



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

CRISTIANO CLAUDINO OLIVEIRA

**Linfomas *Double-Hit* em casuística de Linfomas Não-Hodgkin B de alto grau:
estudo clínico, morfológico, imunoistoquímico e citogenético**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues

Botucatu

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

CRISTIANO CLAUDINO OLIVEIRA

**Linfomas *Double-Hit* em casuística de Linfomas Não-Hodgkin B de alto grau:
estudo clínico, morfológico, imunoistoquímico e citogenético**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues

Botucatu

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Oliveira, Cristiano Claudino.

Linfomas Double-Hit em casuística de Linfomas não-Hodgkin B de alto grau : estudo clínico, morfológico, imunoistoquímico e citogenético / Cristiano Claudino Oliveira. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Maria Aparecida Custódio Domingues
Capes: 40105008

1. Linfoma. 2. Hibridização in situ. 3. Citogenética humana. 4. Imuno-histoquímica. 5. Fluorescência.

Palavras-chave: Citogenética; Hibridização in situ fluorescente; Imuno-histoquímica; Linfoma; Linfoma não-Hodgkin.

Dedicatória

**A minha mãe, Nilda,
ao meu pai, Oto,
minha família, minhas raízes.**

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

A Deus Pai, Deus Filho e Deus Espírito Santo e a Nossa Senhora Aparecida pela inspiração diária e pelo refúgio nos momentos mais incertos.

Aos meus pais, Nilda e Oto, sobretudo minha mãe, pelo amor onipresente, pelo companheirismo, pelas palavras certas em todos os momentos, pela perseverança e coragem para lutar sempre.

Aos meus professores, em especial aqueles que me orientaram em iniciações científicas e na pós-graduação, por me mostrarem o quanto é fascinante ensinar e ser eternamente aprendiz.

A minha orientadora, Prof^a. Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues, por ter me apresentado à patologia ainda no meu primeiro ano de graduação, pelos exemplos de docência, pesquisadora e patologista.

A Prof^a. Dra. Patrícia Pintor dos Reis, pela participação nas primeiras discussões metodológicas dessa pesquisa.

A Prof^a. Dra. Silvia Regina Rogatto, pela disposição, orientação e discussões técnicas após as primeiras reações de FISH.

Aos docentes, médicos, residentes, funcionários e servidores do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB UNESP).

Aos alunos de graduação em medicina e futuros colegas de profissão Helena Guerra, Luan Kucko e Eric Hiram pela colaboração fundamental na revisão dos prontuários desse estudo.

A Dra. Bárbara e equipe do Registro Hospitalar de Câncer por colaborar no rastreamento de pacientes de nosso estudo.

A Dra. Isabela Werneck da Cunha e equipe do AC Camargo Cancer Center, pela colaboração na realização do TMA e FISH.

Aos nossos pacientes, muitos, neste estudo, já falecidos, justificativa maior de nossas pesquisas: investigar, avançar, descobrir, melhorar, promover saúde.

Epígrafe

“Com efeito, um dia de manhã, estando a passear na chácara, pendurou-se-me uma ideia no trapézio que eu tinha no cérebro. Uma vez pendurada, entrou a bracejar, a pernear, a fazer as mais arrojadas cabriolas de volatim, que é possível crer. Eu deixei-me estar a contemplá-la. Súbito, deu um grande salto, estendeu os braços e as pernas, até tomar a forma de um X: decifra-me ou devoro-te.”

*Machado de Assis,
Memórias Póstumas de Brás Cubas*

Resumo

RESUMO:

Introdução: Linfomas *Double-Hit* (LDH) são neoplasias de alto grau raras, caracterizadas pela translocação do gene *MYC* concomitante a translocação envolvendo os genes *BCL2* e/ou *BCL6*, cujo diagnóstico depende da realização de exame citogenético, técnica de baixa disponibilidade e elevado custo. Diante disso, tem-se valorizado a identificação de fatores morfológicos e/ou imunofenotípicos que tenham associação com a detecção de tais translocações diagnósticas. **Objetivos:** Identificar pacientes portadores de LDH em casuística de linfomas Não-Hodgkin de alto grau e avaliar as associações entre os resultados citogenéticos imunoistoquímicos (IHQ) relativos aos marcadores *MYC*, *BCL2* e *BCL6*. **Material e Métodos:** Procedeu-se revisão clínico-morfológica de 120 pacientes com diagnóstico de linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) e linfoma de Burkitt (LB), com confecção de plataforma de *tissue microarray* (TMA) para realização IHQ (CD20, CD79a, PAX5, CD10, *BCL6*, *BCL2*, MUM1, TDT e *c-MYC*) e hibridação por fluorescência *in situ* (FISH) para detecção de translocações dos genes *c-MYC*, *BCL6* e *BCL2*. **Resultados:** Detectaram-se três pacientes portadores de LDH: dois com translocações de *MYC* e *BCL2* e um com translocações de *MYC* e *BCL6*, todos evoluindo para óbito em menos de seis meses. Entre 90 amostras com citogenética avaliável, houve associação entre IHQ e FISH para *MYC* ($p=0,036$) e *BCL2* ($p=0,001$), com concordância regular indicada por valores de Kappa de 0,23 [0,0;0,49] e de 0,35 [0,13;0,56], respectivamente. No grupo de LDGCB ($n=72$), as translocações envolvendo individualmente os genes *MYC*, *BCL6* e *BCL2* representaram 4,1%, 12,5% e 15,2%, respectivamente, sendo a morfologia de céu estrelado fortemente associada à detecção de translocações do gene *MYC* ($p=0,01$). **Conclusão:** A detecção de apenas três pacientes portadores de LDH na casuística estudada, todos com evolução para óbito, corrobora a raridade e agressividade dessa neoplasia. O padrão morfológico “céu estrelado” e as expressões por IHQ de *MYC* e *BCL2* representam possíveis selecionadores de candidatos à realização da complementação diagnóstica por FISH, contudo estudos mais amplos ainda são necessários, visando à padronização de critérios interpretativos da IHQ desses marcadores e o entendimento de suas influências no prognóstico dos pacientes.

Abstract

ABSTRACT:

Background: Double-Hit Lymphomas (DHL) are rare high-grade neoplasms characterized by the translocation of gene *MYC* to other translocations involving genes *BCL2* and/or *BCL6*, whose diagnosis depends on the cytogenetic examination, a technique with low availability and high cost. Therefore, it has been valued the identification of morphologic and/or immunophenotypic factors that have association with the detection of those translocations. Objectives: To identify DHL patients in group of high grade non-Hodgkin lymphoma (NHL-B) and evaluate the associations between the cytogenetic and immunohistochemical (IHC) results for the *MYC*, *BCL2* and *BCL6* markers. Design: Clinical and morphological review of 120 patients diagnosed with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and Burkitt lymphoma (BL) was proceeded, with production of a tissue microarray platform (TMA) to perform IHC (CD20, CD79a, PAX5, CD10, *BCL6*, *BCL2*, MUM1, TDT and *c-MYC*) and fluorescence in situ hybridization (FISH) for detection of *c-MYC*, *BCL2* and *BCL6* gene translocations. Results: Three patients with DHL were detected: two with translocations of *MYC* and *BCL2* and one with translocations of *MYC* and *BCL6*, all leading to death in less than six months. Among 90 cytogenetically evaluable samples, associations were determined between IHC and FISH for *MYC* ($p=0.036$) and *BCL2* ($p=0.001$), though with regular compliance testing, indicated by Kappa value of 0.23 [0.0;0.49] and 0.35 [0.13;0.56], respectively. In the DLBCL group ($n=72$), *MYC*, *BCL6* and *BCL2* translocations were present in 4.1%, 12.5% and 15.2%, respectively. "Starry sky" morphology was strongly associated with *MYC* positivity ($p=0.01$). Conclusion: The detection of only three DHL patients in this series, all evolving to death, confirms the rarity and aggressiveness of this neoplasm. The morphological pattern "starry sky" and the expression by IHC of *MYC* and *BCL2* can represent possible selection factors for the FISH additional diagnostic testing, but larger studies are still needed in order to standardize interpretative criteria for IHC of this markers and the understanding of its influence on the prognosis of patients.

Lísta de ilustrações

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Aspectos morfológicos, imunoistoquímicos e citogenéticos do paciente 1.

FIGURA 2: Aspectos morfológicos, imunoistoquímicos e citogenéticos do paciente 2.

FIGURA 3: Aspectos morfológicos, imunoistoquímicos e citogenéticos do paciente 3.

Lísta de tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Perfil epidemiológico, clínico-evolutivo, morfológico, imunoistoquímico e citogenético da casuística após realização do FISH

Tabela 2 – Apresentação clínica, imunofenotípica e citogenética dos três pacientes portadores de linfoma *double-hit* (LDH)

Tabela 3 – Imunoistoquímica (IHQ) e citogenética (FISH) para MYC, BCL2 e BCL6, considerando o total de amostras válidas: sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN), acurácia (A) e coeficiente Kappa, com seus respectivos intervalos de 95% de confiança.

Tabela 4 – Imunoistoquímica (IHQ) e citogenética (FISH) para MYC, BCL2 e BCL6, considerando o grupo de LDGCB: sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), acurácia (A) e coeficiente Kappa, com seus respectivos intervalos de confiança.

Tabela 5 – Pacientes com LDGCB (n=72): comparação entre portadores e não portadores da translocação do gene *MYC*, identificado pela técnica de FISH.

Tabela 6 – Percentual de óbito e intervalo temporal entre diagnóstico e óbito, expresso em média e desvio padrão, quanto à expressão imunoistoquímica e citogenética dos marcadores MYC, BCL2 e BCL6, considerando os pacientes com diagnóstico de LDH e LDGCB.

Lísta de abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

LDH: Linfoma *double-hit*

LTH: Linfoma *triple-hit*

LDGCB: Linfoma Difuso de Grandes Células B

LB: Linfoma de Burkitt

LNH: Linfoma Não-Hodgkin

IHQ: estudo imunoistoquímico

FISH: hibridação por fluorescência *in situ*

TMA: *tissue microarray*

SNC: sistema nervoso central

MO: medula óssea

LBI/LDGCB/LB: Linfoma de Células B, Inclassificável, com características intermediárias entre o Linfoma Difuso de Grandes Células B e o Linfoma de Burkitt

Sumário

SUMÁRIO

➤ Capítulo I	
○ Revisão da literatura.....	23
○ Referências.....	35
○ Justificativa.....	42
○ Objetivos.....	44
➤ Capítulo II	
○ Artigo.....	46
○ Resumo.....	48
○ Abstract.....	49
○ Introdução.....	50
○ Material e Métodos.....	52
○ Resultados.....	55
○ Discussão.....	70
○ Referências.....	75
➤ Conclusão.....	79

Capítulo I

Revisão da literatura

REVISÃO DA LITERATURA

Linfoma é a neoplasia maligna caracterizada pela proliferação clonal de linfócitos B ou linfócitos T ou células *natural killer*, maduras ou imaturas, em diferentes fases de diferenciação⁽¹⁾. Classicamente, os linfomas são divididos em dois grandes grupos, Hodgkin e Não-Hodgkin, devido a diferenças morfológicas e clínicas⁽²⁾. Em 1832, Thomas Hodgkin, fisiologista e patologista inglês, descreveu as manifestações clínicas e as alterações macroscópicas da doença em sete autopsias, denominando-a de “*doença dos gânglios absorventes*”⁽³⁾. O principal LNH é o Linfoma Difuso de Grandes Células (LDGCB)⁽⁴⁻⁷⁾.

As estimativas do projeto Globocan, realizado pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) em 184 países no ano de 2012, revelaram que a incidência de LNH foi de 385.741 casos, tendo sido registrados, aproximadamente, 199.000 óbitos por essa doença⁽⁸⁾. No Brasil, conforme o mesmo estudo, os LNH somaram 9.215 casos novos e 5.012 óbitos⁽⁸⁾. Para o ano de 2014, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) divulgou estimativa de 9.790 casos novos de LNH no país⁽⁹⁾. Nos últimos 25 anos, constatou-se elevação das taxas mundiais de incidência do LNH, sendo que o aumento no número de imunodeprimidos, por exemplo indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), pode ter contribuído para esse cenário epidemiológico⁽¹⁰⁾.

Os sistemas de classificação, na prática médica, permitem a junção dos elementos morfológicos e clínicos, conduzindo à uniformização da linguagem, facilitando o entendimento das doenças e o estabelecimento, aplicabilidade e validação dos protocolos terapêuticos. Neste contexto, periodicamente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publica a *WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, sendo sua última edição no ano de 2008⁽¹¹⁾. Os critérios diagnósticos, sempre alicerçados em fundamentos clínicos, morfológicos e imunofenotípicos, estão, cada vez mais, englobando novas fronteiras do conhecimento, representados pelos estudos de genética molecular. Este amplo conjunto de ferramentas permitiu, nos últimos anos, a percepção da complexidade inerente ao grupo das neoplasias hematológicas exemplificada pela mimetização de padrões morfológicos ou pelas possibilidades de transformação levando a maior agressividade, ou ainda pela existência de subclones tumorais coexistentes aos clones principais^(5,12).

A classificação publicada em 2008 sedimentou os principais avanços dos últimos 20 anos e reforçou a necessidade de investigações em determinados subgrupos de linfomas. Os principais exemplos são aqueles pacientes com LDGCB e que exibem padrões morfológicos, imunofenotípicos e, por vezes citogenético, de Linfoma de Burkitt (LB), e aqueles pacientes com linfomas de mediastino exibindo achados intermediários entre LDGCB e LH. Tais situações foram designadas de “zona cinzenta”⁽³⁾. Nesse panorama, incluíram-se duas entidades provisórias: Linfoma de Células B, inclassificável, com características intermediárias entre o Linfoma Difuso de Grandes Células B e o Linfoma de Burkitt (LBI/LDGCB/LB) e Linfoma de Células B, inclassificável, com características intermediários entre o Linfoma Difuso de Grandes Células B e o Linfoma de Hodgkin Clássico (LBI/LDGCB/LHc)^(3,5,13).

Linfomas Não-Hodgkin (LNH): patogênese, clínica e tratamento

Os LNHs são um grupo heterogêneo de malignidades originadas no tecido linfoide, fundamentadas em alterações genéticas, ocorridas durante o processo de diferenciação linfocitária, as quais conduzem à proliferação descontrolada de um clone neoplásico⁽¹⁾. O processo de diferenciação de linfócitos B, iniciado na medula óssea e concretizado nas estruturas linfonodais, é bastante dinâmico e engloba estágios proliferativos, recombinantes e de diferenciação⁽¹⁴⁾. Esse contexto representa um cenário propício para a gênese de anomalias na expressão de determinados oncogenes relacionados aos fenômenos de proliferação, diferenciação e imortalização celular. A depender da etapa do ciclo maturativo do linfócito, as alterações conduzem a padrões neoplásicos distintos, determinando os subtipos dos linfomas⁽⁷⁾.

Essas neoplasias, quando sintomáticas, manifestam-se em três formas principais cujo conjunto é denominado de sintomas “B”: febre inexplicável acima de 38°C, sudorese noturna profusa, e perda inexplicável e superior a 10% do peso nos seis meses precedentes ao diagnóstico. Diferentemente das neoplasias sólidas, o estadiamento dos linfomas reúne numerosas informações clínicas as quais estão protocoladas num sistema chamado Ann Arbour/American Joint Committee. Segundo esse protocolo, as neoplasias hematopoéticas linfoides são assim estadiadas: estágio I quando há envolvimento de um linfonodo ou um grupo regional

ou de apenas um sítio extranodal; estágio II quando há envolvimento de dois ou mais linfonodos ou grupos regionais do mesmo lado do diafragma ou de um sítio extranodal e seu correspondente grupo de linfonodo de drenagem; estágio III quando o envolvimento de linfonodos é em ambos os lados do diafragma podendo estar associado ao envolvimento de um órgão extranodal adjacente a um linfonodo ou do baço ou de ambos; estágio IV quando há disseminação da doença, avançando a um ou mais órgãos extranodais (fígado, medula óssea) com ou sem associação com envolvimento nodal. À designação do estágio se acrescenta a letra “A” na ausência de sintomas e a letra “B” na presença dos sintomas já aqui especificados^(15,16).

Os LNHs de maior agressividade biológica são o Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB), Linfoma Plasmablastico, Linfoma de Burkitt (LB), e os Linfomas de Células B inclassificáveis, inseridos na classificação da OMS em 2008^(17,18).

O atual protocolo terapêutico para os pacientes portadores de LDGCB inclui rituximab adicionado a ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona (protocolo R-CHOP)^(17,19). A inclusão do rituximab, droga de ação anti-CD20, foi marcante para a melhora da sobrevida desses pacientes⁽²⁰⁾. Contudo, mesmo com avanços terapêuticos, mais de 50% dos pacientes portadores de LNH-B agressivos são incuráveis⁽¹⁷⁾.

Outro aspecto importante em relação à agressividade biológica dessas neoplasias é detecção de fatores mau prognósticos determinados pela idade igual ou superior a 60 anos, estadio Ann Arbour III ou IV, mais de um sítio extranodal acometido, *status* clínico do paciente comprometido e níveis de desidrogenase láctica (DHL) elevados (acima de 300U/L)⁽²¹⁾.

Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB)

O subtipo mais comum de LNH na população adulta em países emergentes e em desenvolvimento é o LDGCB, correspondendo a 30-40% dos casos^(6,7). Uma parcela dos casos de LDGCB são oriundos do fenômeno da transformação em que um linfoma de baixo grau, por exemplo um Linfoma Folicular, passa por novos eventos moleculares culminando em uma neoplasia de maior grau histológico^(22,23). Crescimento acelerado de adenomegalias ou massas extranodais, exacerbação de

sintomatologia B, elevação de DHL e hipercalcemia são sinais de alerta para transformação⁽²³⁾.

A OMS define o LDGCB como a neoplasia de linfócitos B grandes, em padrão difuso de crescimento, com tamanho nuclear igual ou excedendo o tamanho do núcleo de um histiócito, ou ainda com tamanho nuclear duas vezes o tamanho do núcleo de um linfócito⁽²⁴⁾. Esse padrão de crescimento difuso, aliado aos linfócitos neoplásicos grandes, denominados centroblastos e imunoblastos, é o critério morfológico desta entidade^(4,5). O perfil imunofenotípico do LDGCB é caracterizado pela expressão de CD20, associada à positividade variável dos marcadores CD10, BCL6 e BCL2, com índice de proliferação celular elevado (entre 50-80%)⁽²⁵⁾.

Na classificação da OMS-2008, o LDGCB foi subdividido em seis entidades clínico-patológicas-imunofenotípicas: LDGCB não especificado (SOE), LDGCB rico em células T, LDGCB Primário do Sistema Nervoso Central, LDGCB *Tipo Perna*, LDGCB *Epstein Barr* Virus positivo do idoso e LDGCB associado à infecção crônica⁽²⁴⁾.

Este linfoma é considerado agressivo clinicamente, porém, com o advento de novas terapêuticas e, em estadiamento clínico inicial, é potencialmente controlável^(18,25). Contudo, sabe-se que remissões duráveis são conseguidas por 40-50% dos doentes⁽²⁶⁾. Essa estatística fomentou a investigação de novos fatores prognósticos, além daqueles já descritos para a doença, desta vez no âmbito molecular.

Neste contexto, Alizadeh et al (2000) definiram, com base em estudos de perfis de expressão gênica, dois subgrupos de LDGCB: o subgrupo com perfil de células do centro germinativo (CGB) com origem nos linfócitos B da *zona clara* do centro germinativo linfonodal, e o subgrupo com perfil de células pós-centro germinativo ou células B ativadas (ABC), com origem em linfócitos B mais maduros, já com algum nível de comprometimento com a diferenciação plasmocitária⁽²⁷⁾.

Os LDGCBs classificados como CGB representam 45-50% dos pacientes, e têm bom prognóstico, com sobrevida livre de doença em cinco anos em torno de 50-60%. Além das análises de expressão gênica, verificaram-se, também, alterações cromossômicas. O perfil CGB exhibe ganhos de 12q12; já o perfil ABC exhibe ganhos de 3q e 18q21-22 e perdas de 6q21-22. Recentemente, em revisão sobre a linfomagenese, Basso & Dalla-Favera (2015)⁽¹⁴⁾ destacaram a participação das translocações envolvendo os genes *MYC* e *BCL2* na fisiopatogenia do LDGCB-CGB

e a importância da ativação da via do *nuclear factor- κ B* (NF- κ B) com interrupção da diferenciação terminal no LDGCB-CGB⁽¹⁴⁾.

Hans et al (2004), por sua vez, propuseram estratégia de avaliação imunoistoquímica para detecção desses subgrupos descritos pelo perfil de expressão gênica⁽²⁶⁾. Usando-se os marcadores CD10, BCL6 e MUM-1, os autores propuseram um algoritmo para definição desses perfis: o perfil CGB seria definido pela positividade para CD10, ou pela positividade para BCL6 combinada a negatividade para CD10 e MUM-1; o perfil ABC seria definido pela negatividade para CD10 e BCL6 ou pela negatividade para CD10 associada à positividade para BCL6 e MUM-1⁽²⁶⁾.

Além de Hans et al (2004)⁽²⁶⁾, outros grupos de autores como Choi et al (2009)⁽²⁹⁾, Visco et al (2012)⁽³⁰⁾ e Meyer et al (2010)⁽³¹⁾ também propuseram algoritmos para detecção desses perfis moleculares por estudo imunoistoquímico^(26,29-33). Embora esses estudos consigam a definição de perfis clínicos, etiopatogênicos e prognósticos distintos, a rotina prática diagnóstica ainda não incorporou de forma plena esses conceitos, dada a variabilidade dos resultados observados na proposição dos diferentes modelos de algoritmos^(26,29-33).

Além do estudo de expressão gênica, na última década, cresceram as pesquisas relacionadas à identificação das translocações envolvidas com os LDGCB⁽³⁴⁾. Mais de 30% dos pacientes portadores de LDGCB apresentam translocações envolvendo o gene *BCL6*, sendo esse o rearranjo mais comum nesse linfoma^(35,36,37). A translocação envolvendo o gene *BCL2*, que é fundamental na gênese do Linfoma Folicular, ocorre em 20-30% dos LDGCB^(28,38). E os rearranjos envolvendo o *MYC* são observados em aproximadamente 10% dos casos^(3,13,18,34,39).

Cabanillas (2011), em revisão sobre a biologia dos linfomas, destaca avanços na detecção dessas translocações⁽³⁴⁾. Aproximadamente 20% dos casos em que se verificou a translocação do gene *MYC*, houve simultaneidade de outra translocação envolvendo o *BCL2* e/ou *BCL6*. Tais casos apresentavam índices de proliferação celular elevado e foram o estágio inicial dos estudos que levaram a proposição da categoria denominada de LDH que integra o grupo provisório LBI/LDGCB/LB⁽³⁴⁾.

Linfoma de Burkitt (LB)

O Linfoma de Burkitt (LB) é a neoplasia hematológica mais comum da infância, sendo potencialmente curável. Há três variantes clínicas descritas. O LB endêmico ocorre no continente africano com pico de incidência entre quatro e sete anos de idade. O LB esporádico acomete crianças e adultos jovens, apresentando média de idade do acometimento em torno de 30 anos. O LB associado à imunodeficiência é a variante relacionada à infecção pelo HIV⁽⁴⁰⁾.

A associação com a infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV) é vista na maioria dos pacientes portadores da forma endêmica. Na forma esporádica e na forma associada à imunodeficiência, o EBV é identificado em até 30% e 40% dos casos, respectivamente^(3,40,41).

A apresentação clínica da doença ocorre frequentemente em sítios extranodais. Ossos da face da região orbitária e mandibular são as topografias mais relatadas na forma endêmica. Já na forma esporádica, o abdome é sítio comum, com destaque para intestino, sobretudo na região ileocecal. A forma relacionada à imunodeficiência se diferencia pela predileção nodal com maior tendência a envolvimento da medula óssea^(40,41,42). As três formas exibem alto risco para envolvimento do sistema nervoso central⁽⁴⁰⁾.

A morfologia do LB é caracterizada pela proliferação de linfócitos B neoplásicos de médio tamanho, com núcleos similares ou menores do que aqueles vistos nos histiócitos, em padrão monomórfico e difuso de crescimento, com frequentes figuras de mitose. Um aspecto característico, porém não patognomônico, é a presença de corpos apoptóticos determinando aspecto “céu-estrelado”^(40,41,42).

O perfil imunofenotípico do LB é positividade para CD20, CD79a, PAX5, CD10 e BCL6, com negatividade para BCL2 e TDT. O índice de proliferação celular dessas neoplasias, avaliado pela marcação imunoistoquímica do Ki-67, é acima de 90%, frequentemente chegando próximo dos 100%^(41,42).

O LB tem sua origem patogênica em linfócitos B da *zona escura* do centro germinativo que expressam de modo aberrante o gene *MYC*, cuja translocação é visualizada em 100% dos casos dessa doença, funcionando como um marcador diagnóstico. Além disso, em 70% dos pacientes, tem-se a ativação da via de sinalização *PI3K*. O conjunto desses fatores, aliados a outras alterações, como a inativação de genes supressores tumorais, contribuem para a patogênese dessa neoplasia⁽¹⁴⁾.

A translocação envolvendo o gene *MYC* (8q24) ocorre com um de três possíveis *loci* de imunoglobulina (Ig), podendo ser de cadeia pesada (*IgH*, 14q32) ou, menos comum, de cadeia leve *lambda* (*IgL*, 22q11) ou *kappa* (*IgK*, 2p12). Eventos secundários também são descritos em aproximadamente 30% dos casos, sendo os de maior destaque os ganhos (1q, 7, 12, 13q) e deleções (6q, 13q, 17p, esta última relacionada com o gene *TP53*). Ganhos envolvendo os cromossomos 1 e 7 são descritos em 20% e 10% dos casos respectivamente, apresentando associação com piores prognósticos⁽⁴²⁾. Jaffe et al (2011)⁽¹⁸⁾, em artigo de revisão sobre linfomas de alto grau, expõe que o evento da translocação do gene *MYC*, no LB, é um evento primário, sendo infrequentes outras anormalidades, caracterizando perfil de cariótipo simples. Isso difere da complexidade cariotípica observada em outros linfomas agressivos que têm essa translocação associada a outros eventos⁽¹⁸⁾.

A participação do gene *MYC* e do vírus EBV na patogênese do LB está bem estabelecida, contudo novos fatores têm sido descritos para a compreensão da biologia desse linfoma⁽⁴³⁾. Recentemente, Love et al (2012)⁽⁴⁴⁾ descreveram 70 genes recorrentemente mutados no LB, com destaque para o *ID3*, regulador da proliferação celular, o qual não foi detectado em outros linfomas, como o LDGCB⁽⁴⁴⁾. O gene *ID3* é um dos alvos do gene *MYC*. No contexto do LB, ocorre inibição da atividade reguladora do gene *ID3*^(43,44,45), com ativação permanente do gene *TCF3*, indutor da via *PI3K*, proporcionando proliferação e manutenção das células neoplásicas⁽⁴³⁾. Observa-se que a mutação do gene *ID3* é restrita ao LB, de modo que, embora LB e LDGCB se originem em células do centro germinativo, suas vias patogênicas são distintas, proporcionando doenças diferentes no âmbito clínico, morfológico, imunofenotípico e molecular^(43,44,45).

As formas endêmicas e esporádicas do LB são bastante agressivas, entretanto potencialmente curáveis. O uso de regimes quimioterápicos combinados permitem taxas de cura em torno de 90% quando o diagnóstico é realizado nos estádios iniciais, e em torno de 60-80% quando o diagnóstico é realizado nos estádios avançados⁽⁴⁰⁾.

Linfoma de Células B inclassificável, com características intermediárias entre o Linfoma Difuso de Grandes Células B e o Linfoma de Burkitt (LBI/LDGCB/LB)

A distinção do LB de outros linfomas de alto grau com padrão morfológico similar representa um desafio para patologistas⁽¹⁸⁾. Durante anos, esses casos foram denominados de Linfomas “Não-Burkitt” ou “LB atípico” ou Linfoma “Burkitt-like”, sobretudo quando acometia indivíduos mais velhos^(3,13,18). Dave et al (2006)⁽⁴⁶⁾ estudaram o perfil de expressão gênica de portadores de LB e LDGCB, identificando oitos casos em que a morfologia e imunoistoquímica eram controversos para o diagnóstico de LDGCB, e que o perfil gênico era compatível com LB, com aumento da expressão de *MYC* e diminuição dos produtos da via do *NF-κβ*, confirmando a existência de situações limítrofes^(46,47). Avaliações citogenéticas de casos similares conduziram as investigações à detecção de cariótipos complexos, inclusive com múltiplos eventos de translocações envolvendo, separadamente, o gene *MYC* e o gene *BCL2*. Além disso, esse padrão molecular se mostrou associado a pior prognóstico e refratariedade aos esquemas terapêuticos tradicionais^(18,24,40,48).

Embasado por esses estudos, instituiu-se a categoria provisória denominada LBI/LDGCB/LB para representar esse grupo de linfomas agressivos, com sobreposição de aspectos morfológicos, imunofenotípicos e genéticos tanto de LDGCB como de LB. Portanto, razões biológicas e clínicas justificam a recomendação de não incluir esses tumores numa dessas duas entidades^(42,49).

A morfologia dessas neoplasias hematopoéticas linfoides é caracterizada por proliferação difusa de células de médio a grande porte, em meio a escassos linfócitos maduros e escassa reação estromal. Em grande parte dos casos, haverá um aspecto similar ao observado no LB, incluindo o padrão em “céu estrelado”. Por sua vez, há cenários em que se nota maior atipia e variação do tamanho nuclear, tornando a lesão menos monótona⁽⁴⁸⁾. Imunofenotipicamente, a neoplasia exibirá positividade para os marcadores pan-B, tais como CD19, CD20, CD22 e CD79a, associada a expressão de CD10 e BCL6, e elevado índice de proliferação celular, contudo apresentando variação entre 50% e 100%. A positividade para BCL2, neste contexto, é bastante sugestiva desse diagnóstico^(4,5,48).

O LBI/LDGCB/LB acomete indivíduos na faixa etária adulta, entre 51 e 65 anos, sem distinção de gênero, sendo raro em crianças e jovens⁽⁴⁹⁾. O comportamento clínico é agressivo, cursando com manifestações extra-nodais, como infiltração de medula óssea e sistema nervoso central^(13,42). Esse grupo de linfomas não responde às drogas quimioterápicas usuais, não tendo sido estabelecido um protocolo terapêutico específico para esses casos^(3,13,50).

Do ponto de vista molecular, conforme publicação da OMS, em 2008, aproximadamente 15% dos pacientes apresentam fenômeno de translocação envolvendo o gene *MYC* simultaneamente a outro evento de translocação envolvendo o gene *BCL2* e/ou gene *BCL6*⁽⁴⁸⁾. A possibilidade desses eventos aumenta conforme a idade, alcançando taxas superiores a 30% em indivíduos idosos^(13,48). Esses linfomas são denominados Linfomas *Double-Hit* (LDH) ou *Triple-Hit*^(13,51). O restante dos casos de LBI/LDGCB/LB representa um grupo heterogêneo com detecção de translocação envolvendo o gene *MYC* em proporção superior ao observado nos LDGCB. Tais translocações ocorrem entre o gene *MYC* e outros genes não relacionados à imunoglobulinas^(13,48).

Linfomas Double-Hit (LDH)

Os Linfomas *Double-Hit* (LDH) são neoplasias de alto grau e agressivas as quais exibem a translocação do gene *MYC* combinada a uma translocação adicional envolvendo outros genes como *BCL2*, *BCL3*, *BCL6* ou *CCND1*. Atualmente, as mais estudadas são aquelas envolvendo *MYC* em combinação a eventos relacionados aos genes *BCL2* ou *BCL6* (Linfomas *Double-Hit*)⁽⁴²⁾. Há raros casos de envolvimento de três genes (*MYC*, *BCL* e *BCL6*) em neoplasias denominadas Linfomas *Triple-Hit*^(51,52,53). Esses pacientes, em geral, apresentam cariótipos complexos, com múltiplas anormalidades, contextualizando esse cenário de instabilidade gênica⁽⁴⁸⁾.

Os aspectos clínicos e prognósticos do LDH sobrepõem-se aos descritos para o LBI/LDGCB/LB. A agressividade biológica dessas lesões é exemplificada pela maior propensão a infiltração de medula óssea e sistema nervoso central, além de prognóstico bastante reservado caracterizado por sobrevida global inferior a dois anos⁽⁵¹⁾. Os portadores de LDH se enquadram em outros critérios de mau prognóstico como elevado índice de proliferação celular, elevados valores de DHL, acometimento de indivíduos acima da sétima década de vida e apresentação clínica já em estágio avançado, além de má resposta terapêutica aos esquemas atuais^(21,51,52,54).

O gene *MYC* (8q24) é um fator de transcrição regulador do ciclo celular, estando relacionado a mecanismos de duplicação/reparo do DNA, estresse metabólico e tradução⁽¹³⁾. Ainda que seu protagonismo com relação à proliferação esteja determinado⁽⁵⁵⁾, a sua importância na fisiologia da formação do centro

germinativo ainda está sendo compreendida^(14,55). Acredita-se que no início da reatividade do centro germinativo, o *MYC* esteja induzindo a amplificação e a transcrição de outros genes que contribuirão para os processos proliferativos dessa reação. Após os primeiros dias, esse gene é inativado pela ação do *BCL6*, principal regulador do centro germinativo^(14,55). No LDGCB, sua detecção ocorre em aproximadamente 10% dos casos^(25,56). No LB, sua ação estimuladora de proliferação e inibidora de apoptose é observada em todos os pacientes⁽⁵⁷⁾.

O gene *BCL6* (3q) codifica a proteína BCL6 que participa da diferenciação dos linfócitos B do centro germinativo normal⁽⁵⁶⁾. Esse gene controla um programa transcricional que facilita o ingresso das células precursoras B no centro germinativo do folículo. Sua expressão exerce efeitos moduladores e inibitórios sobre as reações do centro germinativo, contribuindo para sua formação e manutenção. A desregulação desse gene está associada à linfomagenese, sendo detectado em 30% dos LDGCB^(14,47,55,57).

O gene *BCL2* (18q) é codificador da proteína BCL2, que promove bloqueio da apoptose celular⁽⁷⁾. Sua translocação, frequentemente encontrada em pacientes com Linfoma Folicular, está presente em 45% dos casos de LDGCB e é marcador de mau prognóstico^(22,57,58). Recentemente, terapias alvo têm sido estudadas para esse marcador, buscando-se o desenvolvimento de drogas antagonistas às funções do *BCL2*⁽⁵⁹⁾.

O LDH é o principal elemento do grupo LBI/LDGCB/LB^(48,60,61). A ação sinérgica dos genes envolvidos, sobretudo *MYC*, com efeito proliferativo, e *BCL2*, com efeito anti-apoptótico, associados a outras alterações moleculares podem explicar a agressividade biológica dessa entidade⁽¹³⁾. Aukema et al (2011)⁽¹³⁾, em sua revisão sobre LDH, propõe que os linfomas B agressivos devam ser pesquisados por técnica citogenética visando a identificação das translocações que envolvam pelo menos o gene *MYC*⁽¹³⁾. *BCL2* e *BCL6* deveriam compor a investigação quando houvesse expressão imunoistoquímica de CD10 e/ou BCL6 associada à positividade para BCL2 e elevado índice de proliferação celular⁽¹³⁾. Também nesse sentido de selecionar casos para investigação citogenética, Perry et al (2014)⁽¹⁹⁾, Landsburg et al (2014)⁽⁶²⁾, Green et al (2012)⁽⁶³⁾ estudaram a correspondência do uso da imunoistoquímica para *MYC*, *BCL2* e *BCL6* com os resultados citogenéticos, contudo observou-se dificuldade entre os autores para padronização dos valores percentuais para definição de positividade^(19,60,61).

Os parâmetros atuais, sejam morfológicos e/ou imunofenotípicos, são de baixa reprodutibilidade e podem não traduzir efetivamente a detecção das alterações moleculares de *MYC*, *BCL2* e *BCL6*. Essas translocações podem, também, representar apenas parcialmente a complexidade molecular dessas neoplasias⁽¹³⁾. Os três genes alvo, sobretudo *MYC* e *BCL2*, compartilham vias de atuação relacionadas a apoptose e proliferação celular, as quais estão sendo cada vez mais estudadas, inclusive, recentemente, com ênfase na participação de microRNAs⁽⁵²⁾.

Neste contexto, Friedberg (2012)⁽⁶⁴⁾, ao finalizar um relato de caso cujo diagnóstico era LDH, questiona sobre a necessidade da realização da investigação citogenética das translocações envolvendo *MYC*, *BCL2* e *BCL6* para todos os casos de LDGCB⁽⁶⁴⁾. A investigação dessa pergunta tem sido frequente. Inclusive com a possibilidade da detecção desses pacientes por imunoistoquímica⁽⁶⁴⁾. Zhang e Aguillera (2014)⁽⁶⁵⁾, em revisão sobre a aplicação de imunoistoquímica em linfomas, expõem as dificuldades na interpretação da positividade para *MYC*, *BCL2* e *BCL6*, com percentuais para corte variando entre 40% e 50% da celularidade expressando tais anticorpos⁽⁶⁵⁾. Conforme Friedberg (2012)⁽⁶⁴⁾, a tendência é que a pesquisa dessas translocações, se possível por técnicas citogenéticas, se torne rotina à medida que essas informações comprovadamente se tornem relevantes para o tratamento e prognóstico⁽⁶⁴⁾, o que pode ser detalhado por meio de relatos e revisões investigativas de casuísticas nos diferentes centros diagnósticos.

REFERÊNCIAS

- 1)Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Campo E, Pileri SA, Swerdlow SH. Introduction and overview of the classification of lymphoide neoplasms. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, SteinH et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and lymphoid tussues (Volume 2). 4thed. Lyon: IARC;2008.p.158-66.
- 2)Roman E, Smith AG. Epidemiology of lymphomas. Histopathology 2011;58(1):4-14.
- 3)Jaffe E, Harris NL, Stein H, Isaacson PG. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. Blood. 2008;112(12):4384-6.
- 4)Ponz BO, Ott G, Hasserjian RP, Elenitoba-Johnson SK, Leval L, Jong D. Commentary on the WHO classification of tumors of lymphoid tissues (2008): aggressive B-cell lymphomas. J Hematop. 2009;25;2(2):77-81.
- 5)Hasserjian RP, Ponz BO, Ott G, Elenitoba-Johnson SK, Leval L. Commentary on the WHO classification of tumors of lymphoid tissues (2008): “Gray zone” lymphomas overlapping with Burkitt lymphoma or classical Hodgkin lymphoma. J Hematop. 2009;2(2):89-95.
- 6)Jaffe ES. The WHO 2008 classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2009:523-31.
- 7)Nogai H, Dorken B, Lenz G. Pathogenesis of Non-Hodgkin’s Lymphoma. J Clin Oncol. 2011;29(14):1803-11.
- 8)Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2012 v1.0 - Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year.
- 9)Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro (RJ); 2014.

- 10)Baris D, Zahm SH. Epidemiology of lymphomas. Curr Opin Oncol. 2000;12(5):383-94.
- 11)Harris NL, Campo E, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Swerdlow SH et al. Introduction to the WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid tissues (Volume 2). 4thed. Lyon: IARC;2008. p.14-5.
- 12)Quintanilla-Martinez L, Fend F. Mediastinal Gray Zone Lymphoma. Haematologica. 2011;96(4):496-9.
- 13)Aukema SM, Siebert R, Schuuring E, Imhoff GW, Kluin-Nelemans HC, Boerma EJ et al. Double-hit B-cell lymphomas. Blood. 2011; 17(8):2319-3.
- 14)Basso K, Dalla-Favera R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. Nature Rev Immunol. 2015;15:172-84.
- 15)Alves AC, Dias Filho MA, Pires ARC. Linfoma Não Hodgkin. In: Bacchi CE, Melo CRA, Franco MF, Artigiani Neto R. Manual de padronização de laudos histopatológicos – Sociedade Brasileira de Patologia. 4^a edição. Barueri: Editora Manole; 2014.p.196-24.
- 16)Hussong JW, Arber DA, Bradley KT, Brown MS, Chang CC, de Baca ME et al. Member of the Cancer Committee, College of American Pathologists. Protocol for the examination of specimens from patients with Non-Hodgkin Lymphoma/Lymphoid Neoplasms. Arch Pathol Lab Med. 2010;134(6):40-7.
- 17)Mahadevan D, Fisher RI. Novel Therapeutics for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. J. Clin. Oncol. 2011;29(14):1876-84.
- 18)Jaffe ES, Pittaluga S. Aggressive B-Cell Lymphomas: A Review of New and Old Entities in the WHO Classification. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2011;506-14.

- 19)Perry AM, Alvarado-Bernal Y, Laurini JA, Smith LM, Slack GW, Tan KL et al. MYC and BCL2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *Br J Hematol*. 2014;165:382-91.
- 20)Coiffer B. Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene*. 2007;26:3603-13.
- 21)Vaidya R, Witzig TE. Prognostic factors for diffuse large B-cell lymphoma in the R(X)CHOP era. *Ann Oncol*. 2014;25(11):2124-33.
- 22)Montoto S, Fitzgibbon J. Transformation of Indolent B-Cell Lymphomas. *J Clin Oncol* 29:1827-1834.
- 23)Kapur S, Levin MB. Transformation of Follicular Lymphoma to Double Hit B-Cell Lymphoma Causing hypercalcemia in a 69-Year-Old Female: A Case Report and Review of the Literature. *Case Rep Hematol*.2014:619760.
- 24)Stein H, Warnke RA, Chan WC, Jaffe ES. Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, SteinH et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and lymphoid tussues (Volume 2). 4thed. Lyon: IARC;2008. p.233-7.
- 25)Slack GW, Gascoyne RD. MYC and aggressive B cell Lymphomas. *Adv Anat Pathol*. 2011;18(3):219-28.
- 26)Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004;103:275-282.
- 27)Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma indentified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403:503-11.
- 28)Hummel M, Bentink S, Berger H, Klapper W, Wessendorf S, Barth TF et al. A biological definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med*. 2006;354:2418-30.

- 29)Choi LW, Weisenburger DD, Greiner TC, Piris MA, Banham AH, Delabie H et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. Clin Cancer Res.2009;15(7):5494-5502.
- 30)Visco C, Li Y, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Green TM, Tzankov A et al. Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. Leukemia. 2012;26:2103-13.
- 31)Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, Delabie J, Gayscone RD et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. J Clin Oncol. 2010;29:200-7.
- 32)Scott DW, Wright GW, Williams PM, Lih CJ, Walsh W, Jaffe ES et al. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. Blood. 2014;123:1214-17.
- 33)Scott DW. Cell-of-Origin in Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Are the assays ready for the clinic? Asco Educational Book. 2015: e466.
- 34)Cabanillas F. Non-Hodgkin's lymphoma: the old and the new. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2011;11(S1):S87-90.
- 35)Bastard C, Deweindt C, Kerckaert JP, Lenormand B, Rossi A, Pezzella F et al. LAZ3 rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, karyotype and clinical outcome in 217 patitents. Blood. 1994;83:2423-27.
- 36)Offit K, Lo CF, Louie DC, Parsa NZ, Leung D, Portlock C et al. Rearrangement of the bcl-6 gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma. N Engl J Med. 1994;331:74-80.
- 37)Ohno H, Fukuhara S. Significance of rearrangement of the BCL6 gene in B-cell lymphoid neoplasms. Leuk Lymphoma. 1997;27:53-63.

- 38)Weiss LM, Warnke RA, Sklar J, Cleary ML. Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. N Engl J Med. 1987;317:1185-89.
- 39)Yunis JJ, Mayer MG, Arnesen MA, Aeppli DP, Oken MM, Frizzera G. BCL2 and other genomic alterations in the prognosis of large-cell lymphoma. N Engl J Med. 1989;320:1047-54.
- 40)Leoncini L, Raphaël M, Stein H, Harris NL, Jaffe ES, Kluin PM. Burkitt Lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and lymphoid tissues (Volume 2). 4thed. Lyon: IARC;2008. p.262-4.
- 41)Klumb CE. Biologia e Patogênese dos linfomas B na Infância: uma revisão. Rev Bras Cancerol. 2001;47(3): 291-301.
- 42)Salaverria I, Siebert R. The Gray Zone Between Burkitt's Lymphoma and Diffuse Large B-Cell Lymphoma From a Genetics Perspective. J Clin Oncol. 2011;11;29(14):1835-43.
- 43)Campos E. New pathogenic mechanisms in Burkitt lymphoma. Nat Genet. 2012;44:1288-9.
- 44)Love C, Sun Z, Jima D, Li D, Zhang J, Miles R et al. The genetic landscape of mutations in Burkitt lymphoma. Nat Genet.2012;44(12):1321-25.
- 45)Richter J, Schlesner M, Hoffman S, Kreuz M, Leich E, Burkhardt B et al. Recurrent mutation of the ID3 gene in Burkitt lymphoma identified by integrated genome, exome and transcriptome sequencing. Nat Genet.2012;44(12):1316-22.
- 46)Dave SS, Fu K, Wright GW, Lam LT, Kluin P, Boerma EJ et al. Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. N Engl J Med.2006;354:2431-42.
- 47)Zhang B, Calado DP, Pasqualucci L, Rajewsky K. An oncogenic role for alternative NF- κ B signaling in DLBCL revealed upon deregulated BCL6 expression. Cell reports. 2015;11:715-26.
- 48)Kluin PM, Harris NL, Stein H, Leoncini L, Raphaël M, Campo E et al. B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell

lymphoma and Burkitt lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and lymphoid tissues (Volume 2). 4thed. Lyon: IARC;2008. p.265-6.

49)Zhao XF. Pitfalls in diagnostic hematopathology: part II. Int J Clin Exp Pathol. 2009;10;3(1):39-46.

50)Tanaka H; Hashimoto S; Abe D, Sakai S, Takagi T. Double-hit Lymphoma at second relapse of Burkitt-like Lymphoma: a case report. J Clin Exp Hematop. 2011;51(1):43-47.

51)Li S, Lin P, Fayad LE, Lennon PA, Miranda RA, Yin CA et al. B-cell lymphomas with MYC/8q24 rearrangements and IGH@BCL2/t(14;18) (q32;q21): an aggressive disease with heterogeneous histology, germinal center B-cell immunophenotype and poor outcome. Mod Pathol. 2012;25(1):145-156.

52)Li S, Lin P, Young KH, Kanagal-Shamanna R, Yin CC, Medeiros LJ. *MYC/BCL2* Double-Hit high-grade B-cell lymphoma. Adv Anat Pathol.2013;20:315-26.

53)Li S, Seegmiller AC, Lin P, Wang XJ, Miranda RN, Bhagavathi S et al. B-cell lymphomas with concurrent MYC and BCL2 abnormalities other than translocations behave similarly to MYC/BCL2 double-hit lymphomas. Mod Pathol.2015;28(2):208-17.

54)Lindsley RC, LaCasce AS. Biology of Double-hit B Cell lymphoma. Curr Opin Hematol.2012;19(4):299-304.

55)De Silva NS, Klein U. Dynamics of B cells in germinal centres. Nat Rev Immunol. 2015;15:137-48.

56)Kluin P, Schuur E. Molecular cytogenesis of lymphoma: where do we stand in 2010? Histopathology 2011 Jan;58(1):128-144.

57)Song Y, Tan Y, Yuan Y, Guo W, Pan Z, Bai O. Current perspectives in genetics of “double-hit” lymphoma with possible clinical implications. Cell Biochem Biophys. 2014;69:203-08.

- 58)Burkhard R, Bhagat G, Cogliatti SB, Rossi D, Gaidano G, Pasqualucci L et al. BCL2 mutation spectrum in B-cell non-Hodgkin lymphomas and patterns associated with evolution of follicular lymphoma. *Hematol Oncol.*2015;33:23-30.
- 59)Anderson MA, Huang D, Roberts A. Targeting BCL2 for the treatment of lymphoid malignancies. *Semin Hematol.*2014;51:219-27.
- 60)Snuderl M, Kolman OK, Chen YB, Hsu JJ, Ackerman AM, Dal Cin P et al. B-cell Lymphomas with Concurrent IGH-BCL2 and MYC Rearrangements Are Aggressive Neoplasms with Clinical and Pathologic Features Distinct from Burkitt Lymphoma and Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2010;34(3):327–340.
- 61)Kramer MH, Hermans J, Wijburg E, Philipppo K, Geelen E, van Krieken JH, et al. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 1998;92(9):3151-62.
- 62)Landsburg DJ, Nasta SD, Svoboda J, Morrisette JJD, Schuster SJ. Double-hit cytogenetic status may not be predicted by baseline clinicopathological characteristics and is highly associated with overall survival in B cell lymphoma patients. *Br J Hematol.* 2014;166:169-74.
- 63)Green TM, Young KH, Visco C, Xu-Monette ZY, Orazi A, Go RS et al. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone. *J Clin Oncol.* 2012;30:3460-67.
- 64)Smith SM, Anastasi J, Cohen KS, Godley LA. The impact of MYC expression in lymphoma biology: beyond Burkitt lymphoma. *Blood Cells Mol Dis.* 2010;15;45(4):317–323.
- 65)Osborne C, Byers R. Impact of gene expression profiling in lymphoma diagnosis and prognosis. *Histopathology.* 2011;58(1):106-127.
- 66)Friedberg WJ. Double Hit diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2012;30(28):3439-43.
- 67)Zhang XM, Aguilera N. New immunohistochemical for B-cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. *Arch Pathol Lab Med.*2014;138(12):1666-72.

Justificativa

JUSTIFICATIVA

Os linfomas são neoplasias malignas cada vez mais frequentes na população de países emergentes e em desenvolvimento, atingindo diferentes faixas etárias, com características clínicas e graus de agressividade diversos. Atualmente, o tratamento clínico depende da definição da entidade e seus diferentes subtipos.

O linfoma mais comum na população adulta é o LDGCB. Em 2008, como consequência de estudos moleculares, definiu-se um novo subtipo de linfoma não-Hodgkin clinicamente agressivo, com características intermediárias entre o LDGCB e o LB, denominado de LBI/LDGCB/LB, os quais são, em parte, representados pelo LDH. Esta rara entidade é definida pela presença da translocação do gene *MYC* combinada a outro evento de translocação envolvendo os genes *BCL2* e/ou *BCL6*. Estes eventos moleculares somente podem ser constatados através do estudo molecular, por exemplo, pela técnica de FISH.

Sabe-se que os LDHs são biologicamente agressivos, carecendo de protocolos terapêuticos bem definidos. Trata-se de neoplasias raras cuja concreta identificação depende do emprego de técnicas moleculares, as quais apresentam custo elevado e baixa disponibilidade em países menos desenvolvidos. No Brasil, não há relatos ou investigações sobre o LBI/LDGCB/LB, apesar da grande incidência do LDGCB e relativa frequência do LB.

O presente estudo investigou a presença desta nova entidade numa casuística de pacientes selecionados em dois grandes centros brasileiros de referência oncológica, caracterizando-os do ponto de vista clínico, morfológico, imunoistoquímico e citogenético. Os autores também investigaram as possíveis associações entre os parâmetros clínicos, morfológicos e imunofenotípicos com a detecção citogenética de translocações envolvendo os genes *MYC*, *BCL2* e *BCL6*, visando definir critérios para triagem de indivíduos que necessitem da complementação diagnóstica com ferramentas moleculares. Na concepção dos autores, após ampla revisão da literatura, este é o primeiro estudo realizado no país, ampliando sua relevância no cenário científico.

Objetivos

OBJETIVOS

A) Gerais:

Identificar pacientes portadores de LDH com base na detecção de translocação envolvendo o gene *MYC* concomitante a translocação envolvendo o gene *BCL2* e/ou *BCL6*.

B) Específicos:

-Caracterizar os pacientes portadores de LDH, LDGCB e LB conforme aspectos clínicos, morfológicos, imunofenotípicos e moleculares.

-Investigar a associação entre os resultados da expressão das proteínas *MYC*, *BCL2* e *BCL6* por técnica imunoistoquímica com os resultados da detecção das translocações envolvendo esses genes pela técnica de FISH.

-Caracterizar os pacientes portadores de LDGCB e LB conforme os resultados citogenéticos, buscando-se associações entre a detecção da translocação envolvendo o gene *MYC* e parâmetros clínicos, morfológicos e imunofenotípicos.

Capítulo II

*Artigo científico**

*Artigo científico apresentado conforme as normas especificadas no Archives of Pathology & Laboratory Medicine (acessado por http://www.archivesofpathology.org/userimages/ContentEditor/1388413728008/arpa-instructions_for_authors.pdf)

ARTIGO CIENTÍFICO

LINFOMAS *DOUBLE-HIT* EM CASUÍSTICA DE LINFOMAS NÃO-HODGKIN B DE ALTO GRAU: ESTUDO CLÍNICO, MORFOLÓGICO, IMUNOISTOQUÍMICO E CITOGENÉTICO.

Cristiano Claudino Oliveira⁽¹⁾, Helena Maciel Guerra⁽²⁾, Luan Kucko⁽²⁾, Eric Hirama⁽²⁾, Américo Delgado Brilhante⁽³⁾, Francisco Carlos Quevedo⁽⁴⁾, Isabela Werneck da Cunha⁽⁵⁾, Fernando Augusto Soares⁽⁵⁾, Ligia Niero-Melo⁽⁶⁾, Patrícia Pintor dos Reis⁽⁷⁾, Maria Aparecida Custodio Domingues⁽⁸⁾

(1)Médico patologista e pós-graduando, Depto. de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

(2)Acadêmicos do curso de medicina, Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

(3)Médico residente em patologia, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, Brasil.

(4)MD, PhD. Médico patologista, Depto. de Patologia, Hospital do Câncer Amaral Carvalho, Jaú, São Paulo, Brasil.

(5)MD, PhD. Médicos patologistas, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, Brasil.

(6)MD, PhD. Hematologista, docente da disciplina de Hematologia, Depto. de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

(7)MD, PhD. Departamento de Cirurgia e Ortopedia, Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

(8)MD, PhD. Médica patologista, docente do Depto de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

Endereço para correspondência:

Cristiano Claudino Oliveira

Departamento de Patologia

Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB)

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Distrito de Rubião Junior, s/nº, Botucatu, SP

CEP: 18618-000

e-mail: cristiano_c_oliveira@hotmail.com

RESUMO

Introdução: Linfomas *Double-Hit* (LDH) são neoplasias de alto grau raras, caracterizadas pela translocação do gene *MYC* concomitante a translocação envolvendo os genes *BCL2* e/ou *BCL6*, cujo diagnóstico depende da realização de exame citogenético, técnica de baixa disponibilidade e elevado custo. Diante disso, tem-se valorizado a identificação de fatores morfológicos e/ou imunofenotípicos que tenham associação com a detecção de tais translocações diagnósticas. **Objetivos:** Identificar pacientes portadores de LDH em casuística de Linfomas Não-Hodgkin de alto grau e avaliar as associações entre os resultados citogenéticos imunoistoquímicos (IHQ) relativos aos marcadores *MYC*, *BCL2* e *BCL6*. **Material e Métodos:** Procedeu-se revisão clínico-morfológica de 120 pacientes com diagnóstico de Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB) e Linfoma de Burkitt (LB), com confecção de plataforma de *tissue microarray* (TMA) para realização IHQ (CD20, CD79a, PAX5, CD10, *BCL6*, *BCL2*, MUM1, TDT e *MYC*) e hibridação por fluorescência *in situ* (FISH) para detecção de translocações dos genes *MYC*, *BCL6* e *BCL2*. **Resultados:** Detectaram-se três pacientes portadores de LDH: dois com translocações de *MYC* e *BCL2* e um com translocações de *MYC* e *BCL6*, todos evoluindo para óbito em menos de seis meses. Entre 90 amostras com citogenética avaliável, houve associação entre IHQ e FISH para *MYC* ($p=0,036$) e *BCL2* ($p=0,001$), com concordância regular indicada por valores de Kappa de 0,23 [0,0;0,49] e de 0,35 [0,13;0,56], respectivamente. No grupo de LDGCB ($n=72$), as translocações envolvendo individualmente os genes *MYC*, *BCL6* e *BCL2* representaram 4,1%, 12,5% e 15,2%, respectivamente, sendo a morfologia de céu estrelado fortemente associada a detecção de translocações do gene *MYC* ($p=0,01$). **Conclusão:** A detecção de apenas três pacientes portadores de LDH na casuística estudada, todos com evolução para óbito, corrobora a raridade e agressividade dessa neoplasia. O padrão morfológico “céu estrelado” e as expressões por IHQ de c-*MYC* e *BCL2* representam possíveis selecionadores de candidatos à realização da complementação diagnóstica por FISH, contudo estudos mais amplos ainda são necessários, visando a padronização de critérios interpretativos da IHQ desses marcadores e o entendimento de suas influências no prognóstico dos pacientes.

Palavras-Chave: linfoma; linfoma não-Hodgkin; citogenética; hibridização *in situ* fluorescente; imuno-histoquímica.

ABSTRACT:

Background: Double-Hit Lymphomas (DHL) are rare high-grade neoplasms characterized by the translocation of gene *MYC* to other translocations involving genes *BCL2* and/or *BCL6*, whose diagnosis depends on the cytogenetic examination, a technique with low availability and high cost. Therefore, it has been valued the identification of morphologic and/or immunophenotypic factors that have association with the detection of those translocations. Objectives: To identify DHL patients in group of high grade non-Hodgkin Lymphoma (NHL-B) and evaluate the associations between the cytogenetic and immunohistochemical (IHC) results for the *MYC*, *BCL2* and *BCL6* markers. Design: Clinical and morphological review of 120 patients diagnosed with Diffuse Large B-cell Lymphoma (DLBCL) and Burkitt Lymphoma (BL) was proceeded, with production of a tissue microarray platform (TMA) to perform IHC (CD20, CD79a, PAX5, CD10, *BCL6*, *BCL2*, MUM1, TDT and c-*MYC*) and fluorescence in situ hybridization (FISH) for detection of c-*MYC*, *BCL2* and *BCL6* gene translocations. Results: Three patients with DHL were detected: two with translocations of *MYC* and *BCL2* and one with translocations of *MYC* and *BCL6*, all leading to death in less than six months. Among 90 cytogenetically evaluable samples, associations were determined between IHC and FISH for *MYC* ($p=0.036$) and *BCL2* ($p=0.001$), though with regular compliance testing, indicated by Kappa value of 0.23 [0.0;0.49] and 0.35 [0.13;0.56], respectively. In the DLBCL group ($n=72$), *MYC*, *BCL6* and *BCL2* translocations were present in 4.1%, 12.5% and 15.2%, respectively. "Starry sky" morphology was strongly associated with *MYC* positivity ($p=0.01$). Conclusion: The detection of only three DHL patients in this series, all evolving to death, confirms the rarity and aggressiveness of this neoplasm. The morphological pattern "starry sky" and the expression by IHC of *MYC* and *BCL2* can represent possible selection factors for the FISH additional diagnostic testing, but larger studies are still needed in order to standardize interpretative criteria for IHC of this markers and the understanding of its influence on the prognosis of patients.

Keywords: lymphoma; lymphoma, non-Hodgkin; cytogenetics; in situ hybridization fluorescence; immunohistochemistry.

INTRODUÇÃO

Linfoma de Células B inclassificável, com características intermediárias entre o Linfoma Difuso de Grandes Células B e o Linfoma de Burkitt (LBI/LDGCB/LB) é uma entidade provisória, incluída na *WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* no ano de 2008⁽¹⁻⁴⁾. Trata-se de grupo de linfomas agressivos com sobreposição de aspectos morfológicos, imunofenotípicos e genéticos de Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB) e de Linfoma de Burkitt (LB)^(5,6).

O LDGCB é o Linfoma Não-Hodgkin mais comum na população adulta, correspondendo a 30-40% dos casos^(7,8), sendo definido por proliferação clonal de linfócitos B em padrão difuso de crescimento^(9,10). A expressão de CD20, associada à positividade variável dos marcadores CD10, BCL6 e BCL2, com proliferação celular elevada (entre 50-80%), completa a descrição⁽¹⁰⁾.

O LB é neoplasia linfoide frequente na infância, potencialmente curável, ainda que biologicamente agressiva⁽¹¹⁾. Sua morfologia é caracterizada pela proliferação de linfócitos B neoplásicos, em padrão monomórfico e difuso de crescimento com aspecto característico, porém não patognomônico, definido pela presença de corpos apoptóticos determinando aspecto “céu-estrelado”. O perfil imunofenotípico típico é positividade para marcadores pan-B, CD10 e Bcl6, com negatividade para BCL2 e TDT. O índice de proliferação celular dessas neoplasias é acima de 90%, frequentemente chegando próximo dos 100%^(11,12).

Mais de 30% dos pacientes portadores de LDGCB apresentam translocações envolvendo o gene *BCL6*, sendo esse o rearranjo mais comum nesse linfoma^(13,14). A translocação envolvendo o gene *BCL2*, fundamental na gênese do Linfoma Folicular, ocorre em 20-30% dos LDGCB^(15,16). Os rearranjos envolvendo o *MYC* são observados em aproximadamente 10% dos casos^(1,4,17). O gene *MYC* também é o principal marcador molecular do LB cuja translocação é visualizada em todos os pacientes^(11,17,18).

O LBI/LDGCB/LB é morfológicamente identificado pela proliferação difusa de células de médio a grande tamanho, por vezes em aspecto de “céu estrelado”, similar ao observado no LB⁽¹⁹⁾. A neoplasia apresenta imunofenótipo B, com expressão de CD10 e BCL6, além de elevada proliferação celular, variando entre

50% e 100%^(2,19). O LBI/LDGCB/LB exibe comportamento clínico agressivo, com manifestações extranodais, infiltração de medula óssea e sistema nervoso central⁽⁴⁾, além de pouca resposta às drogas quimioterápicas usuais^(20,21), não tendo sido estabelecido um protocolo terapêutico específico para esses casos^(1,4,22).

Aproximadamente 15% dos LBI/LDGCB/LB apresentam fenômeno translocação envolvendo o gene *MYC* em combinação a outro evento de translocação envolvendo o gene *BCL2* e/ou *BCL6*⁽¹⁹⁾. Essas neoplasias são denominadas Linfomas *Double-Hit* (LDH) ou *Triple-Hit*^(1,4), sendo o LDH o mais estudado^(19,23,24). Os três genes alvo compartilham vias de atuação comuns relacionadas a apoptose e proliferação celular⁽²⁵⁾.

Os parâmetros morfológicos e/ou imunofenotípicos atuais parecem não prever efetivamente a detecção citogenética das translocações de *MYC*, *BCL2* e *BCL6*⁽⁴⁾. A necessidade da investigação citogenética das translocações envolvendo *MYC*, *BCL2* e *BCL6* em linfomas de alto grau é controversa na literatura^(4,26), devido às dificuldades na interpretação imunoistoquímica de *MYC*, *BCL2* e *BCL6*⁽²⁷⁻²⁹⁾, que poderia representar um possível método de triagem para investigação molecular, a qual está sendo incorporada à rotina a medida que essas informações citogenéticas ganham relevância na prática terapêutica e prognóstica.

O presente estudo identificou casos de LDH em casuística de linfomas não-Hodgkin de alto grau, caracterizando-os quanto a critérios clínicos, morfológicos, imunofenotípicos e moleculares. Além disso, investigou-se a correspondência entre a expressão das proteínas *MYC*, *BCL2* e *BCL6* avaliadas por técnica imunoistoquímica com a detecção de translocações envolvendo esses genes.

MATERIAL E MÉTODOS

Casuística e delineamento do estudo

Selecionou-se 120 pacientes com diagnóstico anatomopatológico de Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB) ou Linfoma de Burkitt (LB), no período de janeiro de 1998 até dezembro de 2013, no serviço de anatomia patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (HC-FMB-UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil) e do Hospital Amaral Carvalho (HAC, Jaú, São Paulo, Brasil). Os 120 pacientes foram selecionados por meio da revisão dos laudos anatomopatológicos, sendo identificados 100 pacientes com o diagnóstico de LDGCB (61 pacientes do HC-FMB-UNESP, 39 pacientes do HAC) e 20 pacientes com o diagnóstico de LB (todos do HC-FMB-UNESP). O estudo recebeu parecer favorável à sua realização pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FMB-UNESP (protocolo 4385-2012).

Foram revisados os dados sócio-demográficos, como sexo e idade, e as informações clínicas, como comorbidades infecciosas, antecedente de Linfoma Não-Hodgkin (LNH), presença de sintomas B, envolvimento nodal e/ou extra-nodal, acometimento de sistema nervoso central (SNC), infiltração de medula óssea (MO), estadiamento Ann-Arbor, manejo terapêutico adotado, seguimento clínico-evolutivo e ocorrência de recidivas.

Avaliação morfológica

As 120 biópsias selecionadas tiveram suas lâminas de Hematoxilina & Eosina (H&E) avaliadas segundo critérios morfológicos definidos pela OMS, na sua publicação *Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* no ano de 2008. Os parâmetros adotados e analisados nesse estudo foram: padrão citológico monomórfico ou polimórfico, presença de padrão “céu estrelado”, crescimento difuso, necrose, atividade mitótica, apoptose, características nucleares (vesiculoso, lobulado, nucleolado, padrão de cromatina), proliferação endotelial, infiltração de partes moles adjacentes, e eosinofilia citoplasmática.

Avaliação imunofenotípica e Hibridação por Fluorescência in situ (FISH)

Para avaliação imunofenotípica e citogenética utilizou-se plataforma de *tissue microarrays* (TMA) confeccionado a partir de áreas selecionadas de cada uma das amostras dos 120 pacientes, sendo que os cortes foram representados em duplicata, com 1.0 mm de diâmetro e espaçados a cada 0.2 mm⁽²⁹⁾.

O estudo imunoistoquímico foi realizado utilizando o sistema de detecção de polímeros com a revelação pelo cromógeno diaminobenzidina e contra-coloração com hematoxilina. Os marcadores utilizados foram: CD20 (clone L26, diluição 1:250, Cell Marque), CD79a (clone JCB117, Dako, pronto para uso), PAX5 (clone DAK-PAX5, pronto para uso, Dako), CD10 (clone 56C6, pronto para uso, Dako), BCL6 (clone PGB6-P, pronto para uso, Dako), BCL2 (clone 124, pronto para uso, Dako), MUM1 (clone MUM1P, pronto para uso, Dako), TDT (policlonal, pronto para uso, Dako) e C-MYC (clone EP121, pronto para uso, Biocare).

A expressão dos anticorpos CD20, CD79a, PAX5, CD10, MUM1 e TDT foram avaliados quanto a positividade ou negatividade. Os marcadores MYC, BCL2 e BCL6 foram avaliados quanto ao percentual de expressão celular. Para o MYC e o BCL6, as amostras foram consideradas positivas quando a expressão do marcador era superior a 50% das células tumorais. Já para o BCL2, o critério de positividade adotado foi de 70% ou mais de células coradas pelo marcador. A avaliação do índice de proliferação celular pelo Ki-67 (clone MIB-1, pronto para uso, Dako) foi analisada de duas formas. Numa delas, estratificou-se em três classes: inferior a 50%, maior ou igual a 50% até 75%, e maior ou igual a 75%; em outra se estratificou em inferior a 90%, e maior ou igual a 90%.

A análise da hibridação por fluorescência *in situ* (FISH) foi realizada nas amostras contidas no bloco de TMA usando-se sondas específicas para detecção de translocações envolvendo os *loci* dos genes *c-MYC* (Vysis LSI, *MYC* dual color, break apart rearrangement probe; Abbott Molecular Des Plaines, IL, USA), *BCL2* (Dako, *BCL2* FISH DNA probe split signal) e *BCL6* (Vysis LSI, *BCL6* dual color, break apart rearrangement probe; Abbott Molecular Des Plaines, IL, USA), conforme as instruções do fabricante. Os resultados do FISH foram analisados em microscópio de fluorescência (BX61; Olympus, Center Valley, PA) com filtros apropriados e as imagens capturadas com a câmera digital Q-Color 5 Olympus. Os casos foram considerados positivos quando, em uma amostra, 5,0% das células (no mínimo 40 células neoplásicas foram contadas) apresentavam os sinais alaranjados e verdes apartados⁽³⁰⁾.

Análise estatística

Todas as análises foram elaboradas usando-se o programa estatístico SPSS versão 5.0. Realizou-se análise descritiva, seguida por testes de Qui-Quadrado e Exato de Fisher para a comparação entre proporções. As concordâncias entre o teste imunoistoquímico e citogenético, para os marcadores MYC, BCL2 e BCL6, foram avaliadas com os cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, além de acurácia e coeficiente Kappa, apresentados com os seus respectivos intervalos de 95% de confiança. A força da concordância determinada pelo coeficiente Kappa foi assim analisada: pobre ($<0,20$), regular (0,21 a 0,40), moderada (0,41 a 0,60), boa (0,61 a 0,80), muito boa (0,81 a 1,00). O nível de significância (p -valor) testado foi de 0,05.

RESULTADOS

Os 120 pacientes incluídos no estudo foram submetidos à revisão clínica, avaliação morfológica, estudo imunoistoquímico e teste citogenético por FISH. Contudo, em 30 pacientes foram constatadas falhas no teste molecular em um ou mais dos três marcadores, por questões relativas à fixação do material. A análise pelo FISH detectou três portadores de LDH. Os três grupos diagnósticos definidos pelo estudo foram LB (n=15), LDH (n=3) e LDGCB (n=72) e seus dados epidemiológicos, clínico-evolutivos, morfológicos, imunoistoquímicos e citogenéticos são demonstrados na Tabela 1. Os portadores de LB eram predominantemente do sexo masculino (60%), com mediana de idade de quatro anos (variando de dois a 48 anos), um deles portador de HIV. A morfologia típica desse grupo se consistiu de padrão monomórfico, difuso, em “céu estrelado”. Confirmou-se imunofenótipo B em todos os casos, além de positividade para CD10 (100% dos casos) e BCL6 (46,7%). Clinicamente, esses pacientes exibiam nível de DHL elevado (83,3%), estadiamento III/IV na apresentação clínica (60%), massas extranodais (83,3%) e adenomegalias (53,3%). Entre os portadores de LDGCB, o sexo masculino foi predominante (59,7%) e a mediana de idade foi de 56,5 anos (variando entre 25 e 69 anos), sendo 47,2% dos pacientes acima dos 60 anos. O padrão morfológico de crescimento difuso foi frequente (98,6%), com características de “céu estrelado” em 23,6% dos indivíduos estudados. Massas extranodais e adenomegalias estavam presentes em 49,3% e 61,9% dos pacientes respectivamente.

Tabela 1 – Perfil epidemiológico, clínico-evolutivo, morfológico, imunoistoquímico e citogenético da casuística após realização do FISH

	Grupos diagnósticos após FISH					
	LB (n=15)		LDH (n=3)		LDGCB (n=72)	
	n	%	n	%	n	%
Dados epidemiológicos						
Sexo feminino	6	40	2	66,7	29	40,3
Sexo masculino	9	60	1	33,3	43	59,7
Idade acima de 60 anos	0	0	3	100	34	47,2

HIV positivo	1	6,7	0	0	2	2,8
LNH prévio	0	0	0	0	2	2,8
Hepatite viral	0	0	0	0	4	5,5
<i>Padrão morfológico</i>						
Monomórfico	15	100	3	100	51	70,8
Polimórfico	0	0	0	0	21	29,1
Céu estrelado	14	93,3	0	0	17	23,6
Difuso	15	100	3	100	71	98,6
Necrose	1	6,7	1	33,3	26	36,1
Mitoses	12	80	1	33,3	52	72,2
Apoptose	14	93,3	3	100	57	79,1
Vesiculação nuclear	4	26,7	1	33,3	52	72,2
Nucléolo evidente	5	33,3	0	0	64	88,8
Lobulação nuclear	2	13,3	0	0	30	41,6
Cromatina densa	10	66,7	3	100	18	25
Cromatina frouxa	6	40	0	0	54	75
Proliferação endotelial	4	26,7	1	33,3	35	48,6
Eosinofilia citoplasmática	7	46,7	3	100	43	59,7
Infiltração nas partes moles	4	26,7	1	33,3	38	52,7
Esclerose estromal	0	0	0	0	19	26,3
<i>Imunoistoquímica</i>						
CD20	15	100	3	100	68/70	97,1
CD79a	14	93,3	2	66,7	66/70	94,3
PAX5	11	73,3	1	33,3	49/70	70
CD10	15	100	3	100	31/71	43,6
BCL6	7	46,7	2	100	22/70	31,4
BCL2	0	0	2	100	29/71	40,8
MUM1	0	0	0	0	37/71	52,1
TDT	0	0	0	0	0	0
MYC	5	33,3	0	0	11/70	15,7
Ki-67 > 90%	3	20	2	66,7	9/70	12,8
<i>Marcadores citogenéticos</i>						
MYC	15	100	3	100	3	4,2

<i>BCL2</i>	0	0	2	66,7	11	15,3
<i>BCL6</i>	0	0	1	33,3	9	12,5
Marcadores prognósticos						
DHL elevado	5/6	83,3	2	66,7	37/47	78,7
Estadiamento III/IV	9	60	0	0	29/71	40,8
Medula óssea infiltrada	2	13,3	0	0	12/71	16,9
Infiltração em SNC	1	6,7	0	0	4/71	5,6
Sintomas B	9	60	1	33,3	31/71	43,6
Massa extranodal	8	53,3	2	66,7	35/71	49,3
Adenomegalias	8	53,3	1	33,3	44/71	61,9
Tratamento e prognóstico						
Quimioterapia	11	73,3	2	66,7	65/71	91,5
Quimioterapia e radioterapia	1	6,6	0	0	17	26,6
Transplante de medula óssea	0	0	0	0	1	1,4
Óbito	5	33,3	3	100	30/66	45,4
Recidiva	0	0	0	0	2/59	3,4

Os três pacientes com LDH identificados pelo FISH (Tabela 2) foram duas mulheres e um homem, todos acima dos 60 anos de idade, sem comorbidades prévias, incluindo quaisquer tipos de doenças hematológicas. Um paciente do grupo exibiu translocação do gene *MYC* simultaneamente a translocação do gene *BCL6*, com diagnóstico prévio de LB (Paciente 1; Figura 1). Dois dos portadores de LDH apresentavam concomitantemente translocação envolvendo o gene *MYC* e o gene *BCL2*, e tinham o diagnóstico prévio de LDGCB (Pacientes 2 e 3; Figuras 2 e 3). Na presente casuística, não houve casos de Linfoma *Triple-Hit* (LTH).

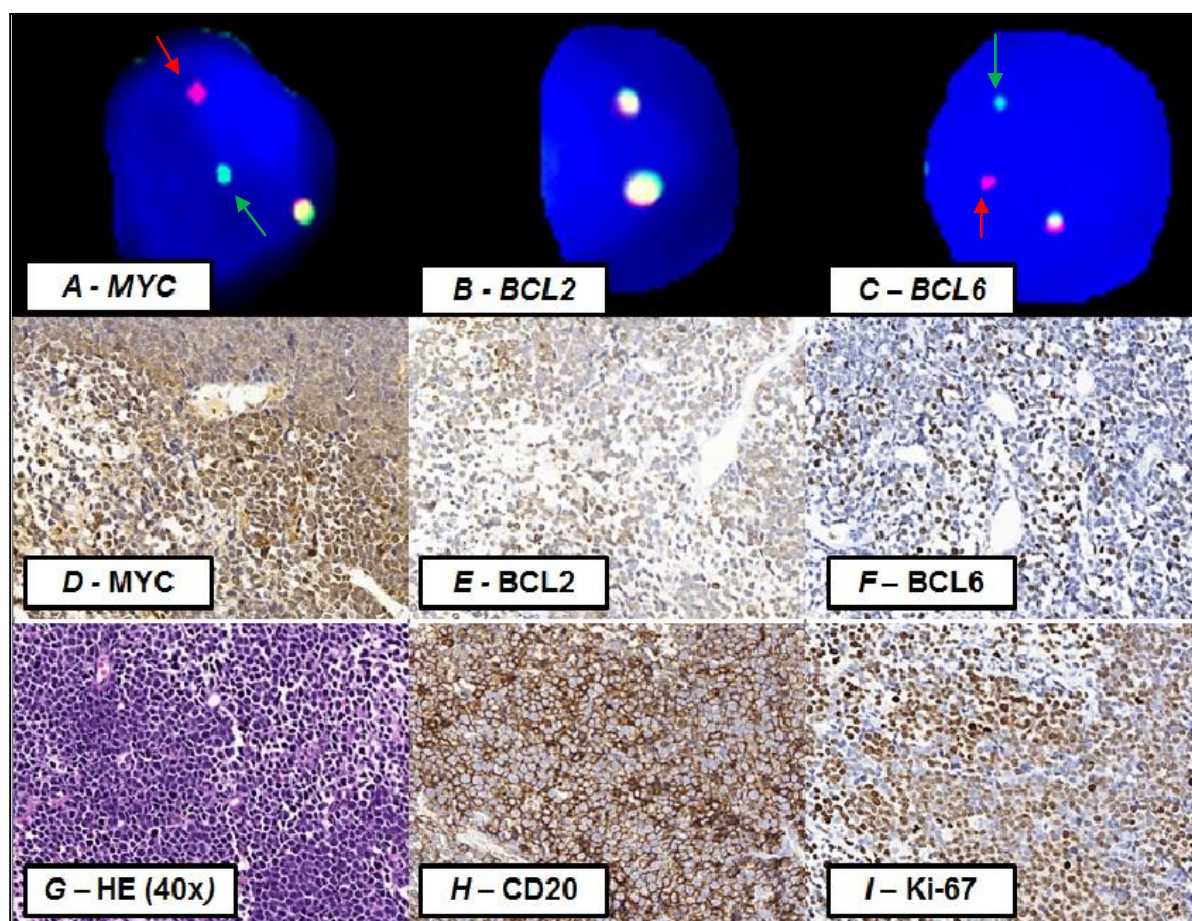


Figura 1 – Aspectos morfológicos, imunoistoquímicos e citogenéticos do paciente 1. Imagens A, B e C correspondem ao exame de FISH demonstrando positividade para MYC (A) e BCL6 (C), neste caso, cujos sinais estão assinalados com setas. Imagens D (400x) e E (400x) exibem a negatividade para MYC e BCL2 na imunoistoquímica. Na imagem F, observa-se a positividade para BCL6. Imagem G (H&E, 400x) retratando a morfologia em padrão difuso de crescimento. A positividade para CD20 confirma o imunofenótipo B e é demonstrado na imagem H (400x). Imagem I referente ao índice de proliferação celular acima de 90%.

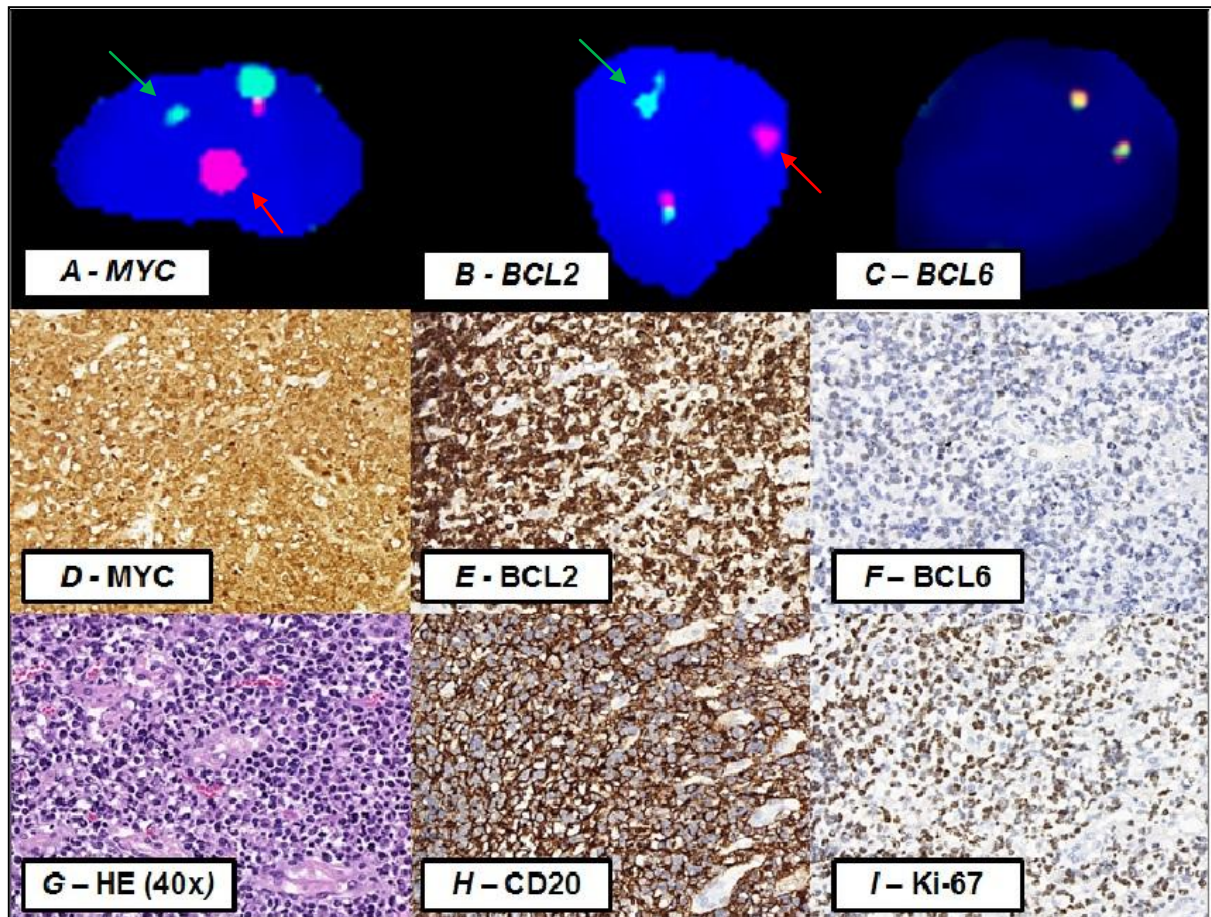


Figura 2 – Aspectos morfológicos, imunoistoquímicos e citogenéticos do paciente 2. Imagens A, B e C correspondem ao exame de FISH demonstrando positividade para MYC (A) e BCL2 (B), neste caso, cujos sinais estão assinalados com setas. Imagem D (400x) exibe negatividade para MYC e a imagem E (400x) exibe positividade para BCL2 na imunoistoquímica. Na imagem F, observa-se a negatividade para BCL6. Imagem G (H&E, 400x) retrata a morfologia de alto grau da neoplasia, a qual tem positividade para CD20, confirmando o imunofenótipo B, demonstrado na imagem H (400x). Imagem I referente ao índice de proliferação celular acima de 90%.

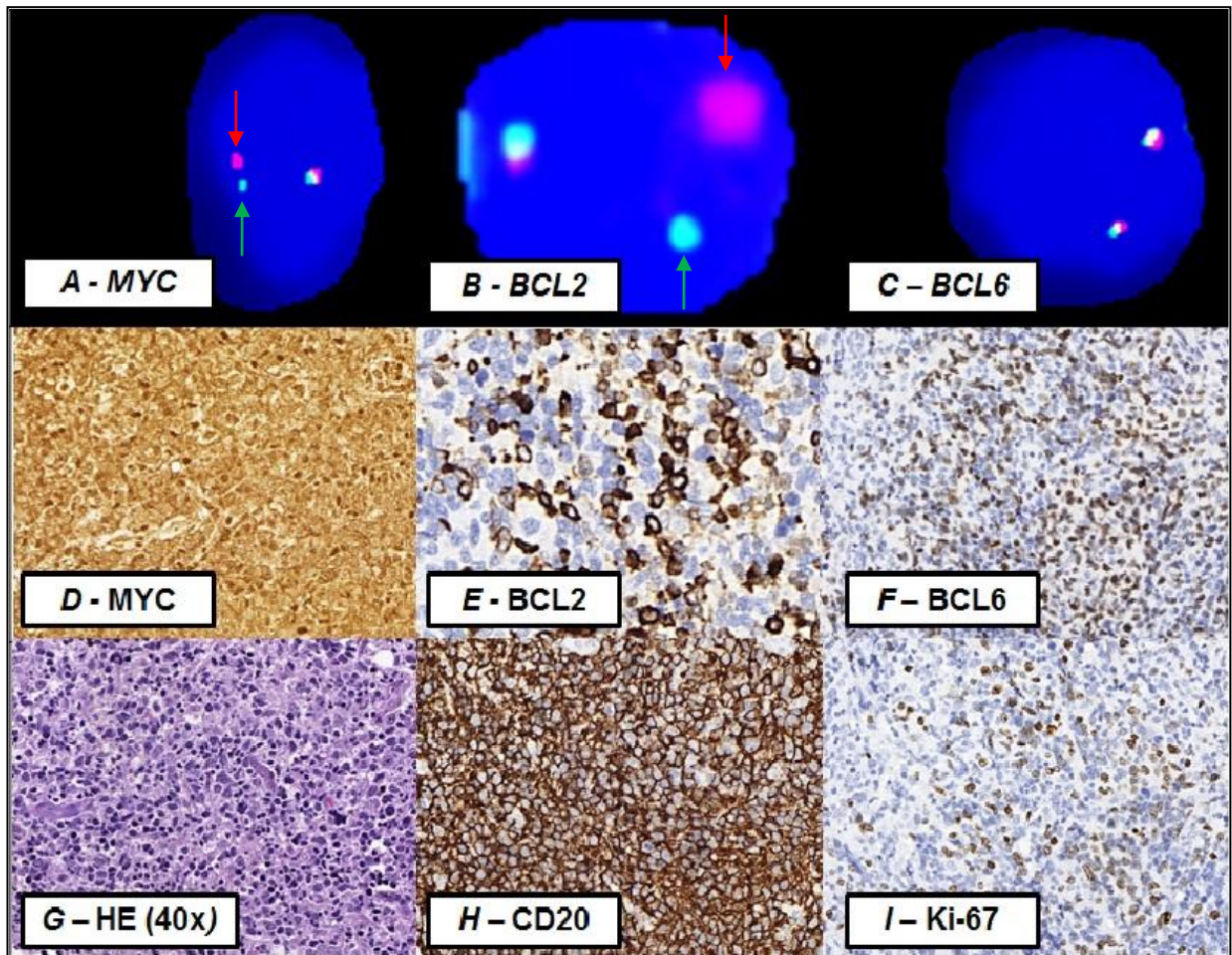


Figura 3 – Aspectos morfológicos, imunoistoquímicos e citogenéticos do paciente 3. Imagens A, B e C correspondem ao exame de FISH demonstrando positividade para MYC (A) e BCL2 (B), neste caso, cujos sinais estão assinalados com setas. Imagem D (400x) exhibe negatividade para MYC na imunoistoquímica. As imagens E (400x) e F (400x) exibem positividade para BCL2 e BCL6. Imagem G (H&E, 400x) retrata a morfologia da neoplasia, que apresenta positividade para CD20, confirmando o imunofenótipo B, demonstrado na imagem H (400x). Imagem I referente ao índice de proliferação celular inferior a 90%.

Clinicamente, na apresentação inicial, dois pacientes apresentavam massas extranodais. Sintomas B e adenomegalias foram observados em um paciente. Não foi detectada infiltração neoplásica na medula óssea ou SNC nos três pacientes. Nenhum desses indivíduos teve estadiamento Ann-Arbor III ou IV.

Quanto à morfologia, o padrão monomórfico, difuso, com elementos apoptóticos e citoplasma eosinofílico foram comuns às três amostras. Os achados de padrão “céu estrelado”, esclerose ou lobulação nuclear não foram visualizados nesse grupo.

Na avaliação imunoistoquímica, os três pacientes tiveram seu imunofenótipo B confirmado. Um deles apresentava positividade para BCL6 e BCL2. Houve negatividade para MUM-1, TDT e MYC em todas as amostras. Nenhum dos indivíduos apresentou correspondência completa entre seus marcadores citogenéticos e imunoistoquímicos. O índice de proliferação celular avaliado pelo Ki-67 foi superior a 90% em dois pacientes. No outro, o percentual proliferativo ficou entre 50% e 75%.

A evolução clínica desses pacientes foi óbito em um, cinco e seis meses, independente do tratamento quimioterápico, realizado por dois deles. Um indivíduo utilizou esquema R-CHOP e o outro utilizou esquema R-HIPERCVAD (ciclofosfamida, vincristina, doxorrubicina e dexametasona). O paciente com óbito em prazo inferior a 30 dias não iniciou o tratamento quimioterápico.

Tabela 2 – Apresentação clínica, imunofenotípica e citogenética dos três pacientes portadores de linfoma *double-hit* (LDH)

	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3
Idade	65 anos	72 anos	64 anos
Sexo	feminino	masculino	feminino
Diagnóstico prévio	LB	LDGCB	LDGCB
Imunoistoquímica			
CD20	positivo	positivo	positivo
CD79a	negativo	positivo	positivo
PAX5	positivo	negativo	positivo
CD10	positivo	positivo	positivo
BCL2	negativo	positivo	positivo
BCL6	positivo	negativo	positivo
MYC	negativo	negativo	negativo
MUM1	negativo	negativo	negativo
TDT	negativo	negativo	negativo
Ki-67	>90%	>90%	<90%
Citogenética			
MYC	positivo	positivo	positivo
BCL2	negativo	positivo	positivo
BCL6	positivo	negativo	negativo
Estadiamento	IA	IA	IB
DHL	elevado	ND*	ND*
Medula óssea infiltrada	ausente	ausente	ausente
Infiltração de SNC	ausente	ausente	ausente
Massa extranodal	ausente	presente	presente
Adenomegalia	presente	ausente	ausente
Sintomas B	ausente	ausente	presente
Tratamento	HIPER-CVAD	não realizou	R-CHOP
Óbito	sim	sim	sim
Intervalo até o óbito	5 meses	1 mês	6 meses

*ND=dado não disponível

Os testes citogenéticos demonstraram que os 15 indivíduos com diagnóstico de LB apresentavam a translocação do gene *MYC*. No grupo daqueles com LDGCB, as positivities para *MYC*, *BCL6* e *BCL2* foram, respectivamente, três (4,2%), nove (12,5%) e 11 (15,3%).

A correspondência dos achados citogenéticos com o estudo imunoistoquímico no conjunto global dos pacientes é demonstrada na Tabela 3. A positividade imunoistoquímica para *MYC* ocorreu em 19 pacientes, dos quais oito (42,1%) eram, também, positivos na análise citogenética ($p=0,036$). Para este marcador, a técnica imunoistoquímica teve especificidade elevada (85%) e sensibilidade baixa (38%), com concordância regular para identificação de sua respectiva translocação (Kappa = 0,23 [0,0;0,49]). Com relação ao *BCL2*, entre as 37 amostras positivas na imunoistoquímica, 13 (35,1%) exibiam a translocação do referido gene no FISH ($p=0,001$), contudo a concordância entre os dois métodos também foi regular (Kappa = 0,35 [0,13;0,56]), com sensibilidade de 81% e especificidade de 71%. O estudo do *BCL6* demonstrou que quatro (12,5%) pacientes dos 32 positivos na imunoistoquímica apresentavam resultado positivo no FISH ($p=0,724$), exibindo concordância pobre entre os dois métodos para esse marcador (Kappa = 0,04 [0,00;0,30]).

Estudaram-se, também, amostras com dupla positividade imunoistoquímica e sua relação com os resultados citogenéticos. Nenhum dos quatro indivíduos com positividade imunoistoquímica simultânea para *MYC* e *BCL2* estava associado a resultados positivos no FISH. Resultado idêntico foi constatado entre as duas técnicas, em três pacientes, para a combinação *MYC* e *BCL6*.

Tabela 3 – Imunoistoquímica (IHQ) e citogenética (FISH) para MYC, BCL2 e BCL6, considerando o total de amostras válidas: sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN), acurácia (A) e coeficiente Kappa, com seus respectivos intervalos de 95% de confiança.

MYC (n=92)									
	n	FISH+	p*	S	E	VPP	VPN	A	Kappa
IHQ negativa	73	13 (18,0%)	0,036	0,38	0,85	0,42	0,82	0,74 [0,65;0,83]	0,23 [0,0;0,49]
IHQ positiva	19	8 (42,1%)							
BCL2 (n=101)									
	n	FISH+	p*	S	E	VPP	VPN	A	Kappa
IHQ negativa	64	3 (4,6%)	0,001	0,81	0,71	0,35	0,95	0,73 [0,64;0,81]	0,35 [0,13;0,56]
IHQ positiva	37	13 (35,1%)							
BCL6 (n=98)									
	n	FISH+	p*	S	E	VPP	VPN	A	Kappa
IHQ negativa	66	6 (9,0%)	0,724	0,40	0,68	0,12	0,90	0,65 [0,56;0,75]	0,04 [0,0;0,30]
IHQ positiva	32	4 (12,5%)							

*Teste de Qui-Quadrado ou Teste Exato de Fisher, quando apropriado; *p*<0,05.

As avaliações dessas mesmas associações considerando-se apenas os pacientes portadores de LDGCB estão representadas na Tabela 4. Neste grupo, nove pacientes (31%, *p*=0,005) exibiam positividade imunoistoquímica e citogenética para BCL2, com concordância regular (Kappa = 0,29 [0,04;0,54]). Os achados referentes ao MYC e ao BCL6 não foram estatisticamente significantes.

Tabela 4 – Imunoistoquímica (IHQ) e citogenética (FISH) para MYC, BCL2 e BCL6, considerando o grupo de LDGCB: sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), acurácia (A) e coeficiente Kappa, com seus respectivos intervalos de confiança.

MYC (n=70)									
	n	FISH+	p*	S	E	VPP	VPN	A	Kappa
IHQ negativa	59	1 (1,7%)	0,062	0,67	0,87	0,18	0,98	0,86 [0,78;0,94]	0,23 [0,0;0,67]
IHQ positiva	11	2 (18,1%)							
BCL2 (n=71)									
	n	FISH+	p*	S	E	VPP	VPN	A	Kappa
IHQ negativa	42	2 (4,7%)	0,005	0,81	0,66	0,31	0,95	0,69 [0,58;0,79]	0,29 [0,04;0,54]
IHQ positiva	29	9 (31%)							
BCL6 (n=70)									
	n	FISH+	p*	S	E	VPP	VPN	A	Kappa
IHQ negativa	48	6 (12,5%)	1,000	0,33	0,69	0,13	0,87	0,64 [0,53;0,76]	0,01 [0,0;0,32]
IHQ positiva	22	3 (13,6%)							

*Teste de Qui-Quadrado ou Teste Exato de Fisher, quando apropriado; p<0,05.

A avaliação pelo FISH revelou 21 amostras positivas para a translocação MYC: 15 do grupo de LB, três do grupo de LDH e três do grupo de LDGCB. A Tabela 5 descreve comparativamente o conjunto dos três pacientes com LDGCB portadores da translocação do gene MYC em relação ao grupo de 72 pacientes com LDGCB. Observa-se que em 17 amostras havia padrão morfológico de “céu estrelado”, dentre os quais três (17,6%) eram positivos para a translocação MYC, associação estatisticamente significativa (p=0,011).

Outros parâmetros como índice de proliferação celular acima de 90%, perfil imunoistoquímico não-centro germinativo e positividade imunoistoquímica para MYC não se mostraram associados à detecção da translocação pelo FISH. Entre esses três pacientes, em dois a proliferação celular ficou na faixa entre 50% e 75% e em um, abaixo de 50%.

Tabela 5 – Pacientes com LDGCB (n=72): comparação entre portadores e não portadores da translocação do gene *MYC*, identificado pela técnica de FISH.

	LDGCB (n=72)	LDGCB com <i>MYC</i> +		
	n	n	%	<i>p</i> *
<i>Epidemiologia</i>				
Sexo masculino	43	2	4,6	1,000
Idade superior a 60 anos	34	2	5,8	0,599
HIV+	2	0	0	1,000
LNH prévio	2	0	0	1,000
<i>Morfologia</i>				
Monomórfico	51	3	5,8	0,551
Polimórfico	21	0	0	0,551
Céu estrelado	17	3	17,6	0,011
Difuso	71	3	4,2	1,000
Necrose	26	0	0	0,549
Mitoses	52	2	3,8	1,000
Apoptose	57	3	5,2	1,000
Vesiculação nuclear	52	2	3,8	1,000
Nucléolo proeminente	64	3	4,6	1,000
Lobulação nuclear	30	2	6,6	0,567
Cromatina densa	18	1	5,5	1,000
Cromatina frouxa	54	2	3,7	1,000
Proliferação endotelial	35	2	5,7	0,609
Eosinofilia citoplasmática	43	2	4,6	1,000
Infiltração de partes moles	38	1	2,6	0,599
Esclerose estromal	19	1	5,2	1,000

Imunoistoquímica

Centro germinativo	34/70	1	2,9	1,000
Não Centro Germinativo	36/70	2	5,5	1,000
MYC	11/70	2	18,1	0,062
BCL6	22/70	0	0	0,547
BCL2	29/71	1	2,1	0,262
Proliferação celular (Ki-67) acima de 90%	9/70	0	0	1,000

Clínico-evolutivos

DHL elevado	37/47	1	2,7	0,384
Estadiamento III/IV	29/71	1	3,4	1,000
Infiltração de medula óssea	12/71	1	8,3	0,431
Infiltração de SNC	4/71	0	0	1,000
Sintomas B	31/71	0	0	0,252
Massa extranodal	35/71	2	5,7	0,614
Adenomegalias	44/71	2	4,5	1,000
Óbito	30/66	1	3,3	1,000
Recidivas	2/59	0	0	1,000

*Teste de Qui-Quadrado ou Teste Exato de Fisher, quando apropriado; $p < 0,05$.

Na descrição da categoria LBI/LDGCB/LB, na publicação da OMS-2008, casos em que a morfologia se assemelha ao LDGCB com imunofenótipo sugestivo de LB (CD10+, BCL6+, BCL2-), ou casos em que a morfologia se assemelha ao LB, porém com positividade também para BCL2, aliados a elevado índice de proliferação celular, poderiam ser enquadrados nesse diagnóstico. Do ponto de vista citogenético, entre 35-50% desses pacientes teriam translocações envolvendo o gene *MYC* com genes de imunoglobulina ou não. Aproximadamente 15% dos pacientes com esse diagnóstico teriam também a translocação do *BCL2*, compondo casos de LDH. No presente estudo, três pacientes do grupo de LDGCB, exibindo morfologia de “céu estrelado”, tinham imunofenótipo caracterizado por positividade para CD10, BCL6 e BCL2, com proliferação celular superior a 90% pela avaliação do Ki-67. Nenhum dos três casos apresentava positividade no FISH para *MYC* ou *BCL2* ou *BCL6*. Nesse subgrupo, dois tinham mais de 60 anos, todos foram tratados com esquema R-CHOP, obtendo-se duas remissões e um indivíduo se manteve doente.

Medula óssea e SNC encontravam-se livres de doenças nos três pacientes. Havia, também, dois pacientes, cujo padrão morfológico de crescimento era difuso, sem elementos do tipo “céu estrelado”, com expressão de CD10 e BCL6, negatividade para BCL2, e Ki-67 na faixa acima de 90%. Esses dois pacientes também não apresentavam positividade na avaliação por FISH para *MYC* ou *BCL2* ou *BCL6*. Um indivíduo evoluiu rapidamente para óbito e o outro se mantinha doente, mesmo com tratamento quimioterápico usando o esquema R-CHOP. Medula óssea ou SNC também não apresentavam infiltração neoplásica.

Com relação ao tratamento quimioterápico, 57 (79,1%) pacientes entre os 72 portadores de LDGCB usaram esquema CHOP, sendo que 11 receberam a combinação de CHOP com rituximab (R-CHOP) e 14 necessitaram de complementações com outros esquemas terapêuticos. Quanto à evolução clínica, no grupo de LDGCB, 30 (41,6%) indivíduos, entre 66 casos, tiveram óbito como desfecho, aproximadamente 13 meses após o diagnóstico (desvio padrão de 13,99). Entre os portadores de LB, cinco pacientes (33,3%) evoluíram para óbito, aproximadamente 1,2 meses após o diagnóstico (desvio padrão de 0,83). No grupo de LDH, todos os pacientes tiveram óbito, com média de 4 meses (desvio padrão de 2,6). A Tabela 6 expõe o percentual de óbito acompanhado da média do intervalo de tempo entre o diagnóstico e esse desfecho para subgrupos de pacientes definidos de acordo com seus resultados imunoistoquímicos e citogenéticos. Na casuística estudada, observou-se que a pior evolução clínica, em termos de percentual de óbito, ocorreu entre os pacientes com LDH, contudo devem ser salientadas as limitações quanto ao tamanho amostral. Ao se comparar os pacientes com dupla expressão imunoistoquímica de *MYC* com *BCL2* ou *BCL6*, nota-se comportamento biológico menos agressivo em relação aos indivíduos detectados com LDH pelo método citogenético.

Tabela 6 – Percentual de óbito e intervalo temporal entre diagnóstico e óbito, expresso em média e desvio padrão, quanto a expressão imunoistoquímica e citogenética dos marcadores MYC, BCL2 e BCL6

	Óbito		Intervalo temporal até o óbito	
	n	%	Média (meses)	Desvio Padrão
LDH FISH*	3/3	100	4	2,6
LDE IHQ**	1/6	16,6	1	NA***
MYC FISH	1/3	33,3	10	NA***
MYC IHQ	2/10	20,0	9,5	12
BCL2 FISH	4/11	36,4	5	8,4
BCL2 IHQ	12/27	44,4	14,3	17,2
BCL6 FISH	4/8	50,0	10	10,4
BCL6 IHQ	9/20	45,0	8,6	8,6

*LDH FISH: Linfoma Double-Hit diagnosticado por técnica citogenética.

**LDE IHQ: Linfomas com dupla expressão imunoistoquímica de MYC com BCL2 ou BCL6.

***NA: Não se aplica

DISCUSSÃO

LDH são neoplasias agressivas e raras que representam menos de 10% dos linfomas e aproximadamente 4% dos linfomas de alto grau^(4,25). Em consonância com os dados internacionais, nesta casuística selecionada em dois centros oncológicos brasileiros, o estudo citogenético por FISH em pacientes com linfomas de alto grau indicou a presença de três casos de LDH, dois deles com translocações envolvendo *MYC* e *BCL2*, e um deles com translocações envolvendo *MYC* e *BCL6*. A combinação mais frequentemente relatada é a dupla translocação envolvendo o gene *MYC* e o gene *BCL2* (62%). Já a dupla translocação envolvendo o gene *MYC* e o gene *BCL6* corresponde a 8% dos casos^(4,31).

Fatores clínicos e prognósticos dos portadores de LDH exemplificam a agressividade dessa neoplasia. Epidemiologicamente, esse tipo de linfoma incide mais comumente na população acima de 60 anos^(4,25). A manifestação inicial da doença, em geral, já é em estadiamento avançado^(25,27), conforme demonstrado por Landsburg et al (2014)⁽²⁷⁾, em estudo com 17 pacientes portadores de LDH, dos quais 14 inauguraram o quadro em estadiamento III ou IV. Infiltração de medula óssea ou SNC é mais frequentemente relatada nesses pacientes⁽²³⁾. Oki et al (2014)⁽³²⁾, no maior estudo sobre LDH em centro oncológico único, detectaram células neoplásicas na medula óssea e SNC em 42% e em 4% dos pacientes, respectivamente⁽³²⁾. Os três pacientes identificados no presente estudo são idosos, porém sem estadiamento elevado ou infiltração de medula óssea/SNC. Contudo, dois dos pacientes exibiam massas extranodais. Oki et al (2014)⁽³²⁾ apontaram que a idade, a presença de massas extranodais e o estadiamento têm pouca influencia prognóstica, e que a infiltração de medula óssea e SNC seriam os melhores fatores preditores de má evolução clínica nesses pacientes⁽³²⁾. A sobrevida é menor nos pacientes com LDH. Segundo Landsburg et al (2014)⁽²⁷⁾, esse valor é de 8,2 meses nesse grupo contra 56,8 meses nos portadores de linfomas de alto grau de padrão não *double-hit*. Snurdel et al (2010)⁽²³⁾ encontraram 70% de óbito em oito meses no grupo de pacientes com LDH. No presente estudo, os três pacientes com LDH evoluíram para óbito, com uma média de 4 meses após o diagnóstico. Considerando outros grupos citogenéticos e imunoistoquímicos nesse estudo, os quais estão demonstrados na Tabela 6, observa-se que o grupo de LDH foi o único em que

todos os pacientes tiveram o óbito como desfecho de suas doenças. Contudo, as limitações de amostragem prejudicam análises mais expansivas desses dados.

A agressividade do LDH é possivelmente explicada pela ação sinérgica de *MYC* e *BCL2*: somam-se atividade proliferativa com inibição do apoptose, em contexto de complexidade cariotípica^(4,31). Aukema et al (2014)⁽³¹⁾, em estudo recente, propuseram que o cariótipo complexo é uma característica comum aos portadores de LDH e aos portadores de LDGCB com translocação única do gene *MYC*, o que justificaria o prognóstico ruim de ambas as situações. Contudo, essa ainda é uma questão controversa na literatura^(33,34).

A identificação dos pacientes portadores de LDH depende da realização do exame citogenético, uma técnica de custo elevado e não disponível em todos os centros médicos. Desde 2008, muitos estudos^(21,25,27,32,35,36) foram publicados com o objetivo de identificar critérios clínicos e/ou morfológicos e/ou imunoistoquímicos capazes de selecionar pacientes para os estudos moleculares. Um dos principais aspectos estudados foi a associação entre os resultados dos testes imunoistoquímicos e citogenéticos quanto a expressão de *MYC*, *BCL2* e *BCL6*.

Na casuística aqui apresentada, os melhores valores de concordância ocorreram com relação ao *BCL2*, tanto quando considerado todos os indivíduos do estudo, como considerando apenas o grupo de LDGCB. Os resultados mais pobres foram visualizados nos testes envolvendo *BCL6*. As avaliações de *MYC* e *BCL2*, ainda que tenham bons resultados, demonstram concordância regular pelo coeficiente Kappa, indicando a necessidade de cautela na avaliação desses marcadores pelo método imunoistoquímico.

Perry et al (2014)⁽²¹⁾ estudaram 106 pacientes com o diagnóstico de LDGCB quanto a expressão imunoistoquímica de *MYC* e *BCL2*, correlacionando seus dados com o prognóstico. A positividade para esses marcadores, sobretudo quando para ambos, esteve relacionada à pior prognóstico. A dupla positividade, conforme esses autores, aumentaria em nove vezes a chance de óbito. No entanto, no referido estudo, não se realizou a correlação com dados citogenéticos⁽²¹⁾. A avaliação imunoistoquímica de *MYC*, *BCL2* e *BCL6* representa uma dificuldade discutida por muitos grupos de hematopatologistas^(33,34). Os pontos de corte para se determinar a positividade para *MYC* variam entre 30% e 50%. Já para *BCL2* existe variação entre 30% e 70%^(33,34,37).

Green et al (2012)⁽³⁵⁾ estudaram por técnica imunoistoquímica e citogenética 193 pacientes com diagnóstico de LDGCB. Na casuística desse grupo, 6% eram LDH identificados por FISH, com prognóstico ruim. Já 29% dos pacientes apresentam positividade para MYC (maior ou igual a 40%) e BCL2 (maior ou igual a 70%) na imunoistoquímica. Esses pacientes, independente do resultado citogenético, exibiam piores taxas de sobrevida em relação aos outros pacientes. Esses autores elaboraram uma estratificação imunoistoquímica, de modo que 54% dos pacientes avaliados possuíam positividade imunoistoquímica para MYC (maior ou igual a 40%) e BCL2 (maior ou igual a 70%) e tinham translocações envolvendo esses genes, separadamente ou ambos simultaneamente⁽³⁵⁾. Yan et al (2014)⁽³⁶⁾ avaliaram 336 LDGCB e detectaram que os LDH identificados por FISH e os LDGCB com dupla ou tripla positividade imunoistoquímica para MYC e BCL2 e/ou BCL6 compartilham fatores de mau prognóstico, porém suas diferenças não eram estatisticamente significantes. O principal ponto dessa pesquisa foi a elevada especificidade da imunoistoquímica desses marcadores com relação ao FISH (aproximadamente 90%), favorecendo sua possível utilização como estratificador de risco para LDGCB com comportamento agressivo⁽³⁶⁾.

O índice de proliferação celular, avaliado pelo percentual de marcação pelo Ki-67, também já foi testado como possível parâmetro selecionador de pacientes para submissão a testes citogenéticos. Kalaw et al (2012)⁽³⁸⁾ utilizou dois percentuais de corte para Ki-67, correlacionando-os com a expressão citogenética concomitante de *MYC* e *BCL2*. Seja com o valor de corte de 75% ou com o valor de 90%, as taxas de especificidade foram baixas, não ultrapassando 55%⁽³⁸⁾. Os achados desfavorecem a ideia de que proliferação celular isoladamente possa estar associada a anormalidades citogenéticas envolvendo principalmente o *MYC*. No presente estudo a associação entre Ki-67 acima de 90% e translocação envolvendo *MYC* não foi estatisticamente significativa.

O uso da ferramenta imunoistoquímica, especialmente para detecção do marcador MYC, deve ser cauteloso. Ainda que hajam resultados favoráveis, esse é um ponto controverso na literatura, principalmente no que se refere aos reais valores de corte que apresentam correspondência citogenética. Enfatizam-se, também, as influências relacionadas aos observadores. Mahmoud et al (2015)⁽³⁷⁾ estudaram a concordância na avaliação da expressão de MYC por imunoistoquímica e notaram grande heterogeneidade de resultados entre os observadores testados, refletindo as

interferências subjetivas e a ausência de uma padronização bem definida quanto a interpretação do marcador⁽³⁷⁾.

Neste contexto, nota-se que a realização do FISH ainda representa o método que possibilita o diagnóstico de certeza quanto ao LDH. Snurdel et al (2010)⁽²³⁾ propuseram critérios para realização de FISH nos pacientes portadores de linfoma de alto grau, enfocando a detecção de LDH. Para esse grupo de pesquisadores, os critérios seriam: linfomas de alto grau com envolvimento extranodal ou infiltração de SNC/medula óssea ou DHL elevada; pacientes adultos com morfologia de LB; neoplasias com morfologia de LB e imunoistoquímica não compatível (BCL2 positivo e/ou Ki-67 inferior a 95%); pacientes adultos com morfologia de LDGCB e Ki-67 acima de 80%; e pacientes com história prévia de linfoma folicular apresentando transformação para LDGCB⁽²³⁾. Entretanto, essas possibilidades ainda são constantemente discutíveis na literatura, não existindo uma definição pelas publicações, incluindo a classificação da OMS^(33,34,37).

No presente estudo, o padrão morfológico de “céu estrelado” em contexto de LDGCB, a positividade imunoistoquímica para MYC acima de 50% das células, e a positividade imunoistoquímica para BCL2 acima de 70% se mostraram possíveis parâmetros selecionadores de pacientes candidatos ao estudo citogenético, carecendo-se, porém, de novos estudos, com maior amostragem para análise mais apurada dessas associações.

Swerdlow (2014)⁽³⁴⁾ ressalta a importância da identificação de casos de linfomas de grandes células B de comportamento mais agressivo do que o visualizado nos LDGCB, principalmente em virtude da inexistência de um protocolo terapêutico específico⁽³⁴⁾. Tais neoplasias são fundamentalmente representadas pelos LDH ou LTH, cuja identificação deve ser realizada somente por métodos citogenéticos, e terão sua nomenclatura atualizada na próxima classificação da OMS de neoplasias hematológicas^(33,34). Neste contexto, há grande interesse nos estudos de concordância entre resultados imunoistoquímicos e citogenéticos para os marcadores MYC, BCL2 e BCL6, buscando-se elementos selecionadores para as triagens moleculares. De fato, observam-se, ainda, dificuldades relativas à padronização de critérios definidores de positividade para MYC e BCL2 nas reações de imunoistoquímica⁽³⁴⁾. De um modo geral, os pacientes portadores de duplas ou triplas translocações identificadas por FISH apresentam prognósticos piores em relação aos pacientes com duplas ou triplas positivities imunoistoquímicas, o que

nesse estudo foi sugerido pela proporção de óbitos entre os diferentes grupos diagnósticos^(34,36). O crescente número de artigos sobre o tema tem tornado o assunto cada vez mais complexo, ampliando os pontos a serem debatidos e padronizados, e fazendo relevantes as descrições desses casos^(33,34).

O presente estudo apresenta uma casuística brasileira de três pacientes portadores de LDH identificados por estudo citogenético entre 120 portadores de linfomas de alto grau. Apresentam-se possíveis caminhos para futuras investigações ampliadas de bons fatores selecionadores para os testes moleculares, que são de elevado custo e baixa disponibilidade, porém com importância fundamental no estabelecimento definitivo de seu diagnóstico, o que se torna muito relevante devido às dificuldades terapêuticas e ao prognóstico reservado desses indivíduos.

REFERÊNCIAS

- 1)Jaffe E, Harris NL, Stein H, Isaacson PG. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood*. 2008;112(12):4384-6.
- 2)Hasserjian RP, Ponz BO, Ott G, Elenitoba-Johnson SK, Leval L. Commentary on the WHO classification of tumors of lymphoid tissues (2008): “Gray zone” lymphomas overlapping with Burkitt lymphoma or classical Hodgkin lymphoma. *J Hematop*. 2009;2(2):89-95.
- 3)Harris NL, Campo E, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Swerdlow SH et al. Introduction to the WHO classification of tumors of haematopoietic na lymphoid tissues. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, SteinH et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and lymphoid tussues (Volume 2). 4thed. Lyon: IARC;2008. p.14-5.
- 4)Aukema SM, Siebert R, Schuuring E, Imhoff GW, Kluin-Nelemans HC, Boerma EJ et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood*. 2011; 17(8):2319-3.
- 5)Salaverria I, Siebert R. The Gray Zone Between Burkitt’s Lymphoma and Diffuse Large B-Cell Lymphoma From a Genetics Perspective. *J Clin Oncol*. 2011;11;29(14):1835-43.
- 6)Zhao XF. Pitfalls in diagnostic hematopathology: part II. *Int J Clin Exp Pathol*. 2009;3(1):39-46.
- 7)Jaffe ES. The WHO 2008 classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:523-31.
- 8)Nogai H, Dorken B, Lenz G. Pathogenesis of Non-Hodgkin’s Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2011;29(14):1803-11.
- 9)Stein H, Warnke RA, Chan WC, Jaffe ES. Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, SteinH et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and lymphoid tussues (Volume 2). 4thed. Lyon: IARC;2008. p.233-7.

- 10)Slack GW, Gascoyne RD. MYC and aggressive B cell Lymphomas. *Adv Anat Pathol*. 2011;18(3):219-28.
- 11)Leoncini L, Raphaël M, Stein H, Harris NL, Jaffe ES, Kluin PM. Burkitt Lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, SteinH et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and lymphoid tissues (Volume 2). 4thed. Lyon: IARC;2008. p.262-4.
- 12)Klumb CE. Biologia e Patogênese dos linfomas B na Infância: uma revisão. *Rev Bras Cancerol*. 2001;47(3): 291-301.
- 13)Ohno H, Fukuhara S. Significance of rearrangement of the BCL6 gene in B-cell lymphoid neoplasms. *Leuk Lymphoma*. 1997;27:53-63.
- 14)Zhang B, Calado DP, Pasqualucci L, Rajewsky K. An oncogenic role for alteranative NF- κ B signaling in DLBCL revealed upon deregulated BCL6 expression. *Cell reports*. 2015;11:715-26.
- 15)Weiss LM, Warnke RA, Sklar J, Cleary ML. Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N Engl J Med*. 1987;317:1185-89.
- 16)Anderson MA, Huang D, Roberts A. Targeting BCL2 for the treatment of lymphoid malignancies. *Semin Hematol*.2014;51:219-27.
- 17)Basso K, Dalla-Favera R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nature Rev Immunol*. 2015;15:172-84.
- 18)Campos E. New pathogenic mechanisms in Burkitt lymphoma. *Nat Genet*. 2012;44:1288-9.
- 19)Kluin PM, Harris NL, Stein H, Leoncini L, Raphaël M, Campo E et al. B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, SteinH et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and lymphoid tissues (Volume 2). 4thed. Lyon: IARC;2008. p.265-6.
- 20)Mahadevan D, Fisher RI. Novel Therapeutics for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *J. Clin. Oncol*. 2011;29(14):1876-84.

- 21)Perry AM, Alvarado-Bernal Y, Laurini JA, Smith LM, Slack GW, Tan KL et al. MYC and BCL2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *Br J Hematol.* 2014;165:382-91.
- 22)Tanaka H; Hashimoto S; Abe D, Sakai S, Takagi T. Double-hit Lymphoma at second relapse of Burkitt-like Lymphoma: a case report. *J Clin Exp Hematop.* 2011;51(1):43-47.
- 23)Snuderl M, Kolman OK, Chen YB, Hsu JJ, Ackerman AM, Dal Cin P et al. B-cell Lymphomas with Concurrent IGH-BCL2 and MYC Rearrangements Are Aggressive Neoplasms with Clinical and Pathologic Features Distinct from Burkitt Lymphoma and Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2010;34(3):327–340.
- 24)Kramer MH, Hermans J, Wijburg E, Philippon K, Geelen E, van Krieken JH, et al. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 1998;92(9):3151-62.
- 25)Li S, Lin P, Young KH, Kanagal-Shamanna R, Yin CC, Medeiros LJ. *MYC/BCL2* Double-Hit high-grade B-cell lymphoma. *Adv Anat Pathol.*2013;20:315-26.
- 26)Smith SM, Anastasi J, Cohen KS, Godley LA. The impact of MYC expression in lymphoma biology: beyond Burkitt lymphoma. *Blood Cells Mol Dis.* 2010;15;45(4):317–323.
- 27)Landsburg DJ, Nasta SD, Svoboda J, Morrisette JJD, Schuster SJ. Double-hit cytogenetic status may not be predicted by baseline clinicopathological characteristics and is highly associated with overall survival in B cell lymphoma patients. *Br J Hematol.* 2014;166:169-74.
- 28)Friedberg WJ. Double Hit diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2012;30(28):3439-43.
- 29)Zhang XM, Aguilera N. New immunohistochemical for B-cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. *Arch Pathol Lab Med.*2014;138(12):1666-72.
- 30)Ventura RA, Martin-Subero JI, Jone M, McParland J, Gesk S, Mason DY et al. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *JMD.* 2006;8(2):141-151.

- 31)Aukema SM, Kreuz M, Kohler CW, Rosolowski M, Hasenclever D, Hummel M et al. Biological characterization of adult MYC-translocation-positive mature B-cell lymphomas other than molecular Burkitt lymphoma. *Haematologica*.2014;99(4):726-35.
- 32)Oki Y, Noorani M, Lin P, Davis RE, Neelapu SS, Ma Long et al. Double-hit lymphoma: the MD Anderson Cancer Center clinical experience. *Br J Hematol*.2014;166:891-901.
- 33)Swerdlow SH. Update on the WHO classification of malignant lymphomas. *Pathology*. 2014;46(S2):06.
- 34)Swerdlow SH. Diagnosis of 'double-hit' diffuse large B-cell lymphoma and B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and Burkitt lymphoma: when and how, FISH versus IHC. *Hematology Am soc Hematol Educ Program*. 2014;5(1):90-9.
- 35)Green TM, Young KH, Visco C, Xu-Monette ZY, Orazi A, Go RS et al. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone. *J Clin Oncol*. 2012;30:3460-67.
- 36)Yan L-X, Liu Y-H, Luo D-L, Zhang F, Cheng Y, Luo X-L et al. MYC expression in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in Chinese patients with diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. *PloS On*.2014;9(8):e104068.
- 37)Mahmoud AZ, George TI, Czuchlewski DR, Zhang QY,Wilson CS, Sever CE et al. Scoring of MYC protein expression in diffuse large B-cell lymphomas: concordance rate among hematopathologists. *Mod Pathol*.2015;28(4):545-51.
- 38)Mation-Kalaw E, Tan LHC, Tay K, Lim ST, Tang T, lee YYL et al. Does the proliferation fraction help identify mature B cell lymphomas with double- and triple-hit translocations? *Histopathology*.2012;61:1214-18.

Conclusão

CONCLUSÃO

O estudo corroborou com a literatura demonstrando que, na casuística avaliada, o LDH é uma entidade rara e biologicamente agressiva. Este contexto, aliado a ausência de protocolos terapêuticos definidos, qualifica a relevância das pesquisas para sua descrição epidemiológica, clínica, morfológica, imunofenotípica e citogenética. O presente estudo desbrava uma fronteira científica ao pesquisar parâmetros possivelmente associados à detecção citogenética da translocação do gene *MYC*, especificamente no Brasil, onde a realização de técnicas moleculares é restrita a pouquíssimos centros diagnósticos.

MYC e *BCL2*, com destaque maior a esse último, podem ser avaliados por imunoistoquímica considerando como critério de positividade o percentual de células coradas acima de 50% e acima de 70%, respectivamente. Contudo, essa análise deve ser cautelosa, uma vez que ainda não há consenso quanto a melhor forma de interpretá-los e seus níveis de concordância ainda são regulares. Ainda assim, a utilização desses marcadores imunofenotípicos pode representar possíveis triadores de pacientes candidatos a realização de estudo citogenético por FISH.

O índice de proliferação celular acima de 90% e o perfil não-centro germinativo determinado pelo algoritmo de Hans não se mostraram bons parâmetros de triagem de pacientes para estudos moleculares. Contudo, o padrão morfológico “céu estrelado” destacou-se por sua associação estatisticamente significativa com a detecção da translocação envolvendo o gene *MYC* pelo FISH, sendo um bom parâmetro de avaliação, associado aos demais aspectos do paciente.

A atual entidade provisória LBI/LDGCB/LB engloba casos de LDH e casos de pacientes com incongruências morfológicas/imunofenotípicas. No presente estudo, os três casos de LDH pertencem a essa categoria, contudo cinco pacientes que poderia ser classificados como LBI/LDGCB/LB não eram LDH. Esse contexto favorece a necessidade de revisão dessa entidade, agrupando os LDH como uma subclassificação específica, definida exclusivamente por método citogenético, e que apresenta comportamento clínico mais agressivo em relação a outros linfomas de alto grau. Assim, esses pacientes com discrepâncias morfo/imunofenotípicas comporiam subgrupos do LDGCB, contudo mais estudos são fundamentais para correta avaliação prognóstica desses pacientes.

Este estudo confirmou a raridade epidemiológica e a agressividade biológica do LDH. Salienta-se, contudo, que as principais interferências na prática diagnóstica são a inclusão do padrão “céu estrelado” e a positividade imunoistoquímica de MYC e BCL2 como ferramentas de rastreamento de pacientes em que a pesquisa citogenética pode trazer contribuições prognósticas relevantes.

Os dados apresentados reforçam a necessidade da ampliação das investigações sobre LDH e sobre a importância do gene *MYC* na patologia dos linfomas de alto grau. Confirma-se, também, a necessidade de aprofundar a detecção de bons parâmetros indicadores da necessidade da realização de testes moleculares, os quais apresentam custo elevado e acessibilidade restrita, sobretudo nos países menos desenvolvidos.