

Renata da Silva

**COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE IMUNOFENOTIPAGEM POR
CITOMETRIA DE FLUXO E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE NO
DIAGNÓSTICO DOS LINFOMAS
FOLICULAR E DIFUSO DE GRANDE CÉLULA B**

**FLORIANÓPOLIS
2009**

Renata da Silva

**COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE IMUNOFENOTIPAGEM POR
CITOMETRIA DE FLUXO E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE NO
DIAGNÓSTICO DOS LINFOMAS
FOLICULAR E DIFUSO DE GRANDE CÉLULA B**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Mario Steindel
Co-orientadora: Dra. Silvia I.C.P. Ferreira

**FLORIANÓPOLIS
2009**

Silva, Renata

Comparação entre as técnicas de imunofenotipagem por citometria de fluxo e reação em cadeia da polimerase no diagnóstico dos Linfomas Folicular e Difuso de Grande Célula B/ Renata da Silva – Florianópolis 2009.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

1.Linfoma Folicular 2.Linfoma Difuso de Grande Célula B
3.Imunofenotipagem por citometria de fluxo 4.Reação em Cadeia da Polimerase 5.Diagnóstico 6.Classificação

À minha eterna companheira,
minha mãe Mara.

O que vale não é o quanto se vive; mas como se vive.

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

Ao estimado Prof. Dr. Mário Steindel pela orientação valiosa e por toda compreensão ao longo destes anos.

À amiga e co-orientadora Dra. Silvia Ferreira pelos conhecimentos transmitidos e por todo o incentivo nesta caminhada.

À equipe de onco-hematologia do CEPON, pelo apoio técnico científico.

Ao Prof. Dr. Carlos de José Carvalho Pinto pela ajuda irreverente no desenvolvimento deste trabalho.

À mestranda e amiga Darlene pela ajuda e companheirismo, muito obrigada. Aos amigos da Biotecnologia Francielle, Larissa, Alexandre, Giselle, Patrícia, Cassandra, Thaís, Ana e Yuri pelo convívio no laboratório e na execução deste trabalho.

À bibliotecária Maria Aparecida Orlandi do HEMOSC, na busca dos artigos científicos.

À Joyce, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, obrigada pelo auxílio e atenção.

Às minhas queridas amigas do HEMOSC: Anália, Lizi, Marilene, Dorlene e Dani (Laboratório de Marcadores Celulares), Janete e Rute (Criobiologia) e Mariana (Imunogenética). Este trabalho é de vocês também, muito obrigada pelo carinho e atenção.

À minha família, meu pai Ivan, Nina, Mateus, Ana Paula, Jean, André e Renata por me darem a força para continuar. À minha mãe que me ensinou a ter coragem e lutar pela busca dos meus sonhos. Ao meu amor, companheiro, amigo, meu noivo Robson, obrigada pela paciência.

E enfim aos pacientes que participaram deste trabalho, muito obrigada.

RESUMO

Os linfomas constituem um grupo heterogêneo de desordens malignas com diferentes comportamentos clínicos, distintos fatores patológicos e características epidemiológicas. O Linfoma Folicular (LF) e o Linfoma Difuso de Grande Célula B (LDGC) são os mais freqüentes tipos de neoplasia linfóide de células B maduras. Na atual classificação OMS para os linfomas, a histologia permanece como importante parâmetro para a classificação, embora o diagnóstico destas neoplasias também possa ser baseado na informação combinada do imunofenótipo, genótipo e manifestações clínicas, as quais por si só fornecem informações suficientes para a conduta clínica. A translocação (14;18)(q32;q21) é uma das anormalidades citogenéticas mais bem caracterizadas em doenças linfoproliferativas B periféricas, sendo detectável em aproximadamente 90% dos LF e 20% dos LDGC dependendo do teste diagnóstico utilizado. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo padronizar a detecção da translocação t(14;18)(q32;q21) através da reação de PCR multiplex, assim como estabelecer uma relação entre as características imunofenotípicas e moleculares, por citometria de fluxo e reação em cadeia da polimerase, respectivamente, nos LF e LDGC avaliados. A partir da avaliação das características citomorfológicas e imunofenotípicas, 83 amostras de origens variadas foram caracterizadas: Hiperplasia Reacional (10), Linfoma da Zona do Manto (20), Linfoma Folicular (38) e Linfoma de Grande Célula B (15). A pesquisa da t(14;18) relativa ao ponto de quebra em MBR foi realizada em 35 amostras de LF e em 10 de LDGC e a alteração foi revelada em 65,5% das amostras de LF e em 30% das amostras de LDGC. Seis casos (15%) sem classificação do tipo de linfoma B pela citomorfologia e a imunofenotipagem confirmaram a translocação pela PCR, revelando a importância desta metodologia na classificação do tipo de linfoma.

Palavras-chave: Linfoma Folicular, Linfoma Difuso de Grande Célula B, Imunofenotipagem por citometria de fluxo, PCR, diagnóstico, classificação.

ABSTRACT

Lymphomas are a heterogeneous group of malignant disorders with different clinical behavior, pathological factors and epidemiological characteristics. The Follicular lymphoma (FL) and Diffuse Large B-cell lymphoma (DLBCL) are the most frequent known mature B-cell neoplasms. In the current WHO classification for lymphomas, the histological architecture remains an important parameter for the classification, although the diagnosis of these tumors can also be based on the information of the combined immunophenotype, genotype and clinical manifestations, which themselves provide sufficient information to clinical conduct. The best characterized cytogenetic translocation in peripheral B lymphoproliferative diseases is $t(14;18)(q32;q21)$, being detectable in approximately 90% of LF and 20% of DLBCL according to the diagnostic test used. The aim of this study was to standardize the detection of translocation $t(14;18)(q32;q21)$ by a multiplex PCR assay, and establish a relationship between immunophenotypic and molecular characteristics by flow cytometry and PCR, respectively, in the cases of LF and DLBCL studied. According to the cytological and immunophenotypic data, 83 samples of different origins were characterized as reactive hyperplasia (10), Mantle Cell Lymphoma (20), Follicular lymphoma (38) and Diffuse large B-cell lymphoma (15). The study of $t(14, 18)$ on the breakpoint of Major Break Region (MBR) was performed on 35 samples of LF and 10 samples of DLBCL. The translocation was present in 65.5% of LF and in 30% of DLBCL samples. Six samples (15%) without classification of the lymphoma type by cytology and immunophenotyping, parameters found were identified by PCR assay revealing the importance of this methodology on the lymphoma classification.

Key words: Follicular lymphoma, Diffuse Large B-cell lymphoma, immunophenotyping by flow cytometry, PCR, diagnosis, classification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estimativas das taxas brutas de incidência de leucemias por 100 mil em homens e mulheres para o ano de 2008	8
Figura 2	Representação esquemática dos mecanismos patogênicos dos linfomas de célula B	15
Figura 3	Morfologia de Linfoma Folicular grau I e II realizada em amostra de PAAF	19
Figura 4	Representação esquemática da translocação entre os cromossomos 14 e 18	22
Figura 5	Morfologia de Linfoma Difuso de Grande Célula B realizada em amostra de PAAF	23
Figura 6	Diagrama esquemático dos pontos de quebra do gene BCL2 (18q21): MBR, 3'MBR e mcr	43
Figura 7	Avaliação de tamanho dos linfócitos B por citometria de fluxo	48
Figura 8	Histograma de dois parâmetros demonstrando a restrição de cadeia leve de membrana em um caso de síndrome linfoproliferativa B	49
Figura 9	Representação gráfica da intensidade média de fluorescência do antígeno CD10 nos diferentes grupos avaliados	54
Figura 10	Histograma de dois parâmetros demonstrando um caso de síndrome linfoproliferativa B: Linfoma não Hodgkin B, tipo folicular	55
Figura 11	Histogramas de dois parâmetros demonstrando um caso de Hiperplasia Reacional	56
Figura 12	Histogramas de dois parâmetros demonstrando um caso de Síndrome linfoproliferativa B: Linfoma da Zona do Manto	56
Figura 13	Representação gráfica da intensidade média de fluorescência do antígeno CD20 nos diferentes grupos avaliados	57
Figura 14	Representação gráfica da intensidade média de fluorescência do antígeno BCL2 nos diferentes grupos avaliados	58
Figura 15	Padronização da reação de PCR na detecção da região MBR/JH	60
Figura 16	Sensibilidade dos iniciadores MBR1 e MBR2 /JH	61
Figura 17	Deteção do ponto de quebra MBR/JH em amostras de pacientes	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classificação das enfermidades neoplásicas linfóides B segundo a Organização Mundial de Saúde	4
Quadro 2	Classificação dos Linfomas de Células B de acordo com o comportamento clínico (OMS)	5
Quadro 3	Representação esquemática da maturação B na medula óssea: diferenciação B	12

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características imunofenotípicas das neoplasias linfóides de células B maduras	17
Tabela 2	Características moleculares das neoplasias linfóides de células B maduras	18
Tabela 3	Diferentes graus de linfoma folicular	20
Tabela 4	Amostras clínicas avaliadas no presente estudo	34
Tabela 5	Painel de Anticorpos Monoclonais utilizados na avaliação das neoplasias linfóides de células B maduras	38
Tabela 6	Painel utilizado na caracterização das neoplasias linfóides de células B maduras	39
Tabela 7	Iniciadores e sequências utilizadas na PCR multiplex para detecção do rearranjo dos genes BCL-2/IGH	42
Tabela 8	Sexo e idade média dos pacientes avaliados no presente estudo	46
Tabela 9	Avaliação citomorfológica por coloração de MGG e do tamanho celular por citometria de fluxo (FSC) nos diferentes grupos	47
Tabela 10	Detecção de restrição de cadeia leve de Imunoglobulina em amostras nos grupos de linfoma avaliados	50
Tabela 11	Avaliação da expressão de CD5 nas amostras dos diferentes grupos avaliados	51
Tabela 12	Número e tipo de amostras clínicas de linfoma submetidas à reação de PCR	59
Tabela 13	Comparação entre os resultados com fenótipo não típico e presença da t(14;18) / ponto de quebra em MBR	64

LISTA DE ABREVIATURAS

AcMo	Anticorpo monoclonal
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
BD	<i>Becton and Dickinson</i>
BL	Biópsia de linfonodo
CD	Anticorpo monoclonal, do inglês <i>Cluster of differentiation</i>
CEPON	Centro de Pesquisas Oncológicas
cIg	Imunoglobulina citoplasmática
D	Diversidade
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfatado
DP	Desvio padrão
EBV	Vírus <i>Epstein-Barr</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FISH	Fluorescência por hibridização <i>in situ</i>
FITC	Fluoresceína
FSC	Dispersão frontal da luz, do inglês <i>Forward scatter</i>
g	Força de gravidade
HCV	Vírus da hepatite C
HEMOSC	Centro de Hemoterapia e Hematologia de Santa Catarina
HR	Hiperplasia reacional
HTLV-1	Vírus linfotrófico de células T tipo I
IMF	Intensidade média de fluorescência
INCa	Instituto Nacional do Câncer
J	Junção
kDa	Kilo daltons
LA	Líquido Ascítico
LB	Linfoma de Burkitt
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LDGC	Linfoma difuso de grande célula B
LF	Linfoma folicular
LH	Linfomas de Hodgkin
LLC-B	Leucemia Linfocítica Crônica de Células B
LM	Linfoma do Manto
LNH	Linfomas não Hodgkin
Lpe.	Líquido pericárdico
LPI.	Líquido pleural
MALT	Linfoma de zona marginal extra-nodal associado à mucosa
MBR	Ponto de quebra maior, do inglês <i>Major breakpoint region</i>
mcr	Ponto de quebra menor, do inglês <i>Minor breakpoint region</i>
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MGG	<i>May-Grunwald-Giemsa</i>
min.	Minuto
ml	Mililitros
MO	Medula óssea

NK	<i>Natural killer</i>
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
pb	Pares de bases
PC-5	Ficoeritrina-cianina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Ficoeritrina
pH	Potencial hidrogeniônico ou concentração de íons H ⁺
REAL	Classificação revisada Euro-Americana de linfomas, do inglês <i>Revised European-American Lymphoma Classification</i>
RT	Transcriptase reversa
sIg	Imunoglobulina de superfície
SP	Sangue periférico
SSC	Dispersão lateral da luz, do inglês <i>Side scatter</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TDT	Terminal desoxinucleotidil transferase, do inglês <i>Terminal desoxynucleotidyl transferase</i>
UV	Ultra violeta
V	Variável
V	Volt
X	Média
µL	Microlitros

ÍNDICE

1	Introdução	1
1.1	Neoplasias linfóides B – Definição e Classificação OMS	3
1.2	Epidemiologia dos Linfomas Não Hodgkin B	6
1.2.1	Taxas de Incidência	6
1.2.2	Fatores Etiológicos e de Risco	9
1.3	Linfócito B –Estágios maturativos	11
1.4	Correlação do estágio maturativo das células B normais com as neoplásicas	14
1.5	Alterações fenotípicas e moleculares das neoplasias de células linfóides B maduras	16
1.6	Linfomas não Hodgkin caracterizados	18
1.6.1	Linfoma Folicular	18
1.6.2	Linfoma difuso de grande célula B	22
1.7	Técnicas citogenéticas e moleculares no diagnóstico onco-hematológico	25
1.8	Justificativa	27
2	Objetivos	30
2.1.	Objetivo Geral	31
2.2.	Objetivos Específicos	31
3	Material e Métodos	32
3.1	Considerações éticas	33
3.2	Seleção de amostras	33
3.3	Preparação do sedimento celular	35
3.4	Avaliação citomorfológica	35
3.4.1	Avaliação morfológica com coloração de May-Grunwald-Giemsa	35
3.4.2	Avaliação do tamanho celular por citometria de fluxo	36
3.5	Imunofenotipagem por citometria de fluxo	37
3.5.1	Determinação do perfil imunofenotípico das neoplasias linfóides B maduras	37
3.5.2	Painéis utilizados	38
3.5.3	Aquisição e avaliação dos antígenos celulares	40
3.6	Extração de DNA	40
3.7	Deteção do rearranjo BCL2/IgH: t(14;18)(q32;q21)	41
3.7.1	Iniciadores utilizados	41
3.7.2	Padronização da técnica de Reação em cadeia da polimerase (PCR)	42
3.8	Análise estatística	44
4	Resultados de Discussão	45
5	Conclusões	65
6	Referências	67
7	Anexos	76

1. Introdução

A história dos linfomas se inicia em 1832 quando esta doença é descrita pela primeira vez pelo médico patologista inglês Thomas Hodgkin. Em seu trabalho Hodgkin detalhava a história clínica e achados pós morte de sete pacientes com aumento de linfonodos e baço, entretanto sem sinais de inflamação ou outros achados de significância patológica. Em 1865 Samuel Wilks escreveu um artigo utilizando o termo “Doença de Hodgkin”, imortalizando o seu predecessor (STONE, 2005).

O conceito de leucemia apareceu anos depois com as descrições simultâneas e independentes de Rudolf Virchow e John Bennet. Em 1864 Virchow dividiu as leucemias em dois grupos: leucemias e linfosarcomas. No início do século XX surge a denominação de “Linfoma não Hodgkin” para as neoplasias malignas que se originam nos tecidos linfóides (ALONSO, 2004).

Desde então, vários estudos foram realizados com a intenção de classificar tais neoplasias unificando conceitos de diagnóstico, tratamento e prognóstico. Com o avanço de novas técnicas diagnósticas (imunológicas e moleculares), as classificações começaram a crescer de forma desordenada, fazendo com que em 1991, cientistas de várias partes do mundo formassem o *International Lymphoma Group*, que reuniu estes critérios, dando origem a *Revised European-American Lymphoma Classification* (REAL), publicada em 1994 (JAFFE et al., 2001).

A classificação da REAL é baseada em critérios morfológicos (histológicos), imunofenotípicos, genéticos e clínicos. Em 1995, com o apoio da Organização Mundial de Saúde (OMS), começa a atualização desta classificação, onde neoplasias não contempladas são incluídas, o que dá origem em 2001 a uma classificação de consenso

mundial (JAFFE et al., 2001). Atualmente, a maioria da comunidade científica nacional e internacional utiliza a Classificação de Tumores Hematológicos e de Tecidos Linfóides da OMS, plenamente aceita não só pela sua reprodutibilidade histopatológica, mas também por ter representado grande relevância clínica (SWERDLOW, 2008).

1.1. Neoplasias linfóides B – Definição e Classificação OMS

Os linfomas constituem um grupo heterogêneo de desordens malignas com diferentes comportamentos clínicos, distintos fatores patológicos e características epidemiológicas (HJALGRIM, 2008). São morfológica e fenotipicamente divididos em linfomas de Hodgkin (LH) e não Hodgkin (LNH).

O LH é uma neoplasia monoclonal linfóide, composta por células mononucleares, chamadas de células de Hodgkin e por células multinucleadas, chamadas de células de Reed-Sternberg. Representa aproximadamente 30% de todos os linfomas e geralmente surgem nos linfonodos, preferencialmente de região cervical, sendo que a maioria se manifesta em adultos jovens (SWERDLOW, 2008).

Os LNH são expansões clonais de células que derivam de seus homólogos situados em compartimentos funcionais normais do sistema imune: gânglios linfáticos, baço, medula óssea e tecido linfóide associado a mucosas (RABASA, 2002). Estas enfermidades, em sua maioria (85%), são decorrentes da proliferação de células neoplásicas linfóides B maduras em vários estágios de diferenciação, podendo também ser originadas a partir de células T ou *natural killer* (NK) (RABASA, 2002).

Geralmente, tais neoplasias tendem a mimetizar os estágios de maturação de um linfócito B normal, o que permite a classificação de acordo com o estágio maturativo da

célula neoplásica (JAFFE et al., 2001). Desta forma, a atual classificação e nomenclatura dos linfomas B são baseadas nos estágios de maturação de células normais (Quadro 1) (SWERDLOW et al., 2008).

Quadro 1. Classificação das enfermidades neoplásicas linfóides B segundo a OMS.

<u>CLASSIFICAÇÃO DAS NEOPLASIAS DE CÉLULAS B</u>
✓ Neoplasias de precursores de células B Leucemia / Linfoma de linfoblastos B
✓ Neoplasias de células B maduras Leucemia linfocítica crônica / Linfoma linfocítico de células pequenas Leucemia de células prolinfocíticas Linfoma de zona marginal esplênica Tricoleucemia Linfoma linfoplasmacítico Doenças de cadeia pesada Neoplasia de células plasmáticas Linfoma de zona marginal extra nodal associado à tecido linfóide de mucosa (MALT) Linfoma de zona marginal nodal Linfoma folicular Linfoma centro folicular primário de pele Linfoma de grande célula B difuso (LGCD), NOS Linfoma de grande célula B, rico em histiócitos/células T LGCB primário de sistema nervoso central LGCB primário de pele (perna) LGCB EBV positivo, de pessoas idosas LGCB associado à inflamação crônica Granulomatose linfomatóide Linfoma de grande célula B (tímico) primário de mediastino Linfoma de grande célula B intravascular Linfoma de grande célula B, ALK positivo Linfoma plasmablastico Linfoma de grande célula B associado ao vírus HHV8 / Doença de Castleman Linfoma de efusão primária Linfoma de Burkitt Linfoma de célula B, inclassificável, com fatores intermediários entre LGCB e Linfoma de Burkitt Linfoma de célula B, inclassificável, com fatores intermediários entre LGCB e Linfoma clássico de Hodgkin

Fonte: SWERDLOW et al., 2008.

A OMS utiliza a avaliação morfológica/histológica e imunofenotípica para a classificação das neoplasias linfóides B, enfatizando a importância das características clínicas para um diagnóstico preciso dos diferentes tipos de linfomas. Nenhum marcador antigênico é específico para qualquer neoplasia, sendo necessário uma combinação das características morfológicas e painéis de marcadores antigênicos para uma classificação adequada. As características genéticas cada vez mais têm um papel importante na caracterização e classificação das neoplasias linfóides B, principalmente nos linfomas de pequenas células B e leucemias crônicas (SWERDLOW et al., 2008).

De acordo com o comportamento clínico é possível separar os linfomas em dois grupos: alto e baixo grau (Quadro 2).

Quadro 2. Classificação dos Linfomas de Células B de acordo com o comportamento clínico (OMS).

<p>Indolentes</p> <ul style="list-style-type: none"> • Leucemia Linfóide Crônica / Linfoma linfocítico • Linfoma linfoplasmacítico • Linfoma Folicular • Linfoma de Zona Marginal <ul style="list-style-type: none"> ▪ MALT(mucoso-associado) ▪ Nodal ▪ Esplênico 	<p>Agressivos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Linfoma difuso de grande célula, qualquer tipo. • Linfoma da Zona do Manto • Linfoma Burkitt –like
	<p>Leucemizados</p> <ul style="list-style-type: none"> • Linfoma Linfoblástico • Linfoma Burkitt –like
	<p>Virais</p> <ul style="list-style-type: none"> • Linfoma primário de serosas

Fonte: modificado de SWERDLOW et al., 2008.

As neoplasias B de baixo grau caracterizam-se por baixo índice de proliferação celular, células de pequeno tamanho, formação de grandes massas tumorais nos linfonodos, envolvimento de medula óssea e localizações extra nodais. Entretanto, são tumores de baixa agressividade, com sobrevida de anos mesmo sem tratamento específico (BEATO, 2003).

Por outro lado, os linfomas de alto grau, como o linfoma de grandes células e o linfoma de Burkitt, apresentam altos índices de proliferação e células de grande tamanho. Frequentemente a doença é localizada, mas o comportamento clínico é muito agressivo e a sobrevida do paciente pode variar de semanas a meses se não tratado (BEATO, 2003).

No entanto, variações no comportamento clínico podem ser vistas em qualquer destas enfermidades B. Durante o curso clínico frequentemente se encontra progressão clínica ou histológica, por essa razão a classificação da OMS não estratifica os linfomas em termos de grau. Tanto a morfologia como a imunofenotipagem podem mudar através do tempo refletindo a evolução clonal das novas alterações genéticas (SWERDLOW et al., 2008).

1.2 Epidemiologia dos Linfomas Não Hodgkin B

1.2.1. Taxas de Incidência

Nas estatísticas mundiais, as neoplasias linfóides B correspondem a 90% de todas as neoplasias linfóides. Representam 4% dos novos casos de câncer a cada ano, sendo mais frequentes em países desenvolvidos (SWERDLOW et al., 2008).

Segundo dados da OMS, a incidência mundial de linfomas, e principalmente de Linfomas B, está em aumento, ocorrendo aproximadamente 280.000 casos por ano. As diferentes neoplasias B apresentam uma variação de sua frequência relativa em diferentes partes do mundo. Os dois tipos de linfomas de alta incidência nos Estados Unidos e na Europa ocidental são o Linfoma Difuso de Grande Célula B (LDGC) com 37% e o Linfoma Folicular (LF) com 29%, correspondendo a 66% de todos os subtipos de LNH, ambos apresentando uma incidência menor nos países da América do Sul, África, Ásia e Europa Oriental (SWERDLOW et al., 2008).

Nas últimas décadas a incidência dos LDGC vem aumentando, independente da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) como fator de risco (JAFFE et al., 2001).

A mediana de idade de ocorrência dos LNH-B está entre a 6^a e 7^a década de vida, sendo raro em indivíduos com menos de 20 anos, com exceção do LDGC mediastinal, o qual ocorre na média de idade de 35 anos. A maioria dos diferentes tipos de LNH-B é predominante no sexo masculino (52-55 %). Em relação à incidência por sexo, o LF tem um padrão diferente comparado aos outros linfomas, uma vez que se apresenta sutilmente mais elevado em mulheres (58%), enquanto o LNH-B da Zona do Manto (LM) tem uma alta predominância do sexo masculino (74%). Na infância os LNH-B predominam no sexo masculino, sendo que tem frequência significativa os LDGC e Linfomas Burkitt (LB) (SWERDLOW et al., 2008).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) lançou em 2007 um trabalho com as estimativas da incidência para todos os tipos de câncer no país, as quais apontam

a ocorrência para o ano 2008 de 466.730 casos novos, sendo 231.860 para o sexo masculino e 234.870 para o sexo feminino (Figura 1) (INCA, 2007).

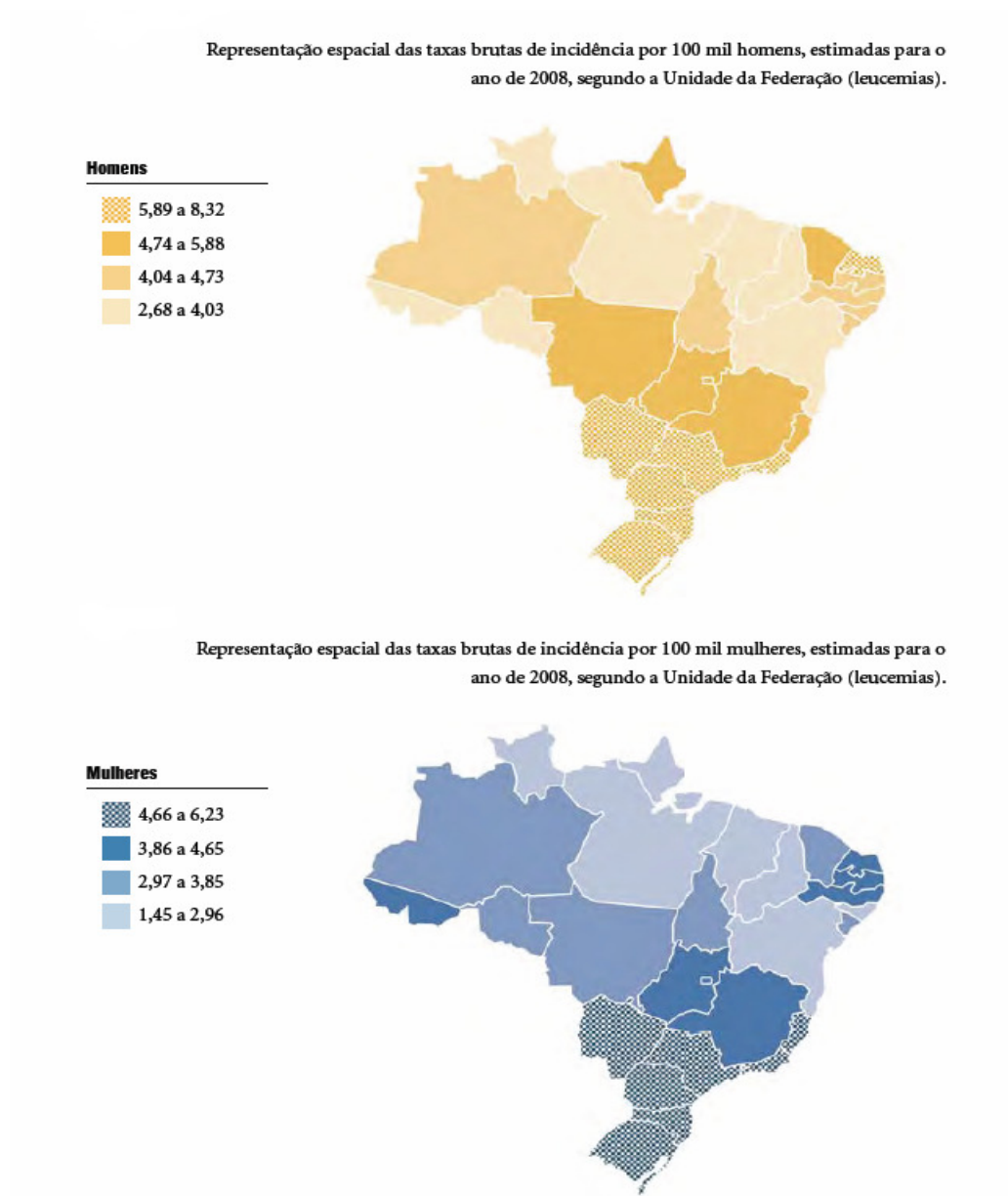


Figura 1: Estimativas das taxas brutas de incidência de leucemias por 100 mil em homens e mulheres para o ano de 2008. Fonte: INCA, 2007.

A estimativa das taxas brutas de incidência de leucemias/linfoma no Brasil para cada 100 mil habitantes, aponta para o sexo masculino 5.220 casos novos, com uma taxa bruta de incidência de 5,5 e para o sexo feminino 4.320 casos novos, com uma taxa bruta de incidência de 4,4%. Nesta publicação não se diferencia entre os diferentes tipos de câncer hematológicos, portanto na estimativa sob o nome de leucemias, estão incluídos no mesmo grupo as leucemias agudas de diferentes linhagens e todos os tipos de linfomas (INCA, 2007).

No Estado de Santa Catarina, se estima para o sexo masculino 210 casos novos, com uma taxa bruta de incidência de 6,61 e para o sexo feminino 170 casos novos, com uma taxa bruta de incidência de 5,53%. Na figura 1, (representação espacial) observamos que as maiores taxas brutas de incidência de leucemia por 100.000 habitantes ocorrem na região Sul e Sudeste (INCA, 2007).

1.2.2. Fatores Etiológicos e de Risco

Agentes infecciosos têm demonstrado contribuir para o desenvolvimento de vários tipos de linfoma. O risco de LNH em pessoas com AIDS é 100 vezes maior que a população em geral. Estes linfomas são tipicamente de origem linfóide B, com histologia de alto grau: LDGC e Linfoma de Burkitt e ocorrem frequentemente em locais extra nodais (VOSE et al., 2002).

A infecção pelo vírus *Epstein-Barr* (EBV) tem uma elevada prevalência na população adulta. A associação entre este vírus e o linfoma está demonstrada no caso do

Linfoma de Burkitt. O EBV ocorre em aproximadamente um terço dos casos de LH e está presente em 52,6% de todos os casos de linfoma de Burkitt (QUEIROGA, 2008).

Outros patógenos relacionados com o desenvolvimento de LNH compreendem o vírus linfotrófico de células T tipo I (HTLV-1), o vírus da hepatite C (HCV) e a bactéria *Helicobacter pylori* relacionada com o linfoma de zona marginal extra-nodal associado à mucosa (MALT) (INCA, 2007).

Os resultados de diversos estudos epidemiológicos indicam que o risco de LNH estaria associado com o uso de herbicidas com ácido fenoxiacético ou triazina, inseticidas organofosforados e fertilizantes (CHIU, 2002). Desta forma, a contaminação da água por nitrato, substância encontrada em fertilizantes, é um exemplo de exposição que parece aumentar os riscos para a doença (INCA, 2007).

As pessoas com exposição química a solventes como benzeno, xileno e tolueno, ou a altas doses de radiação tem maior risco de desenvolver LNH (VINEIS, 2007).

O antecedente familiar de LNH ou de outra neoplasia hematológica duplica ou triplica o risco (CHIU, 2002). A maioria dos cânceres é de origem esporádica, porém, 5% a 10% dos mesmos têm um claro componente hereditário (FONCILLAS et al., 2002)

O maior consumo de proteínas de origem animal e de gorduras é um fator de risco enquanto que, dietas ricas em frutas e vegetais com caroteno tendem a uma relação inversa com a doença. O hábito de fumar na maioria dos estudos mostra uma associação entre o tabagismo e LNH agressivos e com tumores sólidos (CHIU, 2002).

1.3. Linfócito B –Estágios maturativos







A maturação dos linfócitos constituiu um processo proliferativo que ocorre nos compartimentos especializados do sistema imune. Os principais eventos durante a

maturação dos linfócitos B são os rearranjos gênicos e a expressão dos genes das imunoglobulinas (Ig) numa ordem precisa, a proliferação das células imaturas e a seleção do repertório maduro resultando em diferentes fenótipos celulares. As proteínas de membrana podem ser utilizadas como marcadores fenotípicos para distinguir funcionalmente as distintas populações de linfócitos. Ao adquirirem suas características funcionais, as células entram na circulação sanguínea e nos tecidos linfóides periféricos ou secundários, preparadas para responder à estimulação antigênica (ABBAS, 2005).

Os linfócitos B são produzidos, a partir de células-tronco hematopoiéticas (*stem cell*), e seu processo de diferenciação ocorre na medula óssea. Este órgão linfóide primário é composto por células estromais e uma rede microvascular que interagem com os receptores dos linfócitos B, permitindo assim a sua diferenciação e proliferação (JANEWAY et al., 2001).

Os linfócitos B menos diferenciados, pró-B jovens, são células progenitoras com capacidade limitada de auto-renovação. Estas células derivam das células precursoras hematopoiéticas, não produzem Ig e se distinguem de outras células imaturas pela presença de proteínas, como a enzima nuclear *terminal desoxynucleotidyl transferase* (TdT) e expressão de proteínas restritas à linhagem B tais como CD79a intracitoplasmático e CD19 de membrana. O rearranjo dos genes que darão origem à cadeia pesada (H) de imunoglobulina inicia-se no estágio pró-B com a união dos segmentos dos genes D e J_H (Quadro 3). No estágio posterior, pró-B tardia ocorre à junção V_H a DJ_H (JANEWAY et al., 2001).

Quadro 3. Representação esquemática da maturação B na medula óssea: diferenciação B.

Mudanças associadas à diferenciação B antígeno-independente						
	Progenitor Linfóide B	Pró B Jovem	Pró B Tardia	Pré B	Linfócito B Imaturo	Linfócito B Maduro
						
Genes IgH	Germinal	Reord. D-J	Reord. V-DJ	VDJ reordenado	VDJ reordenado	VDJ reordenado
Genes IgL	Germinal	Germinal	Germinal	Reord. V-J	VJ reordenado	VJ reordenado
Ig superfície	Ausente	Ausente	Ausente	Cadeia μ (pre-BCR)	IgM	IgM + IgD
Outras moléculas		CD10	CD10	CD19		
		CD19	CD19	CD38	CD19	CD19
	CD34	CD38	CD38	CD40	CD21	CD21
	CD19	CD40	CD40	CD24	CD40	CD40
	CD38	CD24	CD24	CD45R	CD24	CD24
	HLA-II	CD45R	CD45R	CD43	CD45R	CD45R
	TdT	CD43	CD43	CD20	CD20	CD20
		HLA-II	HLA-II	HLA-II	HLA-II	HLA-II
		TdT	TdT	TdT		

Fonte <http://www.usal.es>. Acesso em 03 de julho de 2008.

No estágio pré B, ocorre o rearranjo gênico das cadeias pesadas de Ig (VDJ_H) o que leva a expressão da porção básica da cadeia pesada chamada “ μ ”, com posterior início do rearranjo e produção de cadeias leves. No fim deste processo há a expressão completa da molécula de IgM na superfície da célula definida como um linfócito B imaturo. Após a expressão de IgM ocorre o aparecimento de IgD na superfície celular, tornando a célula capaz de reconhecer ou responder a antígenos, o denominado linfócito B maduro (JANEWAY et al., 2001).

A molécula de imunoglobulina é constituída de duas cadeias leves (κ ou λ) e duas pesadas. Cada cadeia tem regiões variáveis (V_H) e constantes (C_H). A especificidade antigênica de cada linfócito é determinada pelo rearranjo dos segmentos gênicos da

região variável (V), de diversidade (D), de junção (J), que codificam a expressão completa da molécula de imunoglobulina (HOFFBRAND et al., 2004).

Após este processo de diferenciação antígeno independente na medula óssea, os linfócitos B maduros, também chamados “virgens”, circulam no sangue periférico ou migram para os tecidos linfóides secundários (linfonodos, baço, tecido linfóide associado às mucosas). No córtex dos linfonodos, estes linfócitos B formaram os folículos linfóides primários.

Os linfócitos B “virgens” apresentam os antígenos CD19, IgD, IgM, CD20. Há uma população de células linfóides B, denominada “células B re-circulantes”, que co-expressam o marcador da linhagem linfóide T CD5. Estas células circulam no sangue periférico e também formam a região do manto dos folículos (KÜPPERS et al., 2005). Somente 5 a 10% das células B no sangue ou tecidos linfóides têm este fenótipo e sua função na resposta imune ainda não é conhecida (ABBAS, 2005). Estudos sugerem que esta molécula de 67 kDa apresenta um efeito regulatório, podendo ser útil na prevenção da ativação inapropriada de células auto reativas (BERLAND, 2002).

A estimulação antigênica após apresentação do antígeno, com ajuda dos linfócitos T e outras células acessórias, provoca o crescimento celular B formando os folículos secundários, os quais contêm áreas de grande proliferação celular, denominadas centros germinativos (HOFFBRAND et al., 2004).

No centro germinativo do folículo, as células B virgens com baixa afinidade à imunoglobulina de superfície, após contato com o antígeno, são induzidas a proliferar. A alta taxa de proliferação está associada à hipermutação somática do gene de Ig, um processo que introduz mutações na região do gene V, com uma taxa estimada entre 10^{-3} – 10^{-4} /pb por geração. Estas hipermutações são pré-requisito para a afinidade aos antígenos

(STAMATOPOULOS et al., 2000). Estas células, agora chamadas de centroblastos (células transformadas do centro germinal), podem sofrer apoptose ou maturar à centrócitos (SWERDLOW et al., 2008).

Ao deixarem a porção centro germinal dos tecidos linfóides, os centrócitos podem se transformar em células B de memória, ou em plasmócitos. Os linfócitos B de memória podem ser encontrados no sangue periférico, na zona marginal dos linfonodos, baço e no tecido linfóide associados à mucosa. Os plasmócitos se deslocam ao sangue periférico e residem na medula óssea (SWERDLOW et al., 2008).

1.4. Correlação do estágio maturativo das células B normais com as neoplásicas

Muitos casos de linfoma de células do manto correspondem a células B CD5 positivas não estimuladas, ou virgens (Figura 2) (SWERDLOW et al., 2008).

Os centroblastos, células do centro germinal, apresentam baixos níveis de imunoglobulinas assim como da proteína BCL2, o que torna estas células susceptíveis à morte celular por apoptose. Apresenta CD10 e a proteína BCL6, um fator transcricional nuclear que é expresso em ambos centroblastos e centrócitos. Em contrapartida, muitas neoplasias (LDGC) são compostas por células que se assemelham a centroblastos e possuem os genes da região IgV mutados, consistindo em células derivadas da exposição ao centro germinal (Figura 2) (SWERDLOW et al., 2008).

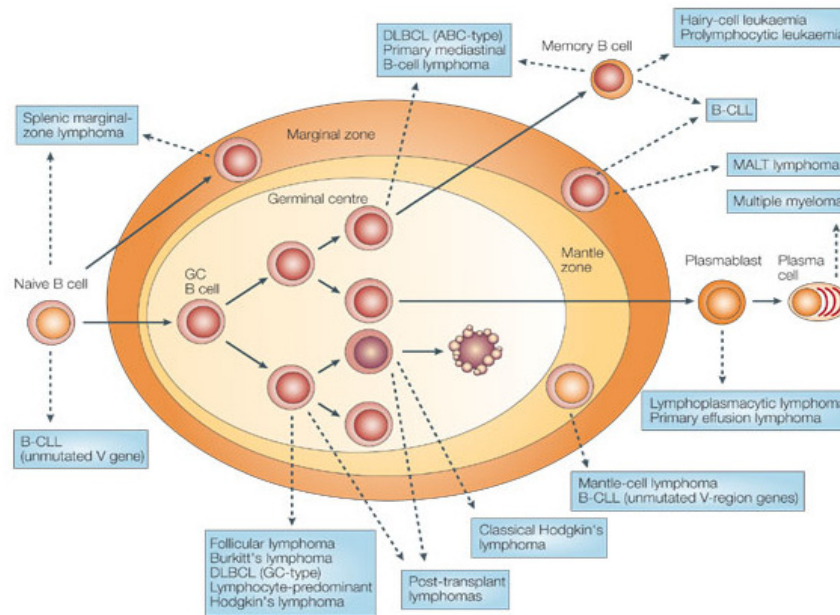


Figura 2: Representação esquemática dos mecanismos patogênicos dos linfomas de célula B.
 Fonte: Küppers, 2005.

Alguns estudos identificaram que a expressão gênica de células B do centro germinal está associada com os linfomas folicular, de Burkitt e alguns tipos de LDGCB (KÜPPERS et al., 2005). Células de Linfoma de Burkitt e de LDGCB correspondem a células com alta taxa de proliferação, sendo tumores clinicamente mais agressivos.

O linfoma folicular é caracterizado por células B que provavelmente derivam da transformação neoplásica de células B do centro germinal, centrócitos e centroblastos, que falharam a apoptose, provavelmente pela presença do rearranjo cromossomal, t(14;18) (STAMATOPOULOS et al., 2000). Usualmente neste tipo de linfoma há prevalência de centrócitos em relação aos centroblastos, fazendo desta uma neoplasia indolente (SWERDLOW et al., 2008). Os linfócitos B reativos do centro germinal podem ser caracterizados pela forte expressão de CD20, sendo a expressão de CD10 variável. Em contrapartida, o linfoma folicular geralmente expressa o antígeno de superfície

celular CD10 de forma homogênea, associado à moderada expressão de CD20 (BRAYLAN et al., 1998). Desta forma, a caracterização imunofenotípica torna-se uma ferramenta valiosa no reconhecimento da célula neoplásica.

1.5. Alterações fenotípicas e moleculares das neoplasias de células linfóides B maduras

A imunofenotipagem por citometria de fluxo se baseia no uso de anticorpos monoclonais conjugados a diversos fluorocromos que permitem uma análise multiparamétrica e quantitativa da presença de cada marcador, de homogeneidade ou heterogeneidade dos mesmos e sua distribuição em relação às células normais de mesma linhagem. Devido a sua elevada sensibilidade, rapidez, precisão e reprodutibilidade a citometria de fluxo vem se integrando junto a outros parâmetros clínicos, biológicos e morfológicos como critério objetivo para chegar ao diagnóstico (ALONSO, 2002).

A metodologia de imunofenotipagem tem sido aplicada por mais de duas décadas no estudo das síndromes linfoproliferativas de células B maduras. Do ponto de vista diagnóstico, a imunofenotipagem tem sido usada como *screening* de clonalidade de células B assim como para caracterização e classificação dos subtipos de síndromes linfoproliferativas B (Tabela 1). Na última década, tem sido aplicada no estadiamento de doenças (MATUTES et al., 2000), na avaliação prognóstica (MONTSERRAT, 1997), no monitoramento de células leucêmicas residuais (RAWSTRON et al., 2001) e na predição de resposta à terapia (DAVIS et al., 1999; FORAN et al., 2000).

Tabela 1. Características imunofenotípicas das neoplasias linfóides de células B maduras.

NEOPLASIA	sIg/ cIg	CD5	CD10	CD23	CD20	CD103	BCL6	BCL2	Ciclina D1
Leucemia Linfóide Crônica	+/+/-	+	-	+	-/+	-	-	+	-
Leucemia Prolinfocítica	+/+/-	-	-	-	+	-	-	+	-
Linfoma Marginal Esplênico	+/+/-	-	-	-	-	-	-	+	-
Tricoleucemia	+/-	-	-	-	-	+	-	-/+	-/+
Mieloma	-/+	-	-/+	-	-	-	-	-	-/+
Linfoma. MALT	+/+/-	-	-	-/+	+	-	-	+	-
Linfoma. Folicular	+/-	-	+	-/+	+	-	+	++	-
Linfoma da Zona do Manto	+/-	+	++	-	+	-	-	+	+
Linfoma Difuso de Grandes Células B	-/+/-	-	-/+	-/+	+	-	-/+	+	-
Linfoma Burkitt	+/-	-	+	-	+	-	+	-	-

* Intensidade de fluorescência dos marcadores: (-) negativo; -/+ fraca intensidade; + positivo, ++ fortemente positivo.

Fonte: modificado de Swerdlow et. al, 2008.

Da mesma forma, as informações fornecidas por estudos de citogenética convencional, fluorescência por hibridização *in situ* (FISH) e reação em cadeia da polimerase (PCR) têm contribuído para detalhar a caracterização destas neoplasias, oferecendo informações para uma classificação integrada destas doenças linfoproliferativas (Tabela 2) (HARRIS et al., 1994; 1999).

Tabela 2. Características moleculares das neoplasias linfóides de células B maduras.

Linfoma	Alteração Citogenética	Anormalidade molecular
Linfoma folicular	t(14;18)(q32;q21)	Desregulação de <i>BCL2</i> , proximidade a IGH
	t(2;18)(q32;q21)	Desregulação de <i>BCL2</i> , proximidade a IGK em 2p12
	t(2;18)(q32;q21)	Desregulação de <i>BCL2</i> , proximidade a IGL em 22q11
Linfoma da Zona do Manto	t(11;14)(q13;q32)	Desregulação de <i>CCND1(BCL1, PRAD1)</i> , o gene codifica Ciclina D1, proximidade a IGH
Linfoma difuso de grande células B	t(14;18)(q32;q21)	Desregulação de <i>BCL2</i> , proximidade a IGH
	t(3;14)(q27;q32)	Desregulação de <i>BCL6</i> , proximidade a IGH
Linfoma Burkitt	t(8;14)(q24;q32)	Desregulação de <i>MYC</i> , proximidade a IGH em 14q32
	t(2;8)(p12;q24)	Desregulação de <i>MYC</i> , proximidade a IGK em 2p12
	t(8;22)(q24;q11)	Desregulação de <i>MYC</i> , proximidade a IGL em 22q11
Linfoma Linfoplasmacítico	t(9;14)(p13;q32)	Desregulação de <i>PAX5</i> , proximidade a IGH em 14q32
Linfoma gástrico, pulmonar ou intestinal tipo MALT	t(11;18)(q21;q21)	Fusão <i>API2-MALT</i>
	t(1;14)(p22;q32)	Desregulação de <i>BCL10</i> , proximidade IGH
Linfoma MALT ocular, pele ou tireóide	t(3;14)(p14;q32)	Desregulação de <i>FOXPI</i> , proximidade IGH
Linfoma MALT de glândulas salivares	t(14;18)(p14;q32)	Desregulação de <i>MALT1</i> , proximidade IGH

Fonte: modificado de SWERDLOW et al., 2008.

1.6. Linfomas não Hodgkin caracterizados

1.6.1. Linfoma Folicular

Dentre todos os linfomas primários que envolvem o sangue periférico, o LF é o mais frequentemente observado (BAIN et al., 1995). Muitos pacientes apresentam doença avançada ao diagnóstico, com linfadenopatia periférica e central (abdominal e torácica)

e esplenomegalia. Predominantemente envolve os nódulos linfáticos, mas a medula óssea também pode ser acometida em 40 a 70% dos casos (SWEDERDLOW et al., 2008).

Do ponto de vista morfológico, e em contraste com os casos de Leucemia Linfocítica de Células Crônicas B (LLC-B), o LF apresenta pequenos linfócitos com núcleo clivado ou certo polimorfismo de pequenas e grandes células em ausência de células borradas - manchas de *Gümprecht* (BAIN et al., 1995).

Dois tipos de células B do centro germinal podem ser observadas em proporções variadas: células de pequeno a médio tamanho (comparadas ao pequeno linfócito), com núcleo irregular ou clivado e citoplasma escasso são chamadas de centrócitos (Figura 3.A); e células grandes, três vezes o tamanho do pequeno linfócito, de cromatina nuclear frouxa, nucléolo proeminente e pequena quantidade de citoplasma que são chamadas centroblastos (Figura 3.B) (SWEDERDLOW et al., 2008). A transformação para alto grau é caracterizada por células de grande tamanho, freqüentemente com núcleo irregular e nucléolo proeminente (MATUTES, 2007).

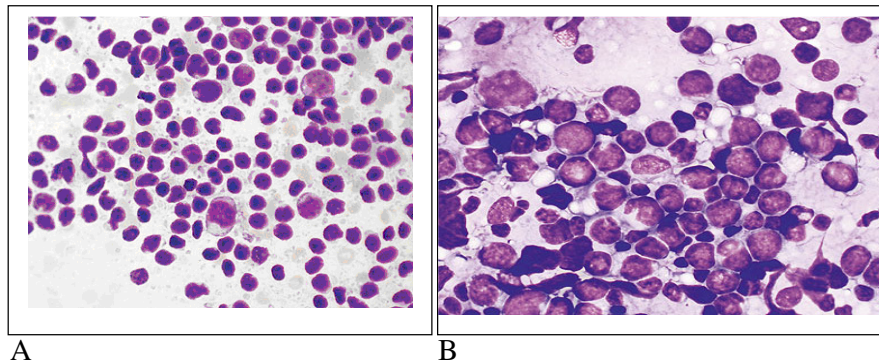


Figura 3: Morfologia de Linfoma Folicular grau I e III realizada em amostra de PAAF. A) Linfoma Folicular grau I, mostrando predomínio de células pequenas (Romanowsky, 600x); B) Linfoma Folicular grau III com aumento de células grandes (Romanowsky, 600x). Fonte: GONG, 2002.

Os distintos tipos histológicos podem ser agrupados em graus de malignidade de alto significado prognóstico (Quadro 2), seguindo os critérios de classificação da OMS. O LF geralmente se apresenta como de baixo grau de agressividade (70%), entretanto, em metade dos raros casos pediátricos são tumores de células grandes (grau III) (JAFFE et al., 2001).

Segundo a classificação OMS a proporção de células grandes, centroblastos, difere esta malignidade em grau 1, grau 2, grau 3a ou grau 3b (Tabela 3). Os linfomas de grau 1 a 3a apresentam comportamento de linfoma de baixo grau, sendo o 3b mais agressivo similar ao LDGC (SWERDLOW, 2008). Apesar de sua agressividade, o LF de grau III apresenta maior potencial de cura, se tratado com uma terapia agressiva (JAFFE et al., 2001). Assim, a diferenciação do LF de outras neoplasias é de grande valia na escolha do esquema terapêutico adequado.

Tabela 3: Diferentes graus de linfoma folicular.

Grau	Definição
Grau 1 – 2 (baixo grau)	0 – 15 de centroblastos por hpf
1	0 – 5 de centroblastos por hpf
2	6 – 15 de centroblastos por hpf
Grau 3	>15 centroblastos por hpf
3A	Centrócitos presentes
3B	Predomínio de centroblastos
Padrão	Proporção folicular
Folicular	>75%
Folicular e difuso	25-75%
Focalmente folicular	<25%
Difuso	0%

* Áreas difusas contêm >15% de centroblastos por hpf são mencionados como linfoma de grandes células B com linfoma folicular (Grau 1-2, Grau 3A ou Grau 3B). hpf: *high-power Field* (objetiva de 40x).
Fonte: modificado de SWERDLOW, 2008

Análises fenotípicas das células B clonais mostram uma forte expressão de Imunoglobulinas de superfície (sIg), e de outros marcadores como o CD22 e CD20/FMC7 juntamente com reatividade para CD38. Além disso, o marcador CD79b é usualmente expresso em níveis intermediários entre LLC e Tricoleucemia. Em adição, estas células são geralmente CD10+ mas negativas para CD11c, CD23, CD103, com expressão elevada de BCL2 (STETLER, 2001). Em aproximadamente 25% dos pacientes a expressão de CD5 é detectada (MATUTES, 2007).

Do ponto de vista genético a anomalia típica desta neoplasia é a translocação t(14; 18)(q32;q21) presente em 70% a 95% dos casos (JAFFE et al., 2001). A proximidade com o gene imunoglobulínico de cadeia pesada ou mutações associadas desregulam o gene BCL2 em 18q21, tornando as células resistentes a apoptose (BAIN, 2003). Este gene, codifica a proteína de 25-kDa BCL2 que inibe a indução da apoptose através de mecanismos mitocondriais, e quando desregulado está intimamente relacionado com a patogênese do tumor (BEATO, 2003).

Em contraste ao locus IgH o modelo de quebra em BCL2 é mais complexo. A maior parte dos pontos de quebra, 60% a 70% dos casos, ocorre na região MBR (*major breakpoint region*), e 20 a 30% dos casos, na região mcr (*minor breakpoint region*) do gene BCL2 (Figura 4) (EVANS et al., 2003).

Nas translocações variantes observadas com menor frequência, t(2;18)(q12;q21) e t(18;22) (q21;q11), o BCL2 é desregulado pela proximidade dos genes κ e λ , respectivamente (BAIN, 2003).

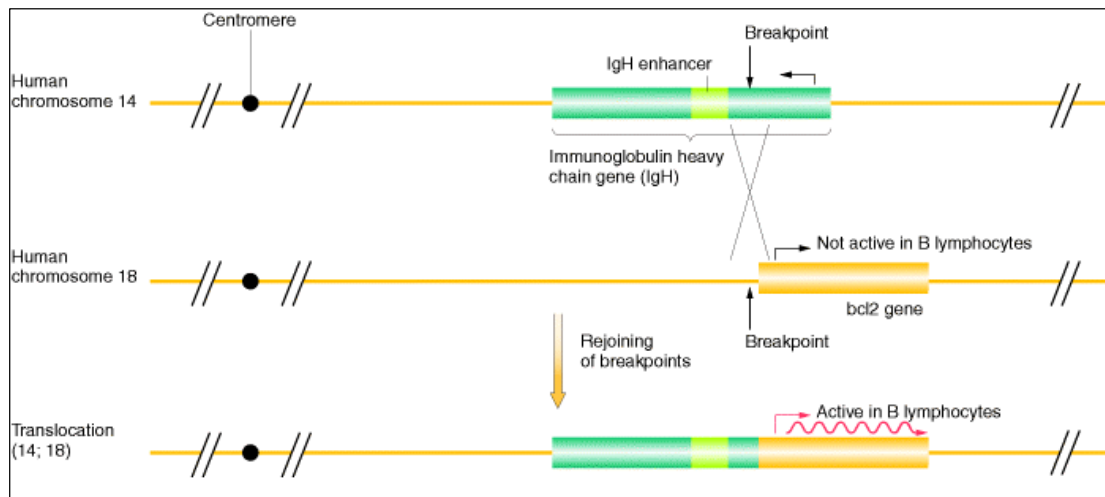


Figura 4: Representação esquemática da translocação entre os cromossomos 14 e 18.

Próximo do ponto de quebra do cromossomo 14 localiza-se um potenciador transcricional do gene de imunoglobulina. Este elemento transcricional é fusionado ao gene BCL2, que é um regulador negativo da apoptose. Esta fusão potenciador-bcl2 induz a superexpressão de BCL2 de linfócitos B. Devido ao bloqueio da apoptose os linfócitos B mutantes tem um tempo de vida incomum e desta forma se acumulam. Fonte: Griffiths et al., 1999.

A ocorrência da t(14; 18) não é restrita a células de linfoma, em torno de 50% a 60% dos indivíduos saudáveis apresentam o ponto de quebra MBR, entretanto em frequências de uma célula em 10^4 a 10^6 em amostras de MO, SP, baço e gânglios. A incidência parece estar relacionada com idade, histórico de fumo, sexo e exposição a pesticidas (JONG, 2005).

1.6.2. Linfoma difuso de grande célula B

O LDGC é considerado uma categoria específica, com diversidade de apresentações clínicas, morfológicas, genéticas e alterações moleculares, fortemente sugestivas de que estes tumores representem um grupo heterogêneo de neoplasias do que uma entidade clínica patológica única (COLOMO, 2003).

Estes pacientes podem apresentar doença nodal ou extra nodal, sendo o trato gastrointestinal a localização extra nodal mais comum (JAFFE et al., 2001). Somente uma pequena proporção dos LDGC (< 5%) mostra envolvimento periférico ao diagnóstico (ORFAO, 2003). Pelo fato de apresentar subtipos morfológicos distintos, parâmetros imunofenotípicos e moleculares tornam-se necessários para sua caracterização (JAFFE et al., 2001).

O fator morfológico comum nestas neoplasias é o tamanho das células patológicas, usualmente 4 – 5 vezes o tamanho de um pequeno linfócito. São representados por células pleomórficas, com núcleos arredondados, irregulares, lobulados ou clivados, cromatina frouxa, presença de nucléolos, citoplasma abundante e basofílico. Suas variantes morfológicas são centroblástico, imunoblástico e anaplásico (Figura 5) (SWERDLOW, 2008).

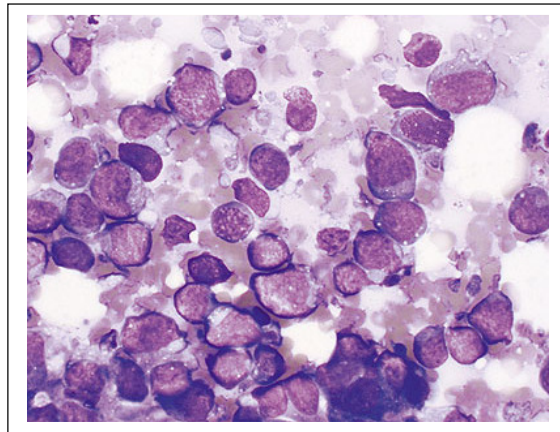


Figura 5: Morfologia de Linfoma Difuso de Grande Célula B realizada em amostra de PAAF. Linfoma difuso de grande célula B com predomínio de células grandes (Romanowsky, 600x).
Fonte: GONG, 2002.

Tipicamente, a presença de grandes imunoblastos e/ou centroblastos pode ser evidenciada por citometria de fluxo a partir das características de dispersão de luz (FSC e

SSC). LDGC mostram reatividade para marcadores pan-B como o CD19, FMC7/CD20, CD22, CD79b e Igs, e, em mais de 50% dos casos, as células neoplásicas são CD10+. Entretanto muitos pacientes portadores de LDGC, com fenótipo CD5 e CD23 negativos, podem ter expressão variável destes antígenos (ORFAO, 2003).

A partir do perfil de expressão gênica é possível dividir este grupo em duas categorias distintas: os LDGC do centro germinal, que apresentam relação com as células do centro germinal e aqueles em que o padrão é similar ao das células de sangue periférico ativadas *in vitro* - LDGC ativadas (COLOMO, 2003). Em torno de 30% dos casos de LDGC derivam do centro germinal (ROSENWALD, 2002).

As anormalidades genéticas mais comuns são aquelas típicas do linfoma folicular, uma vez que a translocação t(14; 18) (q32; q21) não é específica para LF e tem sido observada em 30% dos LDGC (JAFFE et al., 2001). Estes casos podem representar transformações histológicas de LF prévio. O segundo grupo de anormalidades mais observado é aquele com recombinação do gene BCL6/LAZ3 em 3q27, incluindo a t(3;14)(q27;q32). Os demais casos demonstram anormalidades citogenéticas variadas. O BCL6 está associado com rearranjos cromossômicos envolvendo 3q27. Este rearranjo é encontrado em uma pequena proporção de linfomas foliculares (6% a 13%), mas em 20 a 40% dos LBGC (BAIN, 2003).

Apesar dos LDGC serem agressivos (Quadro 2), são potencialmente curáveis se corretamente diagnosticados e tratados com uma quimioterapia multi abrangente e específica (JAFFE et al., 2001). A classificação adequada dos diferentes subtipos de neoplasias linfoproliferativas crônicas é de grande importância na seleção terapêutica adequada e precoce, assim como para a predição do prognóstico.

Metodologias moleculares específicas como a fluorescência por hibridização *in situ* e reação em cadeia da polimerase podem auxiliar de forma significativa na classificação destes tumores bem como fornecer um monitoramento após a terapia com o objetivo de avaliar uma possível recaída da doença.

1.7. Técnicas citogenéticas e moleculares no diagnóstico onco-hematológico

Os recentes avanços em genética molecular tem importante impacto nas áreas de hematologia e oncohematologia. Existem muitas características de cariótipo e moleculares que podem auxiliar no diagnóstico, na conduta terapêutica e na predição de prognóstico. Esta evolução deveu-se principalmente ao aperfeiçoamento tecnológico atual. Embora muito laboriosa, a técnica de cariótipo convencional ainda continua a ser a base da triagem técnica podendo detectar múltiplas anormalidades. A técnica de *Southern Blotting* mostrou-se útil na identificação de clonalidade em tumores linfóides, demonstrando os rearranjos de imunoglobulinas e de receptores de células T. No entanto, é morosa e em alguns casos o resultado não é claro (VAN DONGEN et al., 2003).

A PCR aumenta significativamente a sensibilidade de detecção do rearranjo gênico e reduz significativamente o tempo de estudo. A função do PCR é de amplificar o DNA extraído do tecido tumoral e submeter o DNA fracionado à eletroforese (VIZMANOS et al., 2002; BROWN, 2003). A recente utilização de eletroforese capilar para substituir eletroforese em gel melhora a sensibilidade e precisão desta técnica (DIONISI et al., 2006). Além dos rearranjos gênicos dos receptores, a PCR também pode identificar oncogenes, translocações cromossomais e mutações genéticas. A detecção da

mutação JAK2 é uma técnica muito importante para o diagnóstico de policitemia vera, mielofibrose idiopática crônica, e trombocitemia essencial (LEVINE et al., 2005; ZHAO et al., 2005). A mutação FLT3 pode ser demonstrada em cerca de 30% dos casos de Leucemia Mielóide Aguda e pode ajudar na escolha da estratégia terapêutica (LEE et al., 2007). O uso da transcrição reversa seguida por amplificação gênica (RT-PCR), reforça ainda mais a sensibilidade da técnica tornando-a uma ferramenta muito útil na detecção de doença residual mínima (BOROWITZ et al., 2008).

A técnica de FISH, no entanto, revolucionou o campo da citogenética. Devido à sua sensibilidade, muitas anomalias citogenéticas que não são demonstradas por cariotipagem têm sido demonstradas por FISH. O princípio do FISH é o uso de sondas de DNA marcadas com fluorocromos para identificar genes anormais ou oncogenes em células tumorais. Com o aumento do número de sondas, o FISH tornou-se uma ferramenta indispensável para o diagnóstico precoce e preciso de muitos tumores. A detecção das fusões BCR/ABL e PML/RARA fornece um diagnóstico definitivo da Leucemia Mielóide Crônica e da Leucemia Promielocítica, respectivamente, e o paciente pode ser tratado rapidamente (MIN et al., 2005).

O mais recente desenvolvimento no campo da genética molecular é a técnica de perfil de expressão gênica. Com a técnica de *microarray* centenas de genes podem ser rastreados, ocorrendo um padrão específico para cada neoplasia estudada, o que é designado como assinatura gênica de um determinado tumor. O grande potencial desta técnica já foi demonstrado para o diagnóstico, classificação, predição de prognóstico, e a orientação do tratamento de neoplasias hematológicas. Os exemplos incluem Linfoma de células do Manto, Leucemia Mielóide Aguda, e Leucemia Linfóide Aguda (RIZZATTI,

2004; FATTORI, 2006). Perfis de expressão gênica também podem ajudar a descobrir e identificar importantes genes em diferentes neoplasias.

1.8. Justificativa

Tradicionalmente tanto o diagnóstico quanto a classificação dos linfomas são feitos por meio da biópsia cirúrgica da neoplasia e do exame histológico com imunohistoquímica. No entanto, nos últimos 10 anos, a aplicação de técnicas de imunofenotipagem por citometria de fluxo e estudos citomorfológicos vem sendo utilizados em vários centros diagnósticos, devido à rapidez e à eficiência dos resultados (GONG et al.; 2002)

Porém, uma das restrições da avaliação citomorfológica é que se perde o padrão da arquitetura tecidual (GONG et al., 2002). Na atual classificação OMS para os linfomas, a arquitetura morfológica permanece como importante parâmetro para a classificação, embora o diagnóstico dos linfomas também possa ser baseado na informação combinada do imunofenótipo, genótipo e manifestações clínicas, as quais por si só fornecem informações suficientes para a conduta clínica. Além disso, parâmetros moleculares fornecem informações importantes principalmente nos casos em que os dados morfológicos e de imunofenotipagem são inconclusivos permitindo assim a classificação destas neoplasias clínicas.

Desta forma, é importante estabelecer-se uma correlação entre os perfis imunofenotípico por citometria de fluxo, citomorfológico e genotípico, nos casos de LF e de LDGC, assim como avaliar a presença da alteração molecular nos casos em que os padrões morfológicos e imunofenotípicos não foram conclusivos.

No Brasil o diagnóstico das leucemias e linfomas é frequentemente tardio, havendo o encaminhamento para tratamento dos pacientes em estágios avançados. Considerando que 85% a 90% destes pacientes pertencem ao Sistema Único de Saúde (SUS), a garantia de um suporte diagnóstico e hospitalar adequado é um tema que gera muitas discussões.

Atualmente para realizar o diagnóstico dos Linfomas e Leucemias, no Estado de Santa Catarina dispomos de várias técnicas: Hemograma, Mielograma, Imunofenotipagem por citometria de fluxo e imunohistoquímica, realizadas em laboratórios pertencentes a duas instituições, o Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON) e o Centro de Hemoterapia e Hematologia de Santa Catarina (HEMOSC).

O CEPON é o órgão central do sistema de prevenção e assistência, na área do câncer, no Estado de Santa Catarina, conforme decreto nº. 2.701 10/03/98. Suas funções são o controle e avaliação das atividades e pesquisas oncológicas no Estado, em consonância com a política estadual de saúde e normas federais pertinentes. O serviço de Hematologia do CEPON oferece atendimento ambulatorial e hospitalar. A implantação da Unidade de Transplante de Medula Óssea com o uso de materiais técnicos e de alta complexidade permitiu o aumento do índice de remissão e cura de pacientes em idade produtiva, evitando o deslocamento para outros estados.

O HEMOSC atua principalmente na área de hemoterapia, porém oferece serviços de ambulatório para pacientes hematológicos não oncológicos e hematologia laboratorial.

A distribuição dos laboratórios é a seguinte:

HEMOSC

Laboratório de Marcadores Celulares (Mielograma e Imunofenotipagem)

Laboratório de Hematologia (Hemograma)

CEPON

Laboratório de Anátomo-patologia (Biópsia de medula óssea, linfonodos e Imunohistoquímica)

Para a realização da citogenética e estudos moleculares se utiliza o sistema particular, o que nem sempre pode ser feito em todos os casos. A classificação precisa das leucemias e linfomas é o ponto fundamental para o tratamento adequado e o seu prognóstico. Desta forma os pacientes de alto risco podem ser tratados com terapias mais intensivas e eficazes, e os pacientes considerados de baixo risco que apresentam melhor sobrevida são poupados dos efeitos deletérios de tratamentos mais intensivos.

Assim a implantação de técnicas moleculares direcionadas ao diagnóstico onco-hematológico, permitirá oferecer diagnósticos mais rápidos, precisos e completos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Padronizar a detecção da translocação t(14;18)q(32;q21) através da reação em cadeia da polimerase (PCR), assim como estabelecer uma relação entre as características imunofenotípicas e moleculares, por citometria de fluxo e PCR, respectivamente, nos Linfomas Folicular e Difuso de Grande Célula B.

2.2. Objetivos Específicos

Padronizar a detecção da translocação t(14;18)(q32;q21) através da reação de PCR multiplex ;

Determinar a frequência da translocação t(14;18)(q32;q21) pela técnica de PCR nas amostras estudadas;

Correlacionar os dados de caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo e o estudo molecular da translocação t(14;18)(q32;q21) utilizando técnica de PCR, em pacientes com LNH-B.

3. Material e Métodos

3.1. Considerações éticas

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (Projeto nº. 317/2004), assim como pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON) (Parecer nº. 15/2005). Os pacientes foram esclarecidos quanto aos objetivos da pesquisa e os que demonstraram interesse em participar do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (anexo A).

3.2. Seleção de amostras

Foram selecionadas amostras de 75 pacientes procedentes de vários municípios do estado de Santa Catarina, de ambos os sexos: 37 do sexo masculino e 38 do sexo feminino, com idades variando de 29 a 88 anos, encaminhadas ao Laboratório de Marcadores Celulares no Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC) para diagnóstico e estadiamento de síndromes linfoproliferativas B maduras, entre o período de junho de 2004 e dezembro de 2008.

Os tipos e número de amostras clínicas nos grupos avaliados estão detalhados na tabela 4.

Tabela 4: Amostras clínicas avaliadas no presente estudo.

Amostras*		Hiperplasia Reacional	Linfoma da Zona do Manto	Linfoma Folicular	Linfoma de Grande Células
Número (83)		10	20	38	15
Tipos	MO (19)	0	4	12	3
	SP (17)	0	12	4	1
	BL (26)	10	1	12	3
	PAAF (16)	0	3	9	4
	LA (1)	0	0	0	1
	LPI (1)	0	0	0	1
	LPe (1)	0	0	0	1
	LCR (2)	0	0	1	1

* medula óssea (MO), sangue periférico (SP), biópsia de linfonodo (BL), punção aspirativa por agulha fina (PAAF), líquido ascítico (LA), líquido pericárdico (LPe.), líquido pleural (LPI.) e líquido cefalorraquidiano (LCR).

O diagnóstico foi realizado a partir da avaliação citomorfológica da população linfóide corada pelo método de May-Grunwald-Giemsa (MGG) e pelas características de tamanho celular (FSC). O perfil imunofenotípico foi avaliado por citometria de fluxo, conforme detalhado a seguir, sendo posteriormente classificadas, seguindo a classificação de neoplasias de células B maduras proposta pela OMS (SWERDLOW et al., 2008).

As amostras de sangue periférico (SP) e medula óssea (MO) foram coletadas e conservadas em anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), enquanto que amostras de biópsias de nódulos linfáticos e os líquidos corporais foram conservadas em tampão fisiológico e submetidas ao teste em no máximo 2 horas após a coleta.

3.3. Preparação do sedimento celular

As amostras de sangue foram submetidas à separação de células mononucleares (CMN) por centrifugação em gradiente de densidade. Aproximadamente 3 ml de SP ou de MO foram adicionados a 1,5 ml de Ficoll-Hypaque 1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis) para separação de leucócitos. Após centrifugação, a 2.000 x g por 25 min. à temperatura ambiente, a camada de leucócitos foi coletada em um tubo de 1,5 ml e submetida à nova centrifugação a 2.000 x g por 5 min. Após a remoção do sobrenadante, o sedimento celular foi lavado em tampão PBS e armazenado em nitrogênio líquido até o seu uso.

As biópsias foram maceradas em tampão fisiológico para dissociação das células e, assim como os líquidos corporais, centrifugadas 2.000 x g por 5 min. à temperatura ambiente. Da mesma forma que o sangue, o sobrenadante foi descartado por inversão do tubo e o sedimento preservado em nitrogênio líquido até o seu uso.

3.4. Avaliação citomorfológica

3.4.1. Avaliação morfológica com coloração de May-Grunwald-Giemsa

Os esfregaços das amostras de SP e MO, coletados em EDTA foram realizados imediatamente após a coleta; nas BLs armazenadas em tampão fisiológico foi realizado o *imprint* e nos líquidos corporais (PAAF, Lpl., Lpe. e LCR) foi realizada concentração celular pelo método do citospin em citocentrífuga (Cytospin, SHANDON®) a 800 rpm, por 6 min.. Logo após a secagem, foram coradas pelo método de May-Grünwald-Giemsa e visualizadas em microscópio óptico (NIKON, E400®) em objetiva de 40x/0.65;

50x/0.95 *oil* e 100x/1.25 *oil*.

Foram avaliados na população linfóide: o tamanho e forma celular, quantidade de citoplasma, presença de irregularidades de membrana nuclear, características da cromatina, presença de nucléolo e de células borradas (“Mancha de *Gumprecht*”).

O tamanho foi definido utilizando como parâmetro o tamanho de um pequeno linfócito. A célula grande foi definida como duas ou mais vezes o diâmetro de um pequeno linfócito, com cromatina frouxa e presença de um ou mais nucléolos. A de tamanho intermediário foi definida como 1,5 a 2 vezes o diâmetro de um pequeno linfócito. Um total de 200 células foi contado em no mínimo cinco campos (GONG et al., 2002).

3.4.2. Avaliação do tamanho celular por citometria de fluxo

A citometria de fluxo permite a avaliação multiparamétrica da célula. As medidas de dispersão frontal de luz, chamada FSC (*forward scatter*) que está relacionada as características de tamanho, e de dispersão lateral de luz, chamada SSC (*side scatter*) relacionada as características de complexidade interna da célula, podem ser úteis na avaliação do tamanho celular.

Desta forma, o tamanho das células foi avaliado a partir das características de dispersão frontal da luz (FSC) comparando os linfócitos neoplásicos aos pequenos linfócitos normais da amostra, nos diferentes grupos avaliados. As medidas de FSC foram quantificadas usando programa estatístico *Cell-Quest* a partir do índice calculado entre as células linfóides neoplásicas e as células linfóides T (CD3+) (GONG et al., 2002).

3.5 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

3.5.1. Determinação do perfil imunofenotípico das neoplasias linfóides B maduras

Para a determinação dos perfis imunológicos foi utilizada a técnica de imunofluorescência direta seguida de lise de eritrócitos, conforme metodologia previamente descrita por Stewart, com pequenas modificações descritas a seguir (STEWART, 1995). Para tanto, 100µL das amostras ajustadas para uma concentração celular de 1×10^6 células/mm³ foram incubadas com 10µL dos anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos por 15 min. à temperatura ambiente, em ausência de luz (Tabela 5).

Após a incubação as hemácias presentes nas amostras foram lisadas pela adição da solução de lise (FACs lysyng solution®) por 10 min.. A seguir, as células foram centrifugadas, 2.000 x g por 5 min., e o sedimento foi ressuspense em 0,5 mL de tampão salina fosfato (PBS) pH 7,2/ formaldeído a 2%. Na avaliação de restrição de cadeias leves tipo kappa ou lambda foi realizada uma incubação prévia à marcação com o anticorpo monoclonal (AcMo), por 30 min. para minimizar marcações inespecíficas.

Para a marcação intracitoplasmática de BCL2 as células foram incubadas aos reagentes do kit de permeabilização celular (Caltag, Burlingame, CA) conforme metodologia previamente descrita (KAPPELMAYER, 2000).

Em todas as amostras foi utilizado um controle negativo, contendo controles isotípicos dos antígenos pesquisados marcados com FITC, PE e PC-5.

3.5.2. Painéis utilizados

Foi realizado o método da tripla marcação, com anticorpos monoclonais pré conjugados com diferentes fluorocromos - fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e ficoeritrina-cianina (PECy5). Estes anticorpos são dirigidos contra antígenos de superfície de células B: CD19, CD10, CD20, FMC-7, CD22, CD23, CD79b, CD103, anti-IgM, anti-Kappa, anti-Lambda, o antígeno leucocitário comum (CD45) assim como intracitoplasmático: antígeno BCL-2 (Tabela 5) (WOOD et al., 2007).

Tabela 5: Painel de Anticorpos Monoclonais utilizados na avaliação das neoplasias linfóides de células B maduras.

AcMo/ Fluorocromo	Especificidade	Clone	Fonte Comercial*
Kappa FITC	Cadeia leve κ		BDIS
Lambda PE	Cadeia leve λ		BDIS
CD10 FITC e PE	Linfócito B imaturo	Anti – CALLA, clone HI10a	BDIS
CD20 FITC	Linfócitos B maduros exceto plasmócitos	Leu – 16, clone L27	BDIS
CD5 PE	Linfócitos T e linfócitos B de memória	L17F12	BDIS
CD24 FITC	Linfócitos B	ML5	BD-Pharmigen
CD79B PE	Linfócitos B	CB3-1	BD-Pharmigen
FMC7 FITC	Linfócitos B	FMC7	Dako
CD23 PE	Linfócitos B, linfócitos B ativados	EBVCS-5	BD-Pharmigen
IgM PE	Cadeia pesada μ		Dako
CD38 FITC	Linfócitos B imaturos, T ativados e plasmócitos	Clone HB7	BDIS
CD22 PE	Expressão citoplasmática em precursores B. Adquire expressão durante a maturação do linfócito B	Clone S-HCL-1	BDIS
CD11C PE	Alguns linfócitos B e alguns linfócitos T	Clone S-HCL-3	BDIS
CD103 FITC	Linfócitos B de tricoleucemia	Clone Ber- ACT8	Dako
CD25 PE	Linfócitos T e B ativados	Anti IL 2R, clone 2A3	BDIS
BCL2 FITC	Linfócitos T, alguns linfócitos B, negativo em células do centro germinal	Clone 124	Dako

***BDIS**: Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, Calif; **Dako** Cytomation, Glostrup, Denmark, **BD-Pharmigen** BD Pharmingen, San Diego, CA.

Na triagem foi utilizado um painel com três tubos (Tabela 6), onde foram identificados os leucócitos, a partir da expressão do pan-leucocitário CD45, os linfócitos T (CD3+) e suas subpopulações: T auxiliares (CD3+CD4+) e T citotóxicos (CD3+CD8+), e por fim os linfócitos B (CD19+) onde foi avaliado o tipo de restrição de cadeia leve da imunoglobulina, de superfície ou citoplasmática (IgKappa e IgLambda), para caracterização de monoclonalidade.

Tabela 6: Painel utilizado na caracterização das neoplasias linfóides de células B maduras.

Tubo	Anticorpos Monoclonais*
1	CD3(FITC) / CD19(PE) / CD45(PE/CY5)
2	CD4(FITC) / CD8(PE) / CD3(PE/CY5)
3	Anti-kappa(FITC) / Anti-lambda (PE) / CD19(PE/CY5)
4	CD20(FITC) / CD5(PE) / CD19(PE/CY5)
5	CD24(FITC) / CD79b(PE) / CD19(PE/CY5)
6	FMC7(FITC) / CD23(PE) / CD19(PE/CY5)
7	IgM(FITC) / CD38(PE) / CD19(PE/CY5)
8	CD22(FITC) / CD11C(PE) / CD19(PE/CY5)
9	CD103(FITC) / CD25(PE) / CD19(PE/CY5)
10	CD10(FITC) / BCL2 cit(PE) / CD19(PE/CY5)

*Fluorocromos conjugados: FITC (Fluoresceína), PE (Ficoeritrina), PE/CY5 (Ficoeritrina-cianina).

Após a avaliação de clonalidade das células B, foram realizadas várias combinações de AcMo para avaliação do perfil imunofenotípico desta população (tubos 4 a 10), conforme detalhado na tabela 6. O AcMo anti CD19 foi utilizado como referência da população linfóide B.

3.5.3. Aquisição e avaliação dos antígenos celulares

Os antígenos pesquisados, na superfície celular ou intracitoplasmáticos, foram adquiridos no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) sendo que foram coletados um total de 30.000 eventos, sendo que em amostras com baixo percentual de células B foi utilizada a estratégia de “gate” em CD19, contando o máximo de eventos possíveis. A análise foi realizada utilizando os programas CellQuest (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) e *Paint-A-Gate PRO* (BD).

A intensidade de fluorescência dos antígenos celulares foi determinada visualmente em histogramas de duas variáveis e classificados como de expressão negativa (-), fraca (-/+), moderada (+) ou forte (++), tendo como referência um controle interno negativo (linfócitos T). A quantificação de expressão dos antígenos celulares CD10, CD20, BCL2 foi medida a partir da média de intensidade de fluorescência (IMF) dos marcadores utilizando o programa CellQuest.

3.6. Extração de DNA

O sedimento celular foi descongelado e submetido a extração de DNA utilizando-se o kit de extração de (DNA QIAamp DNA Mini Kit – QIAGEN ®) seguindo a instruções do fabricante. Após a precipitação o DNA foi eluído em 50µL de água ultrapura e sua concentração e pureza estimada através da leitura em espectrofotômetro BioPhotometer (Eppendorf ®) (260/280 nm).

Para avaliação da integridade do DNA 2 μ L das amostras foram diluídas em tampão de amostra (xilenocianol 0,25%, azul de bromofenol 0,25% e glicerol 35%) e submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8% por aproximadamente 40 min. a 100V. O gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,01% v/v) e visualizado por exposição à luz UV em transiluminador MacroVue[®] (Hoefer, San Francisco, CA), sendo os resultados documentados de forma digital.

3.7. Detecção do rearranjo BCL2/IgH: t(14;18)(q32;q21)

As translocações cromossomais envolvendo o gene BCL2 são características do LF, sendo a t(14; 18) (q32; q21) a mais comum. Como consequência da translocação, o gene BCL2 (18q21) é justaposto à região promotora do gene IgH (14q32) resultando em um desequilíbrio em seu padrão normal, levando à super expressão do oncogene BCL2 (EVANS et al., 2003).

3.7.1. Iniciadores utilizados

Os iniciadores utilizados no presente estudo foram os indicados no protocolo BIOMED-2 (Tabela 7) e foram sintetizados pela Invitrogen do Brasil[®].

Tabela 7: Iniciadores e sequências utilizadas na PCR multiplex para detecção do rearranjo dos genes BCL-2/IgH.

Tubo A: Iniciadores MBR	
MBR1	5'- GAC CAG CAG ATT CAA ATC TAT GG - 3'
MBR2	5'- ACT CTG TGG CAT TAT TGC ATT ATA T - 3'
Controle positivo: linhagem celular DOHH2 / Tamanho do produto: ± 200pb	
Tubo B: Iniciadores 3'MBR	
3'MBR1	5'- GAC CCT GCT GGA TAC AAC ACT G - 3'
3'MBR2	5'- GGT GAC AGA GCA AAA CAT GAA CA - 3'
3'MBR3	5'- GTA ATG ACT GGG GAG CAA ATC TT - 3'
3'MBR4	5'- ACT GGT TGG CGT GGT TTA GAG A - 3'
Controle positivo: linhagem celular K231 / Tamanho do produto: ± 2800pb	
Tubo C: Iniciadores mcr	
5'mcr	5' CCT TCT GAA AGA ACG AAA GCA -3'
mcr1	5' TAG AGC AAG CGC CCA ATA AAT A - 3'
mcr2	5' TGA ATG CCA TCT CAA ATC CAA - 3'
Controle positivo: linhagem celular OZ / Tamanho do produto: ± 350pb	

Os iniciadores (5' -CCA ACC GTG AAA AGA TGA CC - 3' - F e 5'- GCA GTA ATC TCC TTC TGC ATC C - 3'- R) dirigidos para o gene beta actina foram utilizados como controles da amplificação.

3.7.2. Padronização da técnica de Reação em cadeia da polimerase (PCR)

DNA das linhagens tumorais DoHH2, K231, OZ e SC1, gentilmente doadas pelo Dr. Professor Martin J. S. Dyer da Universidade de Leicester, UK foram utilizados como controles positivos e o DNA de creme leucocitário de voluntários hígidos foram utilizados como controle negativo.

A padronização da PCR seguiu o protocolo BIOMED-2 para um sistema de PCR multiplex formado por três tubos de reação, com os diferentes iniciadores detalhados na tabela 7. No tubo A foram utilizados os iniciadores para detectar pontos de quebra em MBR, no tubo B e no tubo C foram utilizados os iniciadores para detectar os pontos de quebra 3'MBR e mcr respectivamente, conforme ilustrado na Figura 6. Em todos os tubos foi utilizado o iniciador consenso do gene de cadeia pesada de imunoglobulina, JH – 3' CCA GTG GCA GAG GAG TCC ATT C 5' (EVANS et al., 2003).

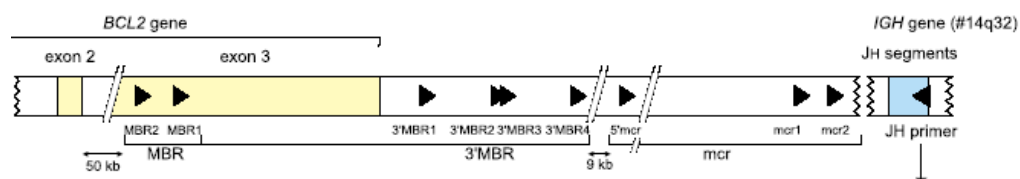


Figura 6: Diagrama esquemático dos pontos de quebra do gene BCL2 (18q21): MBR, 3'MBR e mcr. Fonte: modificado de EVANS et al, 2003.

As reações foram realizadas em um volume final 25µl, contendo 0,5 U de Taq DNA polimerase (KAPPA2G Robust DNA Polymerase ®), 1X o tampão A ou B (KAPPA2G®) que contém 1,5mM de MgCl₂, 1 X o potencializador 1 ou 2, 0,2mM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP), 25pmol de cada iniciador e 25ng de DNA molde.

No tubo A utilizando os iniciadores MBR1/MBR2 foi esperado um produto amplificado de aproximadamente 200pb. No tubo B utilizando os iniciadores 3'MBR1/3'MBR2/3'MBR3/3'MBR4 o produto amplificado esperado foi variável (200pb -1000pb). No tubo C utilizando os iniciadores 5'mcr/mcr1/mcr2 o produto amplificado esperado foi de aproximadamente 350pb (Tabela 7).

As reações de amplificação foram realizadas em Termociclador modelo Mastercycler Plus® (Eppendorf, Hamburg) nas seguintes condições de temperatura: uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min., seguido de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 seg., ligação dos iniciadores a 60°C por 40 seg., extensão a 72°C por 30 seg. e uma extensão final a 72°C por 3 min.

Três microlitros do produto amplificado foi misturado com igual volume de tampão de amostra (xilenocianol 0,25%, azul de bromofenol 0,25% e ficol 35%) e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e em sistema de minigel BIO-RAD a 100 V por 2 h. Após a corrida os géis foram corados pelo brometo de etídio ou pelo nitrato de prata, visualizados em transiluminador MacroVue UV20® (Hoefler San Francisco) e digitalizados.

3.8. Análise estatística

Os valores médios de intensidade de fluorescência dos antígenos celulares CD10, CD20, BCL2, assim como das características de tamanho por dispersão da luz (FSC) avaliados por citometria de fluxo, foram calculados para cada variável.

Para avaliação de significância estatística das diferenças entre as médias de intensidade de fluorescência dos grupos, utilizamos o método de ANOVA com pós-teste de Student-Newman-Keuls pelo uso do *software Graphpad* e para verificar se existe associação entre as variáveis estudadas entre os diferentes grupos, foi utilizado o teste do qui-quadrado. Em ambos os testes foram considerados significativos os valores quando $p \leq 0,05$.

Resultados e Discussão

5. Resultado e Discussão

Para analisar a relação entre o perfil morfológico, imunofenotípico e molecular das hiperplasias reacionais de linfócitos (HR), dos linfomas de células B do tipo folicular (LF), zona do manto (LM) e difuso de grandes células (LDGC) foram estudados 75 pacientes, no período entre junho de 2004 a dezembro de 2008. A média de idade dos pacientes foi de $57,2 \pm 15,1$ anos (variação 29 – 88 anos), sendo 37 (49,3%) do sexo masculino e 38 (50,7%) do sexo feminino (Tabela 8). A distribuição dos tipos de amostras clínicas avaliadas nos diferentes grupos está detalhada na Tabela 4.

Tabela 8: Sexo e idade média dos pacientes avaliados no presente estudo.

Pacientes		Hiperplasia Reacional	Linfoma da Zona do Manto	Linfoma Folicular	Linfoma Difuso de Grande Célula
Número (75)		10	20	30	15
Sexo	Masculino (M) (37)	5	13	11	8
	Feminino (F) (38)	5	7	19	7
Idade (X \pm DP)		47 (\pm 14,7)	67,9 (\pm 10,7)	53,8 (\pm 14,6)	54,6 (\pm 15)

Em relação à incidência por sexo, O LF tem um padrão diferente comparado aos outros linfomas, uma vez que se apresenta sutilmente mais elevado em mulheres (58%), enquanto o LNH-B da zona do Manto tem uma alta predominância do sexo masculino (74%) (SWERDLOW et al., 2008).

Nos grupos de LM e LBGC avaliados neste estudo houve predomínio da população masculina, exceto no grupo de pacientes diagnosticados como LF em que a razão entre sexo foi F: M de 1,7: 1.

A análise morfológica das 83 amostras, foi realizada em esfregaços de MO e

SP, *imprints* (BL) e citocentrifugação (PAAF, LA, LPI, Lpe e LCR. Em cinco (6%) das amostras (quatro de MO e uma de SP) com fenótipo de células de LF, houve infiltração menor que 3% de células neoplásicas dificultando a caracterização morfológica das mesmas. As demais amostras puderam ser avaliadas morfológicamente.

A avaliação de tamanho por citometria de fluxo foi realizada em todas as amostras. Os resultados referentes às análises citomorfológicas estão detalhados na tabela a seguir.

Tabela 9: Avaliação citomorfológica por coloração de MGG e do tamanho celular por citometria de fluxo (FSC) nos diferentes grupos.

Número de casos	Morfologia (MGG*)	Média FSC** (\pm DP)	Diagnóstico Provável
30	Linfócitos de pequeno à médio tamanho, citoplasma escasso, núcleo globosos, ocasionalmente clivados ou com irregularidades na membrana nuclear, cromatina condensada e homogênea, nucléolos inconspícuos.	1,06 (\pm 0,28)	Linfoma Folicular
15	Células pleomórficas. Citoplasma abundante e basofílico Núcleos arredondados, irregulares, lobulados ou clivados. Cromatina frouxa. Presença de nucléolos.	2,2 (\pm 0,40)	Linfoma de Grande Células
20	Linfócitos pleomórficos, de médio tamanho, citoplasma de visível moderadamente abundante, núcleos redondos, clivados, com irregularidades na membrana nuclear, cromatina grosseira com nucléolos pouco visíveis, ou fina com nucléolos visíveis na forma blastóide.	1,14 (\pm 0,27)	Linfoma da Zona do Manto
10	População celular heterogênea	1,11 (\pm 0,17)	Hiperplasia Reacional

*MGG: May-Grunwald-Giemsa; **FSC: medida de dispersão frontal da luz relacionada as características de tamanho celular.

As características de tamanho celular por citometria de fluxo (FSC), dos

linfócitos B dos diferentes grupos de estudo mostrou diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,001$) entre o grupo de LDGC em relação aos outros grupos (Figura 7). Os 15 casos de LDGC apresentaram relação de FSC entre linfócitos B/linfócitos T maior que 1,7:1. Nas 5 amostras (6%) que apresentavam infiltração menor que 3%, a morfologia não detectou estas células neoplásicas. Na citometria de fluxo, utilizando a estratégia de *gates*, estas células foram caracterizadas fenotipicamente pela expressão de seus antígenos e de tamanho celular (FSC).

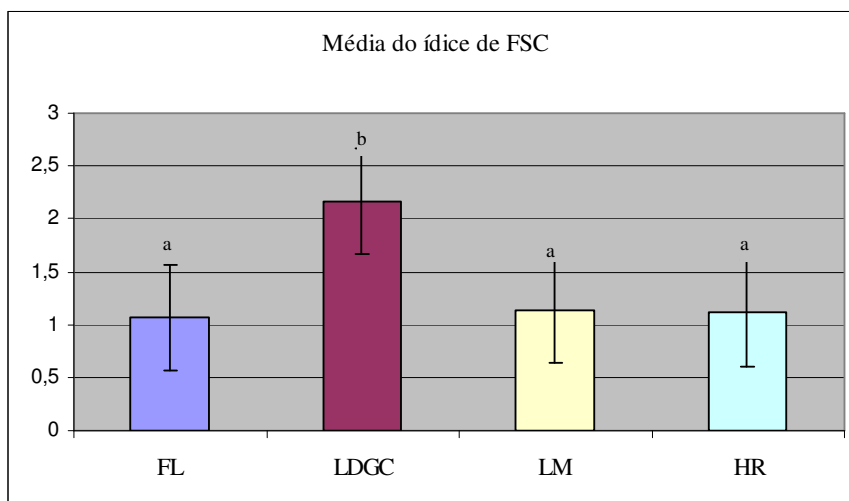


Figura 7 : Avaliação de tamanho dos linfócitos B por citometria de fluxo: Representação gráfica das médias de tamanho dos linfócitos B, por dispersão da luz (FSC), nos diferentes grupos avaliados. LF: linfoma folicular, LDGC: linfoma difuso de grande célula B, LM: linfoma da zona do manto, HR: hiperplasia reacional. Letras iguais representam diferenças não significativas.

Estudos têm demonstrado que a avaliação morfológica combinada à citometria de fluxo pode realizar o diagnóstico de uma parte substancial dos linfomas utilizando material de PAAF, sem haver necessidade da biópsia tecidual (GONG et al., 2002; MOURAD et al., 2006). Gong e colaboradores (2002) descreveram a utilidade da associação entre estas duas metodologias na identificação de células grandes em amostras de PAAF, principalmente quando ocorre transformação neoplásica. Nossos resultados

confirmam a utilidade da citometria de fluxo em identificar células de grande tamanho.

Na triagem inicial foi avaliada nas células linfóides B (CD19+) (Figura 8.A) a expressão de cadeias leves (κ ou λ) de imunoglobulina de superfície ou citoplasmática (Figura 8.B). Esta triagem é relevante, principalmente quando os estudos morfológicos - citologia e histologia - não conseguem distinguir com clareza se as células são monoclonais ou reativas.

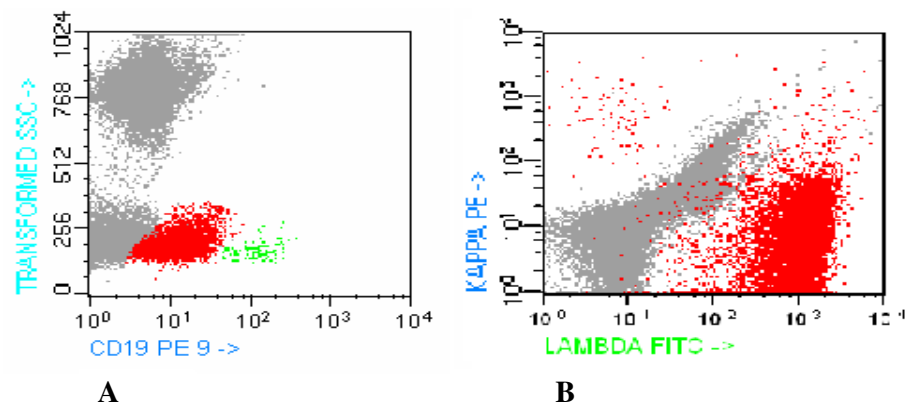


Figura 8: Histograma de dois parâmetros demonstrando a restrição de cadeia leve de membrana em um caso de síndrome linfoproliferativa B. A) Análise da expressão de CD19 versus SSC (complexidade interna celular); B) Análise da restrição de cadeia leve de membrana: Lambda positivo.

A restrição de cadeias leves κ ou λ utilizada como critério de monoclonalidade se baseia em amplos estudos realizados em amostras com populações policlonais. A relação κ / λ menor que 0.5 ou maior que 3 indica a presença de uma população clonal na amostra (ORFAO, 2003).

Porém, quando a população está em pequeno percentual, a expressão de cadeias leves deve ser avaliada no contexto celular, já que muitas vezes esta relação pode estar normal e há células neoplásicas na amostra. As mesmas são detectadas na citometria de fluxo através de suas características de dispersão de luz, expressão antigênica de CD19,

CD20, CD45 e outros marcadores antigênicos expressos de forma aberrante, de acordo com estágio maturativo ou linhagem celular (SANCHEZ et al., 2002).

A pesquisa da restrição de cadeias κ ou λ foi realizada em todas as amostras. Em 96,4% destas foi demonstrada monoclonalidade para kappa ou lambda (Tabela 10). Os 10 casos de HR apresentaram policlonalidade das cadeias leves, com relação κ / λ dentro dos valores de referência.

Tabela 10: Detecção de restrição de cadeia leve de Imunoglobulina em amostras nos grupos de linfoma avaliados.

Tipo de restrição de cadeia leve de Ig.	Linfoma da Zona do Manto	Linfoma Folicular	Linfoma de Grande Células
Imunoglobulina Kappa	9 (45)	18 (50)	7 (46,7)
Imunoglobulina Lambda	11 (55)	17 (47,4)	6 (40)
Não caracterizada	0	1 (2,6)	2 (13,3)

Em três amostras (3,6%), duas de LCR (LF e LDGC) e uma de MO (LF), não foi possível caracterizar o tipo de cadeia leve de imunoglobulina de membrana ou intracitoplasmática. Contudo o diagnóstico destas amostras foi de linfoma, conclusivo através de parâmetros citomorfológicos, imunofenotípicos e histopatológicos. Segundo dados da literatura este fenômeno pode ocorrer como resultado de defeitos a nível molecular devido a alterações na expressão gênica destas proteínas (KALEEM et al., 2000).

Entretanto, este fenômeno não ocorre somente em células neoplásicas. Subgrupos de células B normais do centro folicular, assim como raros casos de hiperplasia folicular em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS),

podem apresentar perda da expressão das cadeias leves de imunoglobulina de ambos os tipos (KALEEM, 2006).

Células linfóides B maduras neoplásicas podem ser distinguidas de células normais a partir da identificação de dois tipos de anormalidades fenotípicas: restrição de cadeia leve de imunoglobulina e expressão antigênica aberrante (CRAIG, 2008).

Desta forma, após a caracterização da clonalidade das células proliferantes com restrição para cadeia leve kappa ou lambda, procedeu-se a marcação celular com diversos AcMo para analisar o fenótipo da célula linfóide B, e assim estabelecer seu grau de maturação e aberração fenotípica.

A tabela 11 mostra os resultados de expressão de CD5 através de citometria de fluxo nos diferentes grupos avaliados.

Tabela 11: Avaliação da expressão de CD5 nas amostras dos diferentes grupos avaliados.

CD5	Linfoma da Zona do Manto	Linfoma Folicular	Linfoma de Grande Células
Positivo	20 (100%)	3 (9,2%)	0 (0%)
Fraca expressão	0 (0%)	2 (6%)	1 (10%)
Negativo	0 (0%)	28 (84,8%)	9 (90%)
Total	20	33	10

A imunofenotipagem por citometria de fluxo é utilizada para identificar fenótipos alterados. O antígeno CD5 é expresso comumente em linfócitos T, e a expressão deste antígeno em células B pode ser referida como um fenótipo aberrante,

entretanto uma pequena população normal de células B CD5+ pode existir (KÜPPERS et al., 2005).

É caracteristicamente presente em LM (BARRY, 2002) que acompanhado da presença de CD20 e imunoglobulina de superfície (IgM) de intensidade moderada à forte, ausência ou fraca intensidade de CD23 e FMC7 positivo diferencia o LM de LLC. Em contraste ao grupo dos LM, os LF e os LDGC geralmente apresentam negatividade para o antígeno CD5 (CRAIG, 2008).

No presente estudo todas as 20 amostras do grupo diagnosticado como LM apresentaram o antígeno de superfície CD5, o que está de acordo com os dados da literatura. Da mesma forma, a maioria das amostras do grupo de LF (84,8%) e do grupo LDGC (90%) foram negativas para CD5 (KALEEM, 2006).

Embora raros, existem casos de LF que apresentam a expressão do marcador CD5. Considerando que o LF é uma neoplasia originada a partir de células do centro germinal e que a transformação para LDGC ocorre em um terço dos casos, a presença deste fenótipo raro sugere a possibilidade de associação entre LF CD5+ com a transformação neoplásica à linfomas de alto grau como por exemplo o LDGC CD5+ (MANAZZA et al., 2002). VASSALO et al., (2007) demonstraram através da PCR a transformação de um LF em LDGC. Neste estudo, os autores reportaram um caso de LF de grau 1 que sofreu transformação à LDGC seis meses após o diagnóstico, sendo que ambos os tumores expressavam CD5, forte expressão de CD20, CD79a, BCL-2, BCL-6. Por outro lado, a expressão de CD10 fortemente positiva na amostra inicial mostrou-se fraca em LDGC.

De acordo com a frequência esperada, nossos resultados identificaram um caso (6,7%) de LDGD com CD5 de superfície. Aproximadamente 10% dos LDGC expressam

o antígeno CD5, podendo constituir um subgrupo a parte associado a fatores clínicos mais agressivos (YAMAGUCHI, et al., 2002). Os LDGC CD5+, raramente estão relacionados com transformação neoplásica de síndrome linfoproliferativa B de baixo grau (Síndrome de Richter) (CRAIG, 2008; SWEERDLOW, 2008).

Uma vez que a expressão de CD5 pode ocorrer em células B normais e de forma variável nas células neoplásicas, não deve ser avaliada isoladamente e sim em associação com outras anormalidades como alterações de cadeias leves e/ou intensidade antigênica de outros marcadores (CRAIG, 2008).

A avaliação dos antígenos CD10, CD20 e BCL2 baseou-se na intensidade média de fluorescência destes marcadores nos diferentes grupos. A molécula de CD10 é uma glicoproteína de membrana de 100-kDa expressa em uma variedade de células hematopoiéticas normais como as células B imaturas de MO, do centro germinal, tímócitos corticais e neutrófilos maduros. Em contrapartida, este marcador também está presente em células neoplásicas, incluindo a Leucemia Linfoblástica Aguda B (LLA-B), Linfoma Linfoblástico B (LL-B), Linfoma de Burkitt, LF, assim como em parte dos LDGC (ALMASTRI, 1998).

Em linfonodos reativos ocorre hiperplasia folicular, com aumento do número de folículos secundários. Células B normais do centro germinal, denominadas de centrócitos e centroblastos, presentes na porção central do folículo secundário dos linfonodos e tonsilas são freqüentemente conhecidas por expressarem CD10, enquanto que células de outras áreas incluindo zona do manto e paracorticais não o expressam (WEISS, 2008).

No presente estudo os espécimes clínicos obtidos de linfonodos de 10 pacientes com hiperplasia reacional mostrou que todas as amostram apresentaram alguma expressão de CD10 com média de intensidade de 23,8 ($\pm 16,4$).

Para as neoplasias maduras de LF e LDGCB a expressão de CD10 foi positiva em 36 amostras (92%) e 11 amostras (90%) com médias de intensidade de fluorescência de 110,69 ($\pm 92,3$) e 135,79 ($\pm 96,64$), respectivamente. Das 20 amostras de LM todas foram negativas para CD10 ($7,19 \pm 3,95$) (Figura 9).

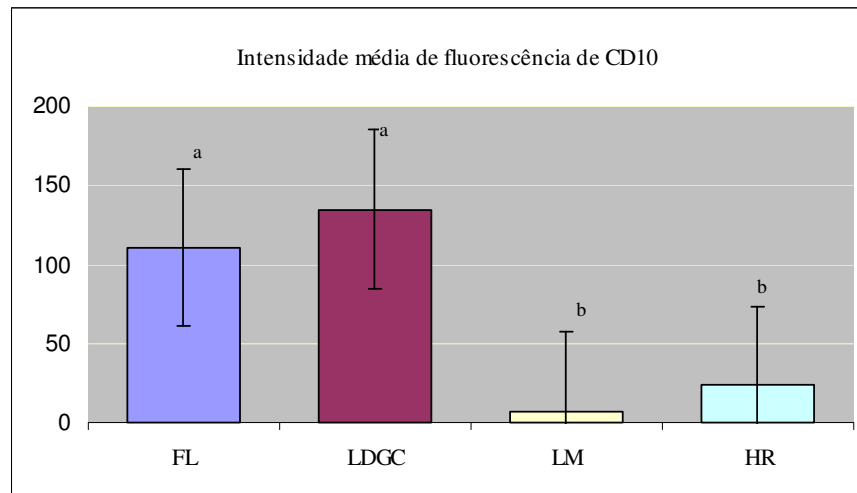


Figura 9: Representação gráfica da intensidade média de fluorescência do antígeno CD10 nos diferentes grupos avaliados. FL: linfoma folicular, LDGC: linfoma difuso de grande célula B, LM: linfoma da zona do manto. HR: hiperplasia reacional. Letras iguais representam diferenças não significativas.

A comparação da intensidade de expressão de CD10 entre os grupos de LF e LDGC em relação ao grupo de HR mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Conforme esperado, os grupos LDGC e LF apresentaram intensidade de expressão de CD10 maior que o grupo de LM ($p < 0,01$) (Figura 9). Desta forma os resultados deste trabalho corroboram a utilidade da avaliação da expressão de CD10 na diferenciação entre células B normais de células B neoplásicas.

A partir da avaliação de co-expressão de CD10 e BCL2 é possível identificar a população neoplásica (KALEEM et al., 2006), uma vez que as células normais do centro folicular não apresentam BCL2 (Figura 10) (CORNFIELD et al., 2000).

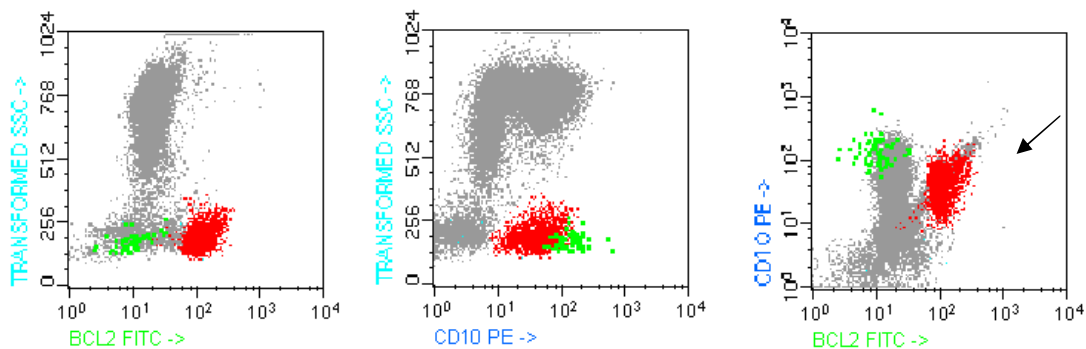


Figura 10: Histograma de dois parâmetros demonstrando um caso de síndrome linfoproliferativa B: Linfoma não Hodgkin B, tipo folicular. Nas células em verde padrão normal de expressão em células do folículo normais, e em vermelho as células neoplásicas. A) Análise da expressão de BCL2; B) Análise da expressão de CD10; C) Análise da expressão de BCL2 versus CD10, demonstrando a coexpressão anômala (seta) destes antígenos celulares nas células neoplásicas.

No grupo de pacientes com LF avaliados no presente estudo, a co-expressão aberrante de CD10 e BCL2 foi observada em 36 amostras (92%). Contudo, em duas amostras de MO, apesar da relação entre as cadeias leves kappa e lambda terem mostrado valores dentro da faixa de referência, foi detectada uma população alterada (0,9% e 1,1% de células). Entretanto, deve existir cautela nestes casos, ao afirmar a presença de células neoplásicas de LF. Cook, et al. (2003) enfatizaram em seu trabalho que a presença de uma pequena população (<2% dos eventos totais B) de células CD10 positivo com expressão aumentada de BCL2 pode ocorrer em linfonodos e em biópsia de tecidos sólidos normais.

Geralmente as HR contêm duas populações de células B (Figura 11). A primeira população expressa moderada intensidade de CD20 sem expressão de CD10 e correspondem as células do manto (ALMASRI, 1998). A segunda população de células corresponde as células do centro germinal com intensa expressão de CD20 (GADOL, 1988). Desta forma, o CD20 parece uma ferramenta útil na distinção entre células da zona do manto e do centro germinal em populações celulares linfóides B normais.

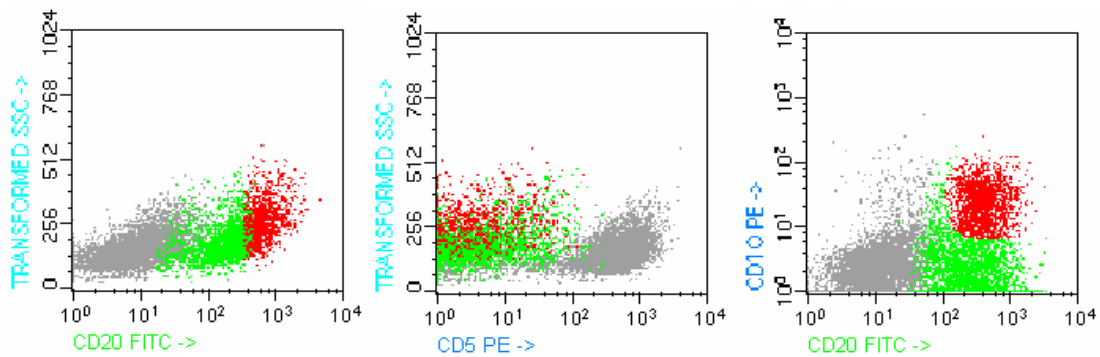


Figura 11: Histogramas de dois parâmetros demonstrando um caso de Hiperplasia Reacional. A população em verde representa as células da zona do manto e a população em vermelho células de centro germinal. A) Análise da expressão de CD20 moderada nas células do manto e forte nas células do centro germinal; B) Ausência de expressão de CD5; C) Expressão de CD20 versus CD10.

Se por um lado as células normais da região do manto apresentam moderada expressão de CD20 a sua variante neoplásica (LM) geralmente apresenta uma intensa expressão de CD20 associada à CD5 (Figura 12) (CRAIG, 2008). Nos vinte casos de LM avaliados no presente estudo, todos apresentaram esta co-expressão: CD20++ CD5+.

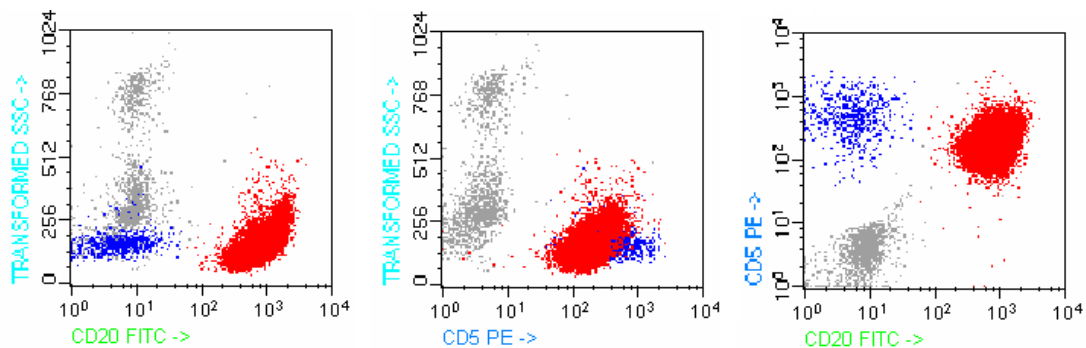


Figura 12: Histogramas de dois parâmetros demonstrando um caso de Síndrome linfoproliferativa B: Linfoma da Zona do Manto. A população em verde representa os linfócitos T e a população em vermelho células neoplásicas. A) Forte expressão de CD20 nas células neoplásicas; B) Expressão de CD5; C) Expressão de CD20 versus CD5, demonstrando a coexpressão destes antígenos celulares nas células neoplásicas.

Os resultados deste estudo demonstraram a presença de CD20 nas células B de todas as amostras avaliadas. Nas células reacionais dos linfonodos avaliados a

intensidade média de fluorescência foi 539,5 ($\pm 209,23$), nos LM foi de 591,5 ($\pm 235,9$), nos LF foi de 378,94 ($\pm 161,14$) e nos LDGC foi de 745,66 ($\pm 468,9$).

Apesar da utilidade do CD20 em diferenciar células normais, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de linfoma com os de HR (Figura 13). Este fato se deve, provavelmente, a mistura de células do centro germinal (CD20 intenso) com células do manto (CD20 moderado) presentes nas amostras de BL avaliadas.

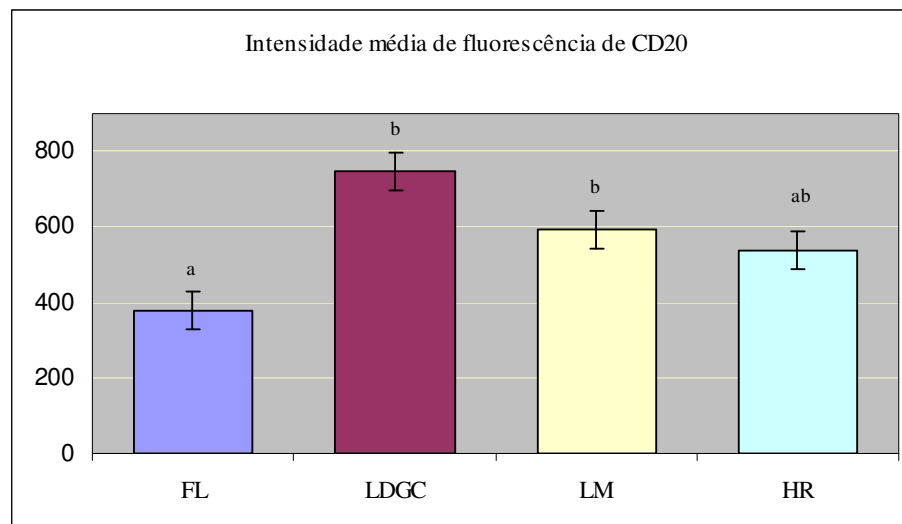


Figura 13: Representação gráfica da intensidade média de fluorescência do antígeno CD20 nos diferentes grupos avaliados. FL: linfoma folicular, LDGC: linfoma difuso de grande célula B, LM: linfoma da zona do manto. HR: hiperplasia reacional. Letras iguais representam diferenças não significativas.

A proteína de 26-kDa BCL2 está envolvida no mecanismo de regulação da apoptose. A expressão de BCL2 varia largamente durante a diferenciação normal das células B (MENENDEZ et al., 2004). Células B normais do centro germinal, centrócitos e centroblastos, não apresentam a proteína BCL2. O aumento anormal da expressão deste

antígeno pode ser observado em LF e em LDGC. Dados da literatura mostram que mais de 90% dos LF expressam altos níveis de BCL2 (JONG, 2005).

O diagnóstico diferencial entre LDGC e LB é difícil uma vez que estes linfomas de alto grau podem apresentar características morfológicas muito semelhantes. Neste sentido, o BCL2 pode ser uma ferramenta valiosa no diagnóstico diferencial destes linfomas.

Os resultados deste trabalho demonstraram uma expressão positiva de BCL2 em todos os grupos avaliados, entretanto com variações de fluorescência. A IMF foi de 49,22 ($\pm 13,58$), 265,93 ($\pm 186,24$) e 196,02 ($\pm 128,91$) e 111,39 ($\pm 63,77$), nos casos de HR, LF, LDGC e LM, respectivamente.

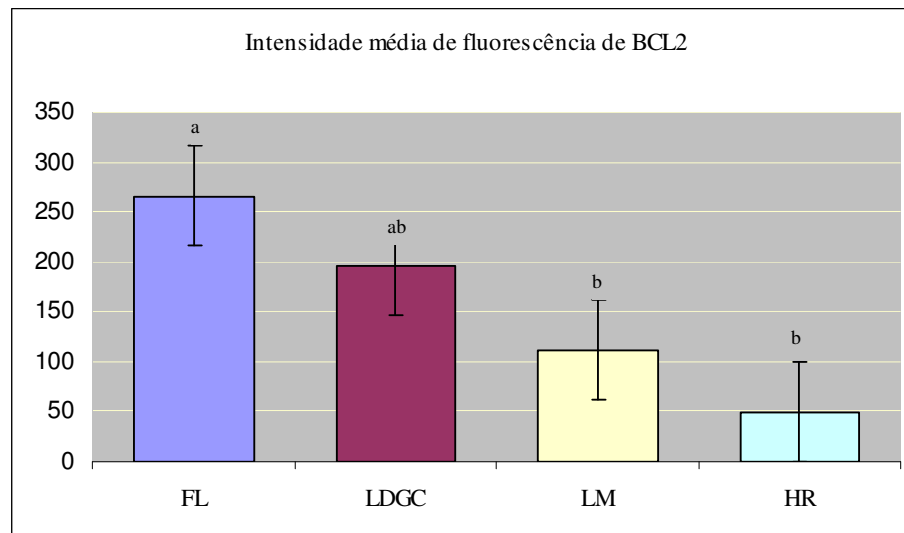


Figura 14: Representação gráfica da intensidade média de fluorescência do antígeno BCL2 nos diferentes grupos avaliados. FL: linfoma folicular, LDGC: linfoma difuso de grande célula B, LM: linfoma da zona do manto. HR: hiperplasia reacional. Letras iguais representam diferenças não significativas.

A IMF de BCL2 das amostras de LF mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0.01$) em relação aos grupos HR e LM (Figura 14).

Menendez et al. (2004) demonstraram em seu trabalho a utilidade da avaliação da expressão de BCL2 a partir do estudo de células B normais e suas similares neoplásicas. Concluíram que os LF com translocação t(14;18) e os linfomas MALT são os únicos grupos que apresentam a super expressão de BCL2 de maneira constante. De maneira geral não há super expressão de BCL2 em Linfoma de Zona Marginal Esplênico (LZME), Linfoma de Burkitt e Mieloma Múltiplo (MENENDEZ, 2004). Nossos resultados corroboram aos da literatura, demonstrando a super expressão de BCL2 nos LF.

A pesquisa da translocação t(14; 18) foi realizada nas amostras diagnosticadas com LF e LDGC através de parâmetros citomorfológicos e imunofenotípicos. Das 53 amostras enviadas para diagnóstico, em 46 (87%) a quantidade de material foi suficiente para obtenção de DNA (Tabela 12). As demais sete amostras apresentaram material insuficiente.

Devido ao fato das amostras terem diferentes origens e serem colhidas por procedimentos distintos, as quantidades recebidas em 13% dos casos permitiram apenas os estudos citomorfológicos e imunofenotípicos.

Tabela 12: Número e tipo de amostras de linfoma submetidas a reação de PCR.

	MO	SP	BL	PAAF	LA	LCR	LPI	LPe	Total
LF	11	4	12	8	0	1	0	0	36
LDGC	1	1	2	2	1	1	1	1	10

* medula óssea (MO), sangue periférico (SP), biópsia de linfonodo (BL), punção aspirativa por agulha fina (PAAF), líquido ascítico (LA), líquido pericárdico (LPe.), 1 de líquido pleural (LPI) e líquido cefalorraquidiano (LCR).

As reações de PCR foram realizadas utilizando iniciadores complementares às regiões: MBR; 3'MBR; mcr e JH como proposto por Evans e colaboradores (2003). Como controle positivo foi utilizado DNA das linhagens celulares DOHH2 (MBR); K231(3'MBR) e OZ (mcr) nas reações de amplificação. As amostras de pacientes que não apresentaram amplificação, foram submetidas a amplificação do gene de beta actina humana.

A amplificação dos pontos de quebra MBR1 e MBR2 na amostra padrão DOHH2 mostrou o fragmento esperado de ~200pb (Figura 15).

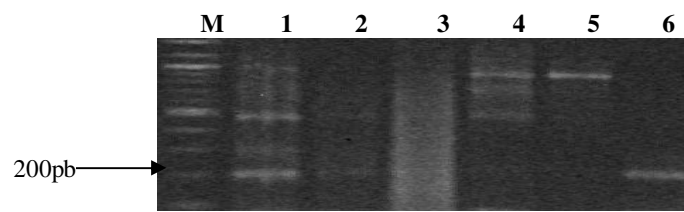


Figura 15: Padronização da reação de PCR na detecção da região MBR/JH. Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado pelo brometo de etídeo revelando os produtos de amplificação do ponto de quebra MBR utilizando-se diferentes tampões e potencializadores na preparação da reação de PCR. M: marcador de peso molecular (100pb ladder); 1 a 6 diferentes tampões e potencializadores.

Para determinação da sensibilidade dos iniciadores MBR1 e MBR2 foram realizadas reconstituições de DNA humano negativo com diferentes concentrações de DNA da linhagem celular DOHH2 na reação (Figura 16).

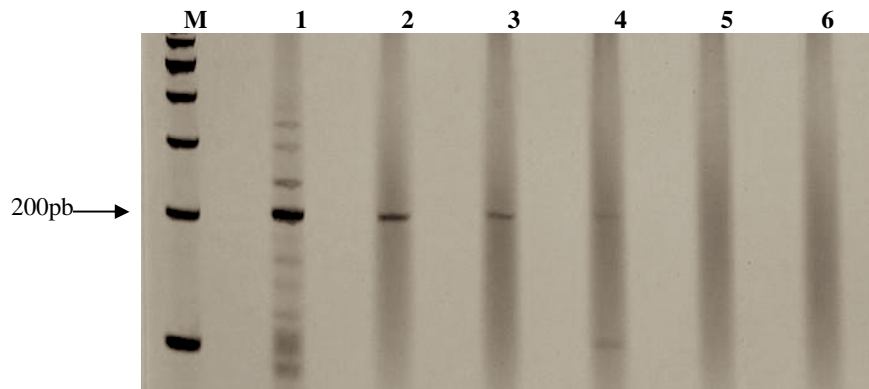


Figura 16: Sensibilidade dos iniciadores MBR1 e MBR2 /JH. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata revelando os produtos de amplificação da região MBR utilizando-se diluições seriadas de DNA da linhagem (DOHH2) (controle positivo) na presença de 200ng de DNA humano normal (controle negativo). M: marcador de peso molecular (100pb ladder); 1: 20ng de DNA de DOHH2; 2: diluição 1/10; 3: diluição 1/100; 4: diluição 1/1.000; 5: diluição 1/10.000; 6: Controle negativo.

Nas condições experimentais foi possível detectar o fragmento esperado até na diluição de 1/1.000. Dados da literatura mostram que a PCR apresenta melhor sensibilidade analítica (10^{-3} a 10^{-4}), quando comparado à citogenética convencional (10^{-1}) e a hibridização *in situ* FISH (10^{-1} – 10^{-2}) (GU, 2008).

Se por um lado a PCR se apresenta como um teste muito específico analiticamente e que pode ser realizado em poucas horas, sua sensibilidade diagnóstica varia de 65% a 70% na determinação das translocações presentes neste tipo de rearranjo. A metodologia de FISH possui maior sensibilidade diagnóstica, podendo detectar virtualmente todos os pontos de quebra BCL2/IgH, para os quais se tenha as sondas específicas. Contudo, sua sensibilidade analítica é inferior a da PCR e custo médio cerca de 10 vezes mais elevado (GU, 2008).

No presente estudo, dos 29 pacientes com diagnóstico de LF e dos 10 com diagnóstico de LDGC em 19 (65,5%) e 3 (30%) respectivamente, detectou-se o produto

de amplificação esperado de 200 pb relativo a translocação t(14;18) evidenciando o ponto de quebra MBR nestas amostras (Figura 17).

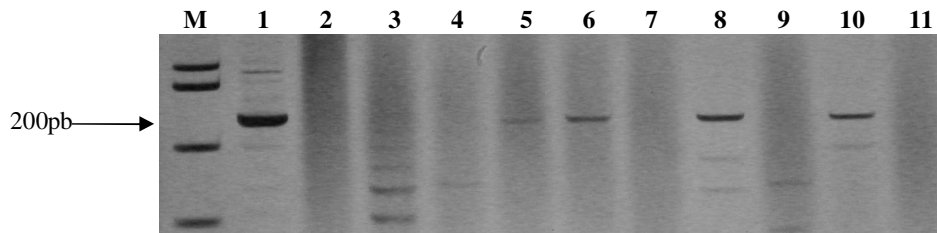


Figura 17: Detecção do ponto de quebra MBR/JH em amostras de pacientes. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% corado com nitrato de prata demonstrando a detecção da amplificação do ponto de quebra MBR em amostras de pacientes com LF ou LDGC. M: padrão de peso molecular (DNA de PuC digerido com Hae III); 1: Controle positivo (DOHH2); 5, 6, 8, 10: pacientes positivos; 2, 3, 4, 7, 9: pacientes negativos; 11: Controle negativo.

A translocação t(14;18) é uma das anormalidades citogenéticas mais bem caracterizadas em doenças linfoproliferativas B periféricas, sendo detectável em aproximadamente 90% dos LF e 20% dos LDGC dependendo do teste diagnóstico utilizado (EVANS et al., 2003). Segundo Barrans (2003), em linfoma folicular a detecção de pontos de quebra em MBR varia de 40 a 79% enquanto que em mcr este percentual varia de 5 a 10%. No presente estudo o ponto que quebra em MBR foi verificado em 65,5% dos casos de LF em 30% dos casos de LDGC.

Considerando a complexidade genética do rearranjo BLC/IgH devido e a existência de pontos de quebra não detectáveis pela PCR, a utilização de métodos combinados é aconselhável no diagnóstico diferencial de doenças linfoproliferativas. Desta forma, para a definição dos casos em que não foi possível detectar a translocação seria importante a avaliação utilizando uma técnica molecular secundária que eliminasse a possibilidade de falsos negativos, como o teste de FISH que apresenta maior sensibilidade diagnóstica, quando comparado à reação de PCR.

Ao contrário da reação da PCR para detecção do ponto de quebra MBR, as estratégias de amplificação para identificar sub-regiões associadas aos pontos de quebra entre 3'MBR e mcr não mostraram resultados consistentes. Mesmo testando os iniciadores em conjunto e separadamente em diferentes temperaturas de ligação, tampões e potencializadores comerciais, diferentes concentrações de MgCl₂ e presença de adjuvantes (DMSO e BSA) para diminuição de amplificação inespecífica, os padrões gerados foram muito complexos e não mostraram de forma clara o fragmento esperado de 800pb para a amostra K231 e 350pb para a amostra OZ, controles positivos para as regiões 3'MBR e mcr, respectivamente. Segundo Barrans (2003), os protocolos de amplificação dos pontos de quebra em 3'MBR e mcr parecem não estar bem validados e são de difícil execução. Em nosso estudo não foi possível a padronização da amplificação destes pontos de quebra devido a elevada complexidade do padrão de bandas.

Após inúmeras tentativas de padronização, foi avaliada a especificidade dos iniciadores 3'MBR e mcr através de um alinhamento utilizando a ferramenta Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os resultados mostraram que os iniciadores alinharam com 100% de identidade com o gene que codifica a proteína BCL-2, mas também mostraram alinhamento com vários outros genes constitutivos.

Utilizando DNA obtido de amostras controle negativo observou-se a amplificação de um complexo padrão de bandas sugerindo que estes iniciadores recomendados pelo protocolo BIOMED-2, para amplificação dos pontos de quebra em 3'MBR e mcr, necessitam ser reavaliados.

Embora a pesquisa da translocação t(14;18) não seja obrigatória para o diagnóstico dos LF e LDGC este método pode ser muito útil nos casos em que as características citomorfológicas e/ou imunofenotípicas não são as típicas. As dificuldades

em diagnosticar malignidades linfoproliferativas ocorre em 5-10% dos casos (VAN DONGEN et al., 2003). Para o diagnóstico diferencial entre as neoplasias linfóides atípicas de células B as técnicas de pesquisa molecular são de grande valia (GU, 2008).

No presente estudo foram observados os fenótipos menos frequentes em seis casos (Tabela 13).

Tabela 13: Comparação entre os resultados com fenótipo não típico e presença da t(14;18)/ ponto de quebra em MBR.

Caso	Sexo/ Idade	Material	Fenótipo não típico	Diag. Diferencial	t(14;18)/ MBR
1	M/69	MO	K+CD5+CD23+CD10+ BCL2+	LF/LM/LLC	+
2	F/83	BL	L+CD5(-)CD23(-)CD10(-)BCL2+	LF/LNH-B	+
3	F/36	PAAF	K+CD5(-)CD23(-)CD10(-)BCL2(-)	LFt.*/ LNH-B	+
4	M/61	BL	L+CD5-/CD23(-)CD10-/ BCL2++	LF/LM	+
5	F/66	BL	L+CD5+CD23(-)CD10(-)BCL2++	LF/LM	+
6	M/44	SP	K+CD5+CD23+CD10+ BCL2+	LDGC/LM blast.	+

* LFt.: Linfoma Folicular transformado.

Dos 39 casos de linfoma estudados, 6 casos (15%) apresentaram fenótipo atípico e foram classificados como prováveis LF ou LDGC através dados citomorfológicos e imunofenotípicos, entretanto com possibilidade de outros diagnósticos diferenciais conforme detalhado na tabela 13. O estudo destas amostras através da PCR revelou a presença do fragmento amplificado de 200pb relativo a t(14;18)/MBR, confirmando o diagnóstico preliminar nos seis casos.

Estes resultados demonstram a importância da PCR como método adicional no diagnóstico diferencial de linfomas.

4. Conclusões

A imunofenotipagem por citometria de fluxo, a partir da medida de dispersão frontal da luz (FSC) associada à característica de tamanho celular, através de um índice obtido pela relação entre o tamanho (FSC) da célula neoplásica e de pequenos linfócitos T, identificou as células neoplásicas do grupo de amostras diagnosticadas como LDGC.

A caracterização da restrição de cadeias leves da imunoglobulina demonstrou a presença de monoclonalidade em 96,4% dos casos estudados semelhante a frequência referida na literatura;

A avaliação conjunta da expressão dos antígenos CD5, CD10, CD20 e BCL2 fornece informações importantes para a classificação do tipo de linfoma, assim como da presença da alteração molecular t(14;18) associada aos LF e LDGC;

Em dois casos onde a infiltração medular por células com fenótipo alterado foi menor que 2% a PCR confirmou a infiltração neoplásica;

Seis casos (15%) no qual se interrogou a classificação do tipo de LNH pela citomorfologia e a imunofenotipagem como sendo prováveis LF, foram confirmados pela PCR através da identificação da translocação t(14;18), revelando a importância desta metodologia no diagnóstico específico.

A frequência da translocação t(14;18) observada nos casos de LF e LDGC avaliados no presente estudo foi semelhante a frequência referida na literatura;

A PCR mostrou-se uma ferramenta adequada para confirmação do diagnóstico de linfoma, a partir da detecção da translocação t(14;18) nas amostras estudadas;

O protocolo BIOMED-2 não permitiu a detecção dos pontos de quebra 3'MBR e mcr referentes a translocação t(14;18).

7. Referências

ABBAS A., LICHTMAN A. H.; **Cellular and Molecular Immunology**. 5ª edição, (7) 150, 2005.

ALONSO G.; **Imunofenotipaje de leucemias y linfomas. Caracterización fenotípica de las neoplasias linfoides**. In press. 2004.

ALMASRI N. M. , ITURRASPE J. A. , BRAYLAN R. C.; **CD10 expression in follicular lymphoma and large cell lymphoma is different from that of reactive lymph node follicles**. Arch Pathol Lab Med.;122(6):539-44, 1998.

BAIN B.J., CATOVSKI D.: **The leukaemic phase of non-Hodgkin's lymphoma**. J Clin Pathol; 48: 189-193, 1995.

BAIN B.J.: **Diagnóstico em Leucemias**. Ed. 2, Editora Revinter, p. 150-153, 2003.

BAO, F., MUNKER, R., LOWERY, C., MARTIN, S., SHI, R., VEILLON, D. M., COTELINGAM, J. D., LOWERY N.M.; **Comparison of FISH and Quantitative RT-PCR for the Diagnosis and Follow-Up of BCR-ABL-Positive Leukemia** Molecular Diagnosis & Therapy:11(4), 239-245, 2007.

BARRANS S. L., EVANS P. A. S., O'CONNOR S. J. M., OWEN R. G., MORGAN G. J., JACK A. S.; **The Detection of t(14;18) in Archival Lymph Nodes: Development of a Fluorescence in Situ Hybridization (FISH)-Based Method and Evaluation by Comparison with Polymerase Chain Reaction**. JMD (5) 3,168-175, 2003.

BARRY T. S., MD, JAFFE E. S., KINGMA D. W., MARTIN A. W., SORBARA L., RAFFELD M., PITTALUGA S.; **CD5+ Follicular Lymphoma: A Clinicopathologic Study of Three Cases**. Am J Clin Pathol;118:589-598, 2002.

BEATO M. S., AGUILERA A. S., PIRIS M. A.: **Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas**. Blood; 4 (101): 1220-1235, 2003.

BERLAND R, WORTIS HH.: **Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5**. Annu Rev Immunol.; 20:253-300, 2002.

BOROWITZ M.J., DEVIDAS M., HUNGER S. P., BOWMAN W. P., CARROLL A. J., CARROLL W. L., LINDA S., MARTIN P. L., PULLEN D. J., VISWANATHA D., WILLMAN C. L, WINICK N., CAMITTA B. M.; **Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study.** Blood 111, (12), 5477-5485, 2008.

BRAYLAN R.C. ALMASRI NM, ITURRASPE JA, BRAYLAN RC.: **CD10 expression in follicular lymphoma and large cell lymphoma is different from that of reactive lymph node follicles.** Arch Pathol Lab Med.; 122(6):539-44, 1998.

BROWN T. A.: **Clonagem gênica e análise de DNA.** Ed. 4, Editora Artmed, p78-81, 2003.

CHIU B .C.: **Epidemiología de los Linfomas No Hodgkin.** Hematology, 241-252, 2002.

COLOMO L., LÓPEZ-GUILLERMO A., PERALES M., RIVES S., MARTÍNEZ A., BOSCH F., COLOMER D., FALINI B., MONTSERRAT E., CAMPO E.: **Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma.** Blood.1;101(1):78-84, 2003.

COOK J. R., CRAIG F. E., SWERDLOW, S. H.; **bcl-2 Expression by Multicolor Flow Cytometric Analysis Assists in the Diagnosis of Follicular Lymphoma in Lymph Node and Bone Marrow.** Am J Clin Pathol;119:145-151, 2003.

CORNFIELD D.B., MITCHELL D.M., ALMASRI N. M., ANDERSON J.B., AHRENS K.P., BS, DOOLEY E.O., MT, BRAYLAN R. C.; **Follicular Lymphoma Can Be Distinguished From Benign Follicular Hyperplasia by Flow Cytometry Using Simultaneous Staining of Cytoplasmic bcl-2 and Cell Surface CD20.** Am J Clin Pathol;114:258-263, 2000.

CRAIG F.E., FOON K. A.: **Flow Cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms (Review);** Blood; 111 (8), 3941-3966, 2008.

DAVIS T. A., CZERWINSKI D.K., LEVY R.: **Therapy of B-cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in loss of CD20 antigen expression.** Clin Cancer Res; 5: 611-5, 1999.

DIONISI P.M., DI LORENZO N., PAPARELLA A., RICCARDI M., STRACCA-PANSA V.; **Molecular diagnosis of non-Hodgkin B lymphomas by capillary electrophoresis and Genescan analysis: a molecular pathology laboratory experience.** Pathologica.; 98(2):139-46, 2006.

EVANS P.A.S., BASTARD C., DELABESSE E., MACINTYRE E.A., WIJERS-KOSTER P., SCHUURIG E., MOREAU E., GONZÁLEZ D., MILLS K.I., JENNINGS B.A., MILNER B.J., BLOXHAM D., STAROSTIK P., DELFAU-LARUE M.H., OTT M., SALLES G., MORGAN G.J.; **t(14;18) with BCL2-IGH rearrangement.** Leukemia 17, 2298-2301, 2003

FATTORI A.; **Perfil de expressão gênica de leucemias agudas por técnica de microarranjo (microarrays).** 2006. Dissertação (Doutorado em Clínica Médica) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

FORAN J.M., ROHATINER AZ, CUNNINGHAM D, POPESCU RA.; **European phase II study of rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) for patients with newly diagnosed mantle cell lymphoma and previously treated mantle-cell lymphoma, immunocytoma and small B-cell lymphocytic lymphoma.** J Clin Oncol; 18: 317-24, 2000.

FONCILLAS, J. G., BANDRÉS E., CATALÁN V., GARCÍA A. F., ZABALEGUI N.: **Conceptos básicos en biología molecular del cáncer. Susceptibilidad genética. Anales del Sistema Sanitario del Navarra.** Disponível em: <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol24/suple1/suple4a.html>, 05 de agosto 2002.

GADOL N., PEACOCK M.A., AULT K.A.; **Antigenic phenotype and functional characterization of human tonsil B cells.** Blood.; 71: 1048-1055, 1988.

GONG J. Z., WILLIAMS D. C., JR, LIU K., MD, JONE C.: **Fine-Needle Aspiration in Non-Hodgkin Lymphoma: Evaluation of Cell Size by Cytomorphology and Flow Cytometry.** Am J Pathol; 117: 880-888, 2002.

GU K., GHAN W.C., HAWLEY R.C.; **Practical Detection of t(14;18)(IgH/BCL2) in Follicular Lymphoma.** Arch Pathol Lab Med; 132: 1355-1361, 2008.

HARRIS N., JAFFE E., DIEBOLD J., FLADRIN G., MULLER-HERMELINK H., VARDIMAN J., LISTER T., LOOMFIELD C.: **World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting** –Airlie House, Virginia, November 1997. *Journal of Clinical Oncology*; 17: 3835-3849, 1999.

HARRIS N.L., JAFFE E. S., STEIN H., BANKS P.M., CHAN J.K.C., CLEARLY M. L., DELSOL G.; **A revised european-american classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the international lymphoma study group.** *Blood*; 84:1361-1392, 1994.

HOFFBRAND A.V., PETTIT J.E., MOSS P.A: **Fundamentos em Hematologia.** Ed. Artmed, p. 207 – 223, 2004.

HJALGRIM H., ENGELS E.A., **Infectious aetiology of Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiological evidence.** *J. Intern. Med.*, 264 (6):537-48, 2008.

INCA: **Estimativas 2008: Incidências de câncer no Brasil.** Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 20 de dezembro de 2007.

JAFFE E. S., HARRIA N.L., STEIN H., VARDIMAN J. W. (Eds.): **World Health Organization Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.** IARC Press: Lyon, p.120 – 187, 2001.

JANEWAY C.A.; TRAVERS P.; WALPORT M.; SHLOMCHIK M.: **Immunobiology : the immune system in health and disease.** Garland Publishing, 2001.

JONG D.; **Molecular Pathogenesis of Follicular Lymphoma: A Cross Talk of Genetic and Immunologic Factors** *Journal of Clinical Oncology*, (23) 26: 6358-6363, 2005.

KALEEM Z., ZEHNBAUER B. A., WHITE G., ZUTTER M. M.: **Lack of Expression of Surface Immunoglobulin Light Chains in B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas.** *AJCP*, 113:399-405, 2000.

KALEEM Z.: **Flow Cytometric Analysis of Lymphomas Current Status and Usefulness (Review).** *Arch Pathol Lab Med*;130: 1850-1858, 2006.

KAPPELMAYER J., GRATAMA J. W., KARÁSZI E., MENÉNDEZ P., CIUDAD J., RIVAS R., ORFAO A.: **Flow cytometric detection of intracellular myeloperoxidase, CD3 and CD79a: Interaction between monoclonal antibody clones, fluorochromes and sample preparation protocols.** *Journal of Immunological Methods*; 242; 2, 28, 53-65, 2000.

KÜPPERS R.: **Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis.** *Nature Reviews Cancer* 5, 251 – 252, 2005.

LEE B., TOTHOVA Z., LEVINE R., ANDERSON K., BUZA-VIDAS N., CULLEN D., MCDOWELL E., ADELSPERGER J., FRÖHLING S., HUNTL B.; **FLT3 Mutations Confer Enhanced Proliferation and Survival Properties to Multipotent Progenitors in a Murine Model of Chronic Myelomonocytic Leukemia.** *Cancer Cell*, 12 (4), 367-380, 2007.

LEVINE R., WADLEIGH M., COOLS J., EBERT B., WERNIG G., HUNTLY B., BOGGON T., WLODARSKA I., CLARK J., MOORE S.; **Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis.** *Cancer Cell* 7 (4), 387-397, 2005.

MANAZZA A., BONELLO L., PAGANO M., CHIUSA L., NOVERO D., STACCHINI A., MARTINI G., VITOLO U., TARELLA C., INGHIRAMI G., PALESTRO G., CHIARLE R.: **Follicular Origin of a Subset of CD5+ Diffuse Large B-Cell Lymphomas.** *AJCP*, 118:589-59, 2002.

MATUTES E: **Contribution of immunophenotype in the diagnosis and classification of haemopoietic malignancies.** *J Clin Pathol*; 48: 194-7, 1995.

MENENDEZ P., VARGAS A., BUENO C., BARRENA S., ALMEIDA J., SANTIAGO M., LÓPEZ A., ROA S., SAN MIGUEL J. F., ORFAO A.; **Quantitative analysis of bcl-2 expression in normal and leukemic human B-cell differentiation.** *Leukemia* 18, 491-498, 2004.

MIN H. J., MOON H.W., KIM Y. R., YOON S., PARK S. Y., KIM B. K., SHIN H. Y., AHN H. S., KIM H. C., CHO H. I., LEE D. S.; **Incidences of Submicroscopic Deletions Are Variable According to Disease Entities and Chromosomal Translocations in Hematologic Malignancies: Investigation by FISH.** *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, 106: 4477, 2005.

MONTSERRAT E: **Chronic lymphoproliferative disorders.** Curr Opin Oncol; 9: 34-41, 1997.

MOURAD W.A., RAWAS F., SHOUKRI M., TBAKHI A., AL OMARI M., TULBAH A., AL DAYEL F.; **Grading of follicular lymphoma using flow cytometry.**Ann Saudi Med.; 26(3):205-10, 2006.

ORFAO O., ALAMEIDA J., SANCHEZ M. L., J. F. SAN MIGUEL.: **Immunophenotypic Diagnosis of Leukemic B-Cell Chronic Lymphoproliferative Disorders Other Than Chronic Lymphocytic Leukemia.** Contemporary Hematology, 2003.

QUEIROGA E. M., GUALCO G. WEISS L. M.: **Burkitt lymphoma in Brazil is characterized by geographically distinct clinicopathologic features.** Am. J. Clin. Pathol. 130(6):946-956, 2008.

RABASA M.P.: **Factores pronósticos en los linfomas: linfomas no Hodgkin y linfoma de Hodgkin.** Anales del Sistema Sanitario del Navarra. Disponível em: <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol24/suple1/suple13a.html>. Acesso em: 05 de agosto 2002.

RAWSTRON A.C., KENNEDY B., EVANS P.A.: **Quantification of minimal residual disease levels in chronic lymphocytic leukemia using a sensitive flow cytometric assay improves the prediction of outcome and can be used to optimize therapy.** Blood; 98: 29-35, 2001.

RIZZATTI, E. G.; **Análise do perfil de expressão gênica do linfoma de células do manto em fase leucêmica com microarrays de oligonucleotídeos.** 2004. Dissertação (Doutorado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ROSENWALD A., WRIGHT G., CHAN W.C.: **The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma.** New Engl. J. Med;346:1937-1947, 2002.

SANCHEZ M.L., ALMEIDA J., GONZALES M. B., GARCIA-MARCOS M. A., BALANZATEGUI A., LOPEZ-BERGES M. C., NOMDEDEU J., VALLESPI T., BARBON M, MARTIN A., FUENTE P., MARTIN-NUÑEZ G., FERNANDEZ-CALVO SÁNCHEZ M. L., ALMEIDA J., VIDRIALES B., LÓPEZ-BERGES M. C., GARCÍA-

MARCOS M.A., MORO M. J., CORRALES A. , CALMUNTIA M. J., SAN MIGUEL J. F., ORFAO A.; **Incidence of phenotypic aberrations in a series of 467 patients with B-chronic lymphoproliferative disorders: basis for the design of specific 4-color stainings to be used for minimal residual disease investigation.** Leukemia; 16: 1460-1469, 2002.

STAMOTOPOULOS K.; KOSMAS C.; BELESSI C.; STAVROYANNI N.; KYRIAZOPOULUS P.; PAPADAKI T.: **Molecular insights into the immunopathogenesis of follicular lymphoma.** Immunology Today; 21: 298-305, 2000.

STONE J. M.: **Thomas Hodgkin: medical immortal and uncompromising idealist.** BUMC Proceedings; 18:368-375; 2005.

STETLER S. M., BRAYLAN R.C.: **Flow cytometric analysis of lymphomas and lymphoproliferative disorders.** Seminars in Hematology; 38: 2111-23, 2001.

STEWART C. C., STEWART S., J.: **Clinical Immunophenotyping by Flow Cytometry.** Med TechNet Presentations, 1-13, 1995.

SWEERDLOW, S.H., CAMPO E., JAFFE E.S., PILERI S.A., STEIN H., THIELE J., VARDIMAN J.W. **WHO classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.** IARC: Lyon 2008.

VAN DONGEN J.J.M., LANGERAK A.W., BRÜGGEMAN M., EVANS P.A.S., HUMMEL M., LAVENDER F.L. DELABESSE E. DAVI F. SCHURING E., GARCÍA-SANZ R., VAN KRIEKEN J.H.J.M., DROESE J., GONZÁLEZ D., BASTARD C., WHITE H.E., SPAARGAREN M., GONZÁLEZ M., PARREIRA A., SMITH J.L., MORGAN G.J., KNEBA M., MACINTYRE E.A.; **Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED Concerted Action BMH4-CT98-3936.** Leukemia, 17, 2257-2317, 2003.

VASSALLO J., BOUSQUET M., QUELEN C., SAATI T., DELSOL G., BROUSSET P.; **CD5-positive diffuse large B cell lymphoma arising from a CD5-positive follicular lymphoma.** J Clin Pathol; 60: 573-575, 2007.

VINEIS, P.; MILIGE L.; CONSTANTINI A. D.: **Exposure to Solvents and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma: Clues on Putative Mechanisms.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 16(3):381– 4; 2007.

VOSE J.M., CHIU B., CHESON B.D., DANCEY J., WRIGHT J.; **Update on Epidemiology and Therapeutics for Non-Hodgkin's Lymphoma.** *Hematology*, 241-262, 2002.

VIZMANOS, J.L., AGIRRE X., CALASANZ M.J, GARCÍA M., NOVO F.J.: **Alteraciones genéticas en las neoplasias hematológicas de origen linfoide: implicaciones en la práctica clínica** *Anales del Sistema Sanitario del Navarra*. Disponível em: <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol23/n3/revis2a.html>. Acesso em 05 de agosto de 2002.

YAMAGUCHI M., SETO M., OKAMOTO M., ICHINOHASAMA R., NAKAMURA N., YOSHINO T., SUZUMIYA J., MURASE T., MIURA I., AKASAKA T., TAMARU J., SUZUKI R., KAGAMI Y., HIRANO M., MORISHIMA Y, UEDA R., SHIKU H., NAKAMURA S.: **De novo CD5⁺ diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 109 patients.** *Blood*; 99 (3):815-821, 2002.

WEISS L.M.; **Lymph Nodes.** Disponível em: InterScience. Disponível em: <http://mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780470015902/els/article/a0000525/current/pdf>. Acesso em: 20 de dezembro de 2008.

WOOD B.L., ARROZ M., BARNETT D., DIGIUSEPPE J., GREIG B., KUSSICK S.J., OLDAKER T., SHENKIN M.,8 STONE E., WALLACE P.; **2006 Bethesda International Consensus Recommendations on the Immunophenotypic Analysis of Hematolymphoid Neoplasia by Flow Cytometry: Optimal Reagents and Reporting for the Flow Cytometric Diagnosis of Hematopoietic Neoplasia.** *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 72B:S14–S22, 2007.

ZHAO I. R., XING S., LI Z., FU X., LI Q., KRANTZ S. B., ZHAO Z. J.; **Identification of an Acquired JAK2 Mutation in Polycythemia Vera.** *The Journal of Biological Chemistry* 280, 24 (17), 22788–22792, 2005.

ANEXO A Termo de consentimento e informação

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Departamento de Microbiologia e Parasitologia
Centro de Ciências Biológicas - Divisão de Imunologia
88049-900, Campus Universitário, Florianópolis, SC, Brasil

PROJETO DE PESQUISA: COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE NO DIAGNÓSTICO DOS LINFOMAS FOLICULAR E DIFUSO DE GRANDE CÉLULA B

RESPONSÁVEL: Prof. Dr. Mário Steindel

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Os Linfomas não Hodgkin são neoplasias malignas, que resultam da multiplicação descontrolada de células derivadas de linfócitos T ou B que se acumulam principalmente nos linfonodos e baço. A apresentação dos sintomas está associada ao local de acometimento da doença e extensão. Devido ao rápido crescimento destes tumores, o diagnóstico e tratamento devem ocorrer o mais rápido possível.

Este projeto pretende melhorar o diagnóstico dos Linfomas não Hodgkin proporcionando um tratamento mais rápido e eficaz. A sua participação neste estudo é muito importante e você não terá que pagar nada. Você está sendo convidado a fazer parte deste estudo juntamente com muitas outras pessoas.

PROCEDIMENTO

Se você concordar com a participação, deverá autorizar a utilização do sangue e/ou da medula óssea que será utilizado para testes para fins de pesquisa. Será utilizada apenas uma pequena quantidade do material coletado para o diagnóstico e nada mais.

Não haverá qualquer outro procedimento que possa ocasionar desconfortos para o participante a não ser o desconforto da picada da agulha que coletará o sangue e/ou medula óssea. O benefício deste estudo não será imediato, porém fornecerá informações a pesquisadores sobre qual é o tipo de linfoma que o paciente apresenta e baseado nisto poderão ser desenvolvidos novos tratamentos para a doença.

PARTICIPACÃO E CONFIDENCIALIDADE

A participação dos pacientes neste estudo é confidencial e nenhum nome será divulgado em qualquer tipo de publicação.

A participação neste estudo é voluntária. Caso o (a) senhor (a) não queira participar, isto não influenciará o tratamento que você tem recebido.

Pense bem, faça a pergunta que desejar e esclareça suas dúvidas.

Todos os itens deste termo de consentimento e informação serão cumpridos e respeitados pelos pesquisadores envolvidos.

Se você tiver alguma dúvida ou mesmo depois de assinar este documento não quiser mais participar desta pesquisa, pode entrar em contato com qualquer um destes pesquisadores abaixo, comunicar sua decisão e você será excluído da pesquisa:

- Prof. Mário Steindel - Universidade Federal de Santa Catarina – Fone: 331-5163

- Renata da Silva – Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Santa Catarina (HEMOSC) – Fone: (48) 251-9718 ou 84085515

CONSENTIMENTO

Eu recebi uma cópia e li (ou leram para mim) as informações acima descritas. Foram explicados todos os procedimentos deste estudo. Sei que posso perguntar o que desejar e compreendo exatamente que o sangue e ou medula óssea serão utilizados para realizar as pesquisas sobre esta doença. Sei também dos possíveis desconfortos e

benefícios com a participação neste estudo. Sou livre para autorizar ou não, a minha participação neste estudo.

DECLARAÇÃO

Declaro estar ciente das informações ora prestadas, tendo lido atentamente e concordado com o todo teor.

Florianópolis/SC, _____ de _____ de 20__.

Assinatura do Paciente ou Responsável

Nome completo do
paciente: _____
Nome

Responsável: _____

RG: _____

CPF: _____

Assinaturas:

Pesquisador responsável _____

Prof. Dr. Mário Steindel

Pesquisador principal _____

Renata da Silva