK (natural killer) = GLM, Granuloma de Linha Média

**Tabela 4.** LNH-Linfomas Linfoblásticos

|   | <b>BCL2</b> | <b>BAX</b> | <b>BAK</b> | <b>MCL 1</b> |
|---|-------------|------------|------------|--------------|
| 1 | -           | 2          | 3          |              |
| 2 | -           | 3          | 3          | 3            |
| 3 | -           | 3          | 3          | 3            |
| 4 | -           | 3          | 3          | 2            |
| 5 | 3           | 2          | 3          | 3            |

LB-linfoma de células linfoblásticas

**Tabela 5.** LNH-Linfomas Burkitt

|    | <b>BCL2</b> | <b>BAX</b> | <b>BAK</b> | <b>MCL 1</b> |
|----|-------------|------------|------------|--------------|
| 1  | -           | 3          | 3          | 3            |
| 2  | -           | 3          | 2          | 3            |
| 3  | -           | 3          | 2          | 3            |
| 4  | -           | 3          | 3          | 3            |
| 5  | -           | 2          |            |              |
| 6  | -           | 3          |            |              |
| 7  | 1           | 3          |            |              |
| 8  | 2           | 3          |            |              |
| 9  | -           | 3          |            |              |
| 10 | -           | 3          | 3          | 3            |
| 11 | -           | 2          |            |              |
| 12 | -           | 2          |            |              |
| 13 | -           | 2          |            |              |
| 14 | -           | 2          |            |              |
| 15 | -           | 3          |            |              |
| 16 | -           | 2          |            |              |
| 17 | -           | 3          |            |              |
| 18 | -           | 3          |            |              |

BU- linfoma de Burkitt

**Tabela 6.** Reagentes para Imuno-histoquímica

| Reagente                               | Procedência                     | Número de Catalogo | Diluição\ Concentração       | Especificidade                                                   |
|----------------------------------------|---------------------------------|--------------------|------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| IgG1 anti-BCL-2 monoclonal             | SANTA CRUZ BIOTECHNOL. CA - USA | SC – 509           | 1:40                         | não especificado                                                 |
| anti-BAX policlonal                    |                                 | SC – 526 G         | 1:40                         | região amino-terminal                                            |
| anti-BAK policlonal                    |                                 | SC – 832           | 1:40                         | aminoácidos<br>82 a 104                                          |
| anti-MCL-1 policlonal                  |                                 | SC – 819           | 1:40                         | aminoácidos<br>131 a 139                                         |
| soro normal suíno                      | BIOGENEX – USA                  | X – 0901           | 1:20                         |                                                                  |
| MULTI-LINK – biotinilado               | DAKO CORPORATION<br>DINAMARCA   | K – 0453           | 1:50                         | imunoglobulinas de suíno: anti IGs de cabra, camundongo e coelho |
| Strepto ABC – conjugado com peroxidase |                                 | K – 0377           | 1:100                        |                                                                  |
| DAB                                    | SIGMA CORPORATION - USA         | D – 8001           | 1mg\ml em H2O2 a 0,5% em PBS |                                                                  |

**Tabela 7.** Agrupamento dos Linfomas não-Hodgkin

|                                  |                                                                                                                                                                                                                    |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Baixo grau de malignidade</b> | Leucemia Linfóide Crônica (LLC), Imunocitoma (IC), Micose Fungóide (MCF), Linfoma de células do Manto (LCM)                                                                                                        |
| <b>Grau intermediário</b>        | Linfoma Folicular (LF)                                                                                                                                                                                             |
| <b>Alto grau</b>                 | Linfomas Difusos de Grandes Células B (LDGCB), T periférico (T <sub>hi</sub> ), Linfoma Angio Imunoblástico de Células T (AILD), Anaplásico T (ANAPL T), Granuloma de Linha Média (GLM / LCNK), Anaplásico (ANAPL) |