



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

CHANDRA CHIAPPIN CARDOSO

**NEOPLASIAS DE CÉLULAS LINFOIDES MADURAS B:
AVALIAÇÃO DOS CASOS DIAGNOSTICADOS E
ACOMPANHADOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
ENTRE 2011 E 2014**

FLORIANÓPOLIS
2015

CHANDRA CHIAPPIN CARDOSO

**NEOPLASIAS DE CÉLULAS LINFOIDES MADURAS B:
AVALIAÇÃO DOS CASOS DIAGNOSTICADOS E
ACOMPANHADOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
ENTRE 2011 E 2014**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Farmácia, Área de Concentração Análises Clínicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria
Claudia Santos da Silva

FLORIANÓPOLIS
2015

AGRADECIMENTOS

À Professora Maria Claudia Santos da Silva pela notável orientação deste trabalho e principalmente por todos os ensinamentos, que além de científicos foram ensinamentos de caráter, dedicação e profissionalismo.

À Professora Ana Carolina Rabello de Moraes do Departamento de Análises Clínicas da UFSC pelo auxílio com as análises estatísticas e pelas constantes trocas científicas.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar esta dissertação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC e demais órgãos.

Aos colegas do Laboratório de Oncologia Experimental e Hematologia (LOEH), em especial à Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira e à Mariangeles Auat.

Aos colegas da Divisão de Análises Clínicas do Hospital Universitário da UFSC, em especial às bioquímicas do setor de Onco-hematologia Íris Mattos Santos, Camila Matiollo e Christiane Coelho, com quem divido o dia a dia com imenso prazer.

Aos colegas do Serviço de Hematologia do Hospital Universitário da UFSC, em especial à médica hematologista Joanita Ângela Gonzaga Del Moral, que foi fundamental no presente estudo e por quem tenho especial admiração.

Aos funcionários do Serviço de Agendamento Médico e Estatística do Hospital Universitário da UFSC.

Aos ex-colegas, mas eternos amigos do laboratório de Neurobiologia da Depressão do Departamento de Bioquímica: Professora Manuella Pinto Kaster, Kelly Ribas Lobato, Ricardo Wabner Binfaré e Professora Patrícia de Souza Brocardo, que além da preciosa amizade, são maravilhosos exemplos e sempre me incentivam em relação à pesquisa científica.

À minha família, aos meus queridos amigos e ao meu namorado. Obrigada por tornarem possível a realização dos meus sonhos e por vibrarem pelas minhas conquistas. Toda a minha gratidão ao meu pai, Fernando Luzzi Cardoso, à minha mãe, Nádia Regina Chiappin Cardoso, e à minha avó, Ivanir Anna Chiappin, pelo carinho, incentivo e apoio. Vocês são incríveis!

Em certo sentido, a doença só passa a existir quando decidimos de comum acordo que ela existe – percebendo-a, dando-lhe nome e respondendo a ela.

C. E. Rosenberg

RESUMO

De acordo com a classificação da OMS (2008), as neoplasias de células maduras B (NCLM-B) abrangem os linfomas de células B (LCB) e as neoplasias de células plasmocitárias (NCP). O diagnóstico das NCLM-B é baseado nos exames morfológicos, fenotípicos e genéticos, associados aos dados clínicos do paciente. No entanto, mesmo com essas ferramentas diagnósticas, em alguns casos não é possível definir o subtipo de NCLM-B. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os casos de NCLM-B diagnosticados entre 2011 e 2014 e acompanhados no HU-UFSC a fim de traçar o perfil desses pacientes. Foram incluídos no estudo 93 pacientes adultos portadores de NCLM-B. Os subtipos mieloma múltiplo (MM), leucemia linfocítica crônica de células B (LLC/LLP), linfoma difuso de grandes células B (LDGCB), linfoma folicular (LF) e linfoma de Burkitt (LB) foram os mais frequentes, representando 23,7%, 15,1%, 12,9%, 11,8% e 7,5% dos casos, respectivamente. A idade mediana dos pacientes no momento do diagnóstico foi de 58 anos, com uma relação entre os gêneros masculino e feminino de 1,3:1. Foi observada diferença significativa entre os subtipos de LCB em relação aos parâmetros idade, atividade da LDH e expressão de Ki-67. De acordo com os índices prognósticos, observou-se que a maioria dos pacientes portadores de MM foi estratificada como de alto risco, enquanto que a maioria dos portadores de LLC/LLP foi estratificada como de baixo risco. Os pacientes portadores de LB foram os que apresentaram maiores índices de recidiva/progressão. Para todos os pacientes, a frequência de óbito durante o período de estudo foi de 31,2% e a média de sobrevida global (SG) foi de 27,6 meses. Foi observada diferença significativa entre os tempos de SG dos pacientes portadores de LB daqueles com LLC/LLP, LF e LDGCB. A concordância entre os exames de imunofenotipagem (IMF) e de imuno-histoquímica foi de 100%, 47,5%, 93,2%, 71,7% e 46,9%, para os subtipos MM, LLC/LLP, LDGCB, LF e LB, respectivamente. Em relação à expressão fenotípica, para auxílio diagnóstico, destaca-se a expressão dos marcadores CD200, CD81 e CD62L nas células de LLC/LLP; CD10, CD43 e CD81 nas células de LB; CD10 e CD95 nas células de LF; e CD39 nas células de LDGCB. Em conclusão, o perfil dos pacientes diagnosticados com NCLM-B no HU-UFSC é semelhante àquele observado na literatura e a IMF se mostrou uma excelente ferramenta diagnóstica, concordante com a IHQ.

Palavras-chaves: neoplasias de células maduras B; imunofenotipagem; imuno-histoquímica; prognóstico.

ABSTRACT

Mature B cell neoplasms: evaluation of cases diagnosed and monitored at the University Hospital of the Federal University of Santa Catarina between 2011 and 2014.

According to the World Health Organization (WHO) classification (2008), mature B-cell neoplasms (MBCN) are a heterogeneous group of diseases that comprises B-cell lymphomas (BCL) and plasma cell disorders (PCD). MBCN current diagnosis is usually based on a combination of morphology, immunophenotype, recurrent cytogenetic aberration and clinical features. However, even with these diagnostic tools, in some cases aberrant and overlapping phenotypes often can make the definitive diagnosis difficult. In this view, the aim of this study was to assess the profile of patients diagnosed with MBCN and monitored at the University Hospital of UFSC between 2011 and 2014. The study included 93 adult patients with MBCN diagnosis. The most frequent subtypes were multiple myeloma (MM), chronic lymphocytic leukemia (CLL), diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), follicular lymphoma (FL), and Burkitt lymphoma (BL), representing 23.7%, 15.1%, 12.9%, 11.8%, and 7.5% of the cases, respectively. The median age at diagnosis was 58 years with a male-to-female ratio of 1.3:1. There were statistical differences in terms of age at diagnosis, LDH levels and Ki-67 expression among BCL subtypes. According to the prognostic indexes, it was observed that the majority of MM patients was stratified as high risk, while the majority of CLL patients was classified as low risk. LB patients showed the highest rates of recurrence/progression. Regarding all patients, the incidence of death during the study period was 31.2% and the average overall survival (OS) was 27.6 months. Statistical differences were found in terms of OS between BL and CLL, BL and FL, and BL and DLBCL. The concordance between immunophenotypic and immunohistochemical methods were 100%, 47.5%, 93.2%, 71.7% e 46.9%, for MM, CLL, DLBCL, FL, and BL, respectively. Regarding phenotypic expression, the expression of CD200, CD81 and CD62L markers by CLL cells; CD10, CD43 and CD81 by BL cells; CD10 and CD95 by FL cells; and CD39 by DLBCL cells, were considered as relevant in order to assist diagnosis. In conclusion, the profile of MBCN patients diagnosed and monitored at our Institution is similar to that observed in the literature, besides, immunophenotyping showed good concordance with immunohistochemistry. **Keywords:** mature B-cell neoplasms; immunophenotyping; immunohistochemistry; prognosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma da classificação das neoplasias de células linfoides de acordo com a classificação da OMS de 2008	19
Figura 2 – Frequências estimadas de câncer para os gêneros masculino (A) e feminino (B).....	23
Figura 3 – Origem das neoplasias de células linfoides maduras B	27
Figura 4 – Representação esquemática do funcionamento do citômetro de fluxo.....	32
Figura 5 – <i>Dot plots</i> ilustrativos que mostram a clonalidade das células linfoides B maduras e das células plasmocitárias.....	34
Figura 6 – Cortes histológicos de amostra de gânglio linfático comprometido por linfoma folicular analisado pela técnica de imunohistoquímica	38
Figura 7 – Número de pacientes conforme critérios de inclusão e exclusão.....	56
Figura 8 – Idade no momento do diagnóstico dos pacientes portadores de NCLM-B	58
Figura 9 – Estratificação prognóstica dos pacientes portadores dos subtipos mais frequentes de NCLM-B.	70
Figura 10 – Distribuição dos pacientes de acordo com a resposta ao tratamento completa/parcial ou recidiva/progressão	71
Figura 11 – Curva de sobrevida global dos pacientes diagnosticados com NCLM-B (n = 93).....	72
Figura 12 – Curva de sobrevida global dos pacientes diagnosticados com as NCLM-B mais frequentes separadas por subtipo.....	73
Figura 13 – Beta-2-microglobulina sérica e de membrana dos oito casos de mieloma múltiplo diagnosticados com o painel de oito cores.....	78
Figura 14 – Histogramas da expressão de 14 parâmetros nas células plasmocitárias neoplásicas dos pacientes diagnosticados com mieloma múltiplo, utilizando-se o painel de oito cores (n = 6).....	80
Figura 15 – Histogramas da expressão de 27 parâmetros nas células neoplásicas dos pacientes diagnosticados com leucemia linfocítica crônica de células B/linfoma linfocítico de pequenas células, utilizando-se o painel de oito cores (n = 5)	81
Figura 16 – Histogramas da expressão de 27 parâmetros nas células neoplásicas dos pacientes diagnosticados com linfoma difuso de grandes células B, utilizando-se o painel de oito cores (n = 4).....	82

Figura 17 – Histogramas da expressão de 27 parâmetros nas células neoplásicas dos pacientes diagnosticados com linfoma folicular, utilizando-se o painel de oito cores (n = 4).....	83
Figura 18 – Histogramas da expressão de 27 parâmetros nas células neoplásicas dos pacientes diagnosticados com linfoma de Burkitt, utilizando-se o painel de oito cores (n = 3).....	84
Figura 19 – Histogramas sobrepostos da expressão de 27 parâmetros nas células neoplásicas dos pacientes diagnosticados com linfoma difuso de grandes células B (vermelho), linfoma folicular (azul) e linfoma de Burkitt (preto), utilizando-se o painel de oito cores.....	85
Figura 20 – Principais marcadores presentes no painel de oito cores que apresentaram diferenças de expressão entre os pacientes diagnosticados com linfoma difuso de grandes células B (vermelho), linfoma folicular (azul) e linfoma de Burkitt (preto).	86

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação de tumores dos tecidos hematopoiético e linfoide da OMS de 2008	21
Quadro 2 – Painel de triagem de células linfoides do consórcio Euroflow	35
Quadro 3 – Painel doenças linfoproliferativas de células B do consórcio Euroflow.....	36
Quadro 4 – Painel neoplasias de células plasmocitárias do consórcio Euroflow.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sistema de estadiamento Ann Arbor.....	40
Tabela 2 – Sistema de estadiamento IPI.....	41
Tabela 3 – Sistema de estadiamento FLIPI.....	42
Tabela 4 – Sistema de estadiamento ISS.....	43
Tabela 5 – Sistema de estadiamento Rai.....	44
Tabela 6 – Sistema de estadiamento Binet.....	44
Tabela 7 – Distribuição dos pacientes de acordo com o subtipo de NCLM-B.....	57
Tabela 8 – Características gerais dos pacientes portadores de NCLM-B.....	59
Tabela 9 – Distribuição dos pacientes soropositivos para HIV, HBV e HCV conforme subtipo de NCLM-B.....	61
Tabela 10 – Idade, gênero, atividade de LDH e concentração de hemoglobina dos pacientes portadores de linfoma de células B.....	63
Tabela 11 – Apresentação de sintomas B, de linfonodomegalia, de esplenomegalia e de doença <i>bulky</i> no momento do diagnóstico de acordo com os subtipos de linfomas de células B.....	64
Tabela 12 – Distribuição dos subtipos de linfomas de células B de acordo com a presença de infiltração de medula óssea no momento do diagnóstico.....	65
Tabela 13 – Distribuição dos subtipos de linfomas de células B de acordo com a presença de infiltração de sistema nervoso central no momento do diagnóstico.....	65
Tabela 14 – Porcentagem de expressão de Ki-67 pelas células neoplásicas dos pacientes portadores de linfoma de células B.....	66
Tabela 15 – Expressão dos antígenos CD10 e CD5 entre os casos de LDGCB.....	67
Tabela 16 – Distribuição dos subtipos de neoplasias de células plasmocitárias de acordo com a idade e o gênero dos pacientes.....	67
Tabela 17 – Características laboratoriais dos pacientes portadores de neoplasias de células plasmocitárias.....	68
Tabela 18 – Média de sobrevida global dos subtipos mais frequentes de NCLM-B.....	74
Tabela 19 – Graus de concordância entre os exames de imunofenotipagem e de imuno-histoquímica para os subtipos mais frequentes de NCLM-B.....	74

Tabela 20 – Perfil de expressão de marcadores nas células neoplásicas dos vinte pacientes portadores dos subtipos mais frequentes de linfoma de células B diagnosticados com o painel de oito cores do grupo Euroflow “doenças linfoproliferativas de células B”	76
Tabela 21 – Distribuição dos oito casos de mieloma múltiplo diagnosticados com o painel de oito cores do grupo Euroflow “neoplasias de células plasmocitárias” em relação ao perfil de expressão de marcadores nas células plasmocitárias	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALB	albumina sérica
anti-HBS	anticorpo contra o HBV
APC	alofococianina (do inglês <i>allophycocyanin</i>)
APCCy7	alofococianina cianina 7 (do inglês <i>allophycocyanin with cyanin-7</i>)
ATP	adenosina trifosfato
BCR	receptor de células B
B2M	beta-2 microglobulina
CD	do inglês <i>clusters of differentiation</i>
CEPSH	comitê de ética em pesquisa com seres humanos
CG	centro germinativo
CHOP	ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona
CODOX- M/IVAC	ciclofosfamida, vincristina, doxorrubicina e altas doses de metotrexato alternadas com ifosfamida, etoposide e altas doses de citarabina, seguidas de metotrexato e citarabina intratecal
CRAB	cálcio, falha renal, anemia e leões em ossos (do inglês <i>calcium, renal failure, anemia, bone lesions</i>)
cyIgκ	cadeia leve kappa de citoplasma
cyIgλ	cadeia leve lambda de citoplasma
DACL-HU	Divisão de Análises Clínicas do HU/UFSC
DNA	ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DP	desvio padrão
EBV	vírus Epstein-Barr (do inglês <i>Epstein-Barr virus</i>)
ECOG	do inglês <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EPOCH	etoposide, prednisona, vincristina, ciclofosfamida e doxorrubicina
FISH	hibridização fluorescente <i>in situ</i> (do inglês <i>fluorescence in situ hybridization</i>)
FITC	fluoresceína (do inglês <i>fluorescein isothiocyanate</i>)
FLIPI	do inglês <i>follicular lymphoma international prognostic index</i>
FSC	do inglês <i>forward scatter</i>
HAART	terapia antirretroviral altamente ativa (do inglês <i>highlyactive antiretroviral therapy</i>)
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HBV	vírus da hepatite B (do inglês <i>hepatitis B virus</i>)
HCV	vírus da hepatite C (do inglês <i>hepatitis C virus</i>)

HIV	vírus da imunodeficiência humana (do inglês <i>human immunodeficiency virus</i>)
HHV8	herpes vírus humano-8 (do inglês <i>human herpesvirus-8</i>)
HLDA	antígenos de diferenciação leucocitários humanos (do inglês <i>human leukocyte differentiation antigens</i>)
HMRN	do inglês <i>haematological malignancy research network</i>
HS	hipermutação somática
HTLV-I	vírus T-linfotrópico humano (do inglês <i>human T-lymphotropic virus</i>)
HU-UFSC	Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina
HyperCVAD	ciclofosfamida, vincristina, doxorrubicina e dexametasona, alternados com ciclos de metotrexato e citarabina
IFM	intensidade de fluorescência média
Igκ	cadeia leve de Ig do tipo kappa
Igλ	cadeia leve de Ig do tipo lambda
IgV	região variável da cadeia leve
IHQ	imuno-histoquímica
IMF	imunofenotipagem por citometria de fluxo
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPI	do inglês <i>international prognostic index</i>
ISS	do inglês <i>international staging system</i>
LB	linfoma de Burkitt
LCB	linfomas de células B
LCBAI	linfomas de células B com aspectos intermediários
LCB NE	linfomas de células B não especificado
LCM	linfoma de células do manto
LCP	leucemia de células plasmocitárias
LDGCB	linfoma difuso de grandes células B
LDH	lactato desidrogenase
LF	linfoma folicular
LH	linfoma de Hodgkin
Linfoma	linfoma da zona marginal extranodal de tecido linfoide
MALT	associado à mucosa
LLC/LLP	Leucemia linfocítica crônica de células B/linfoma linfocítico de pequenas células
LLP/MW	linfoma linfoplasmacítico/macroglobulinemia de Waldenström
LOEH	laboratório de oncologia experimental e hemopatias
LNH	linfomas não-Hodgkin

LZM	linfoma da zona marginal
LZME	linfoma da zona marginal esplênica
LZMN	linfoma da zona marginal nodal
M	gênero masculino
M/F	relação entre os gêneros masculino e feminino
MGUS	gamopatia monoclonal de significado indeterminado (do inglês <i>monoclonal gammopathy of undetermined significance</i>)
MHC-I	complexo principal de histocompatibilidade de classe I (do inglês <i>major histocompatibility complex class I</i>)
MIPI	do inglês <i>mantle cell lymphoma international prognostic index</i>
MM	mieloma múltiplo
MO	medula óssea
NA	não avaliado
NCLM-B	neoplasias de células linfoides maduras B
NCP	neoplasias de células plasmocitárias
NE	não especificado
NI	não informado
NK	do inglês <i>natural killer</i>
NR	não realizado
OMS	Organização Mundial da Saúde
PacB	do inglês <i>pacific blue</i>
PacO	do inglês <i>pacific Orange</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)
PC5	ficoeritrina-cianina
PE	ficoeritrina (do inglês <i>phycoerythrin</i>)
PECy7	ficoeritrina-cianina 7 (do inglês <i>phycoerythrin with cyanin-7</i>)
R-CHOP	rituximabe, ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona
R-CVP	rituximabe, ciclofosfamida, vincristina e prednisona
R-DA-EPOCH	dose ajustada, etoposide, prednisona, vincristina, ciclofosfamida e doxorrubicina, com inserção do rituximabe
R-DHAP	rituximabe, dexametasona, altas doses de citarabina e cisplatina
R-HyperCVAD	ciclofosfamida, vincristina, doxorrubicina e dexametasona, alternados com ciclos de metotrexato e citarabina, com inserção do rituximabe

R-ICE	rituximabe, ifosfamida, carboplatina e etoposide
RTC	recombinação de troca de classe
SAME	serviço de agendamento médico e estatística
SEER	do inglês <i>surveillance epidemiology and end results</i>
SG	sobrevida global
sIgM	IgM de superfície
SLP	sobrevida livre de progressão
SNC	sistema nervoso central
SSC	do inglês <i>side scatter</i>
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TMO	transplante de medula óssea
U.A.	unidades arbitrárias
VHS	velocidade de hemossedimentação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	CLASSIFICAÇÃO DAS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS.....	19
2.2	NEOPLASIAS DE CÉLULAS LINFOIDES MADURAS B ..	20
2.3	EPIDEMIOLOGIA.....	22
2.4	ORIGEM	24
2.5	FATORES DE RISCO	28
2.6	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	29
2.7	PROGNÓSTICO	39
2.7.1	Índices prognósticos	39
2.7.2	Marcadores prognósticos celulares.....	44
2.8	ASPECTOS TERAPÊUTICOS.....	46
2.8.1	Mieloma múltiplo	46
2.8.2	Leucemia linfocítica crônica de células B/linfoma linfocítico de pequenas células.....	47
2.8.3	Linfoma difuso de grandes células B	47
2.8.4	Linfoma folicular	48
2.8.5	Linfoma de Burkitt	48
3	JUSTIFICATIVA	50
4	OBJETIVOS	51
4.1	OBJETIVO GERAL.....	51
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
5	CASUÍSTICA E MÉTODOS	52
5.1	ASPECTOS ÉTICOS	52
5.2	DESCRIÇÃO DO ESTUDO	52
5.3	LOCAL E POPULAÇÃO DE ESTUDO	52
5.4	PROCEDIMENTOS.....	52
5.5	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	53
5.6	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	53
5.7	PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO	53
5.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	55
6	RESULTADOS	56

6.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	56
6.2	LINFOMAS DE CÉLULAS B.....	61
6.3	NEOPLASIAS DE CÉLULAS PLASMOCITÁRIAS.....	67
6.4	AVALIAÇÃO DOS SUBTIPOS MAIS FREQUENTES DE NCLM-B.....	69
6.5	PERFIL DE EXPRESSÃO DOS MARCADORES FENOTÍPICOS DOS SUBTIPOS MAIS FREQUENTES DE NCLM-B.....	75
7	DISCUSSÃO.....	87
8	CONCLUSÃO.....	105
9	PERSPECTIVAS.....	107
	REFERÊNCIAS.....	109
	APÊNDICES.....	129
	ANEXOS.....	143

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, estima-se que mais de 12 milhões de novos casos de câncer sejam diagnosticados por ano no mundo, ocorrendo mais de sete milhões de mortes em decorrência dessa doença. Nos países em desenvolvimento, o aumento do número de casos de neoplasias se relaciona, entre outros fatores, ao aumento da expectativa de vida da população e também ao estilo de vida adotado, o que inclui aspectos relacionados ao tabagismo, à alimentação e à prática de atividade física (JEMAL et al., 2011).

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima para o ano de 2015, em Santa Catarina, a taxa de 472,17 e 307,22 casos de câncer para cada 100 mil homens e mulheres, respectivamente (INCA, 2014). Além disso, o INCA acrescenta que, em âmbito nacional, os gastos do Ministério da Saúde com o atendimento desses pacientes cresceram 20% entre os anos de 2000 e 2007, atingindo R\$ 1,4 bilhão.

As neoplasias de células linfoides maduras B (NCLM-B) são umas das poucas neoplasias com taxas de incidência crescentes para ambos os gêneros na Europa e nos Estados Unidos desde a década de 1970, embora exista uma redução desse crescimento nos últimos anos. A mortalidade em decorrência dessas neoplasias na maioria dos países europeus aumentou até a metade da década de 1990, começando a declinar entre 2000 e 2004. No Brasil, Luz e Matos (2011) também observaram essa tendência em um estudo que avaliou as taxas de mortalidade por linfomas não-Hodgkin de 1980 a 2007 (LUZ & MATTOS, 2011). No entanto, estudos que apresentem dados de anos mais recentes são necessários.

Desde que o Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC) se tornou referência no Estado de Santa Catarina para o diagnóstico e o tratamento de neoplasias hematológicas (Portarias GM/MS n.º 2.439 de 08/12/05 e SAS n.º 741 de 19/12/05), o número de casos atendidos pelo Serviço de Hematologia tem aumentado de forma considerável. Entre eles, os mais frequentes são os casos de NCLM-B, superando os casos de leucemias. Sendo assim, o Serviço de Hematologia do HU-UFSC sente a necessidade de uma revisão dos casos diagnosticados e acompanhados na Instituição, pois se entende que, para que haja um melhor planejamento do serviço prestado, é importante que se conheça o perfil dos pacientes atendidos.

Diversos estudos têm avaliado o perfil dos pacientes em instituições de saúde e o comparam com os dados nacionais e internacionais (TEMMIM et al., 2004; LUZ & MATTOS, 2011;

OLUWASOLA et al., 2011; CASTILLO et al., 2013; COSTA et al., 2013; GENG et al., 2013; MONDAL et al., 2014; JUNLÉN et al., 2015). Esses estudos, em geral, visam responder a alguns questionamentos, tais como: Qual seria a frequência dos subtipos de NCLM-B na Instituição? A apresentação clínica e/ou as características das células neoplásicas desses subtipos seriam relacionadas a uma melhor ou pior resposta ao tratamento? Quais subtipos dessas neoplasias estão mais relacionados à infecção pelo HIV e/ou outros fatores de risco? Esses pacientes apresentam um curso clínico mais agressivo? Seria possível, no momento do diagnóstico, prever o prognóstico pela detecção de determinados marcadores fenotípicos nas células neoplásicas e, assim, direcionar o tratamento?

O que motivou a realização do presente estudo foi, além das elevadas taxas de incidência das NCLM-B na Instituição quando comparadas a outras neoplasias hematológicas, a constatação da heterogeneidade entre os diferentes subtipos das NCLM-B, não só no momento do diagnóstico, mas também no seguimento dos pacientes; as diversas formas de apresentação da neoplasia, de relação com fatores de risco e de resposta aos protocolos de tratamento.

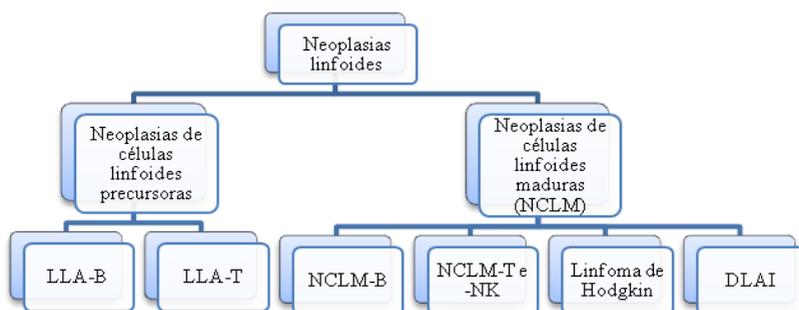
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CLASSIFICAÇÃO DAS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

A classificação das neoplasias dos tecidos hematopoiético e linfóide da Organização Mundial da Saúde (OMS) (SWERDLOW, 2008), publicada em 2001 e atualizada em 2008, representa o consenso mundial no diagnóstico desses tipos de neoplasias (CAMPO et al., 2011). A atualização dessa classificação está prevista para ser publicada eletronicamente no ano de 2015 e o livro impresso no ano de 2016. O princípio fundamental da classificação é o reconhecimento de diferentes entidades de acordo com a combinação de diversos parâmetros, tais como morfologia, fenótipo, anormalidades genéticas e características clínicas (CAMPO et al., 2011). Assim, quanto mais achados fenotípicos e moleculares novos são relatados, mais subtipos dessas neoplasias são definidos.

De forma geral, as neoplasias hematológicas são classificadas de acordo com a origem das células neoplásicas em linhagem mieloide, linfóide e histiocítica/dendrítica. As neoplasias linfóides são então classificadas como originadas de células precursoras ou de células maduras e, posteriormente, as derivadas de células linfóides maduras em B, T ou *natural killer* (NK). Apesar de o linfoma de Hodgkin (LH) ter origem de células B (GOBBI et al., 2013), na classificação da OMS é considerado um grupo à parte (BÖTTCHER et al., 2010) (Figura 1).

Figura 1 – Fluxograma da classificação das neoplasias de células linfóides de acordo com a classificação da OMS de 2008



Fonte: Adaptado de: SWERDLOW, 2008.

Nota: OMS: Organização Mundial da Saúde; LLA-B e -T: leucemia linfoblástica aguda de células B e de células T; DLAI: doenças linfoproliferativas associadas à imunodeficiência.

2.2 NEOPLASIAS DE CÉLULAS LINFOIDES MADURAS B

De acordo com a classificação da OMS de 2008, as NCLM-B abrangem os linfomas de células B (LCB) e as neoplasias de células plasmocitárias (NCP) (SWERDLOW, 2008) (Quadro 1). A classificação das NCLM-B é de grande importância para a definição do tratamento a ser aplicado a cada paciente, uma vez que essas neoplasias apresentam diferentes apresentações clínicas que variam de extremamente agressivas a indolentes (KUPPERS, 2005).

Essa classificação distingue mais de 30 entidades de NCLM-B. Algumas dessas entidades têm caráter provisório (tricoleucemia variante), outras são extremamente raras (doenças de cadeia pesada), além de outras serem definidas por características clínicas (linfoma de grandes células B originado de Doença de Castleman multicêntrica associada ao herpes-vírus humano-8). Foram também criadas entidades que representam neoplasias de caráter intermediário entre duas outras neoplasias, como o LCB, inclassificável, com aspectos intermediários entre linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) e linfoma de Burkitt (LB), e aquelas associadas a um tecido ou uma localização anatômica em particular (LDGCB primário cutâneo, tipo da perna) (BÖTTCHER et al., 2010).

Quadro 1 – Classificação de tumores dos tecidos hematopoiético e linfóide da OMS de 2008

Neoplasias de células linfóides maduras B
Leucemia linfocítica crônica de células B/linfoma linfocítico de pequenas células (LLC/LLP)
Leucemia prolinfocítica B
Linfoma da zona marginal esplênica
Tricoleucemia
<i>Linfoma esplênico de células B, inclassificável</i> <i>Linfoma esplênico difuso da polpa vermelha, de linfócitos B pequenos</i> <i>Tricoleucemia variante</i>
Linfoma linfoplasmacítico Macroglobulinemia de Waldenström
Doenças de cadeia pesada
Neoplasias de células plasmocitárias Gamopatia monoclonal de significado indeterminado (do inglês, MGUS) Mieloma múltiplo Plasmocitoma solitário do osso Plasmocitoma extraósseo Doenças de deposição de imunoglobulinas monoclonais
Linfoma da zona marginal extranodal de tecido linfóide associado à mucosa (MALT)
Linfoma da zona marginal nodal
Linfoma folicular
Linfoma centrofolicular primário da pele
Linfoma de células do manto
Linfoma difuso de grandes células B (LDGCB), não especificado LDGCB rico em células T e histiócitos LDGCB do sistema nervoso central <i>LDGCB da pele, tipo “da perna”</i> <i>LDGCB EBV-positivo do idoso</i> <i>LDGCB associado à inflamação crônica</i>
Granulomatose linfomatoide
Linfoma de grandes células B do mediastino (tímico)
Linfoma de grandes células B intravascular
Linfoma de grandes células B ALK-positivo
Linfoma plasmablastico
<i>Linfoma de grandes células B com origem na Doença de Castleman multicêntrica associada ao HHV8</i>
Linfoma primário de efusões
Linfoma de Burkitt
<i>LCB, inclassificável, com aspectos intermediários entre LDGCB e Linfoma de Burkitt</i>
<i>LCB, inclassificável, com aspectos intermediários entre LDGCB e Linfoma clássico de Hodgkin</i>

Fonte: SWERDLOW, 2008.

Nota: Texto em itálico: novas entidades incluídas na atualização de 2008. OMS: Organização Mundial da Saúde.

Em 1832, o médico inglês Thomas Hodgkin foi o primeiro a relatar uma série de casos de pacientes portadores de uma doença (HODGKIN, 1832) que, posteriormente, foi reconhecida como LH. Histologicamente, essa neoplasia apresenta características inflamatórias e a presença de 0,1% a 2% de um infiltrado neoplásico, o qual é composto de células grandes denominadas células de Reed-Sternberg (STEIN, 2008; SWERDLOW et al., 2008; KÜPPERS et al., 2012). A partir desse momento, os outros subtipos de linfomas que não apresentavam essa característica histológica foram denominados de linfomas não-Hodgkin (LNH) (HOFFBRAND et al., 2004). Atualmente, a nomenclatura LNH está em desuso. De acordo com a classificação da OMS de 2008, utiliza-se a denominação LCB ou linfoma de células T/NK (JAFFE et al., 2008).

Os LCB representam um grupo bastante heterogêneo de neoplasias com diferentes comportamentos clínicos e características patológicas e epidemiológicas. Essas neoplasias comumente têm origem nos linfonodos, mas podem ocorrer em praticamente todos os tecidos: denominados sítios extranodais, dentre os quais o mais comum é o trato gastrointestinal (SHANKLAND et al., 2012). A apresentação clínica depende do sítio de envolvimento, do subtipo de LCB e da presença ou ausência dos chamados sintomas B ou sintomas constitucionais: perda de peso de mais de 10%, sudorese noturna e febre de mais de 38° C. Em aproximadamente dois terços dos pacientes há linfadenopatia indolor, que pode variar em tamanho (SHANKLAND et al., 2012).

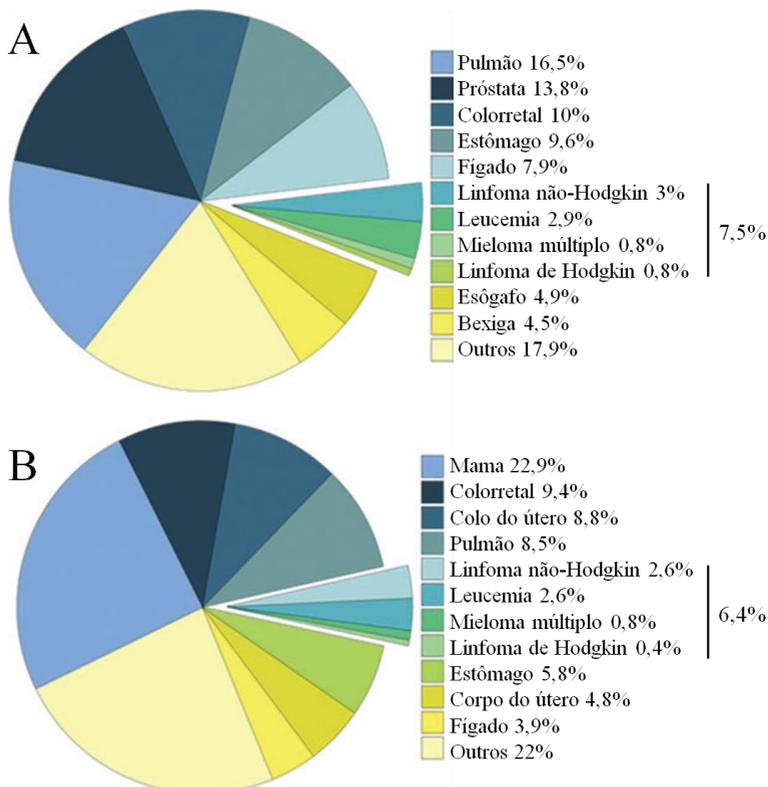
As denominadas NCP, outro grupo de NCLM-B, são doenças prevalentes em pacientes idosos e compreendem mieloma múltiplo (MM), plasmocitoma, leucemia de células plasmocitárias (LCP), macroglobulinemia de Waldenström e gamopatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS) (PAIVA et al., 2010). Dentre as NCP, o MM é caracterizado pela infiltração da medula óssea (MO) por células plasmocitárias clonais, pela produção de imunoglobulina monoclonal (paraproteína) e por outras condições clínicas, tais como lesões osteolíticas, disfunção renal, hipercalcemia e anemia (HAMEED et al., 2014).

2.3 EPIDEMIOLOGIA

Segundo dados do GLOBOCAN (2012), os linfomas foram considerados, mundialmente, como a neoplasia hematológica mais frequente em ambos os gêneros. A taxa de incidência estimada é de 6,0 e 4,1/100 mil para homens e mulheres, respectivamente, sendo maior

que a taxa de incidência estimada para leucemias e MM (Figura 2) (GLOBOCAN, 2012). Em âmbito mundial, os linfomas representam de 3 a 4% de todas as neoplasias malignas (ROMAN & SMITH, 2011).

Figura 2 – Frequências estimadas de câncer para os gêneros masculino (A) e feminino (B)



Fonte: Adaptado de: ROMAN & SMITH, 2011; GLOBOCAN, 2012.

Nota: Em destaque as frequências de linfomas não-Hodgkin, leucemias, mieloma múltiplo e linfoma de Hodgkin. (A) gênero masculino e (B) gênero feminino.

Para o ano de 2015, no Brasil, é estimada a incidência de 9.790 novos casos de linfoma, dos quais 4.940 em homens e 4.850 em mulheres (INCA, 2014).

Esses dados corroboram o fato de que as neoplasias de origem linfóide são geralmente mais comuns no gênero masculino e de que essa diferença é mais pronunciada em países menos desenvolvidos. Além

disso, essa diferença se acentua quando se analisam pacientes com idades mais avançadas ao diagnóstico (MÜLLER et al., 2005; ROMAN & SMITH, 2011).

Em relação ao MM, os dados do Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) demonstram que essa neoplasia representa 1% de todas as neoplasias malignas, com aproximadamente 120 mil casos novos por ano, em âmbito mundial. Com uma idade mediana ao diagnóstico de 70 anos e com o constante envelhecimento da população, estima-se que cerca de 350 mil novos casos sejam diagnosticados no ano de 2050 (LUDWIG et al., 2014).

Esses dados demonstram a relevância das NCLM-B no conjunto dos tipos de neoplasias que afetam a população brasileira, assim como a mundial. Apesar dos avanços na área da pesquisa epidemiológica relacionada às neoplasias hematológicas, especialmente com a aplicação de classificações mais criteriosas, acredita-se que esses dados epidemiológicos ainda podem estar subavaliados devido à dificuldade de diagnóstico encontrada em muitos países, além da presença de sintomas inespecíficos, o que pode resultar no atraso do diagnóstico e consequentemente no aumento da mortalidade (ROMAN & SMITH, 2011).

2.4 ORIGEM

Do total de casos de linfomas diagnosticados, cerca de 85% a 90% são originados de células B. Essa frequência se deve à influência de inúmeros fatores relacionados à diferenciação das células B em células plasmocitárias e à patogênese das neoplasias originadas nessas células (KUPPERS, 2005).

O desenvolvimento normal das células B abrange diferentes estágios que têm início nos órgãos linfoides primários (MO e timo), com subsequente diferenciação nos tecidos linfoides secundários, tais como linfonodos e baço. Durante esses estágios de desenvolvimento, diversas modificações genéticas ocorrem a fim de formar os receptores e as imunoglobulinas essenciais para uma resposta imune normal. No entanto, essas modificações podem levar à ocorrência de anormalidades genéticas que podem originar uma neoplasia (NOGAI et al., 2011).

Inicialmente, na MO, para o desenvolvimento das células B, há a necessidade de uma recombinação aleatória de genes que codificam as regiões variáveis das cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas a fim de formar o receptor de células B (BCR) mediado por um processo

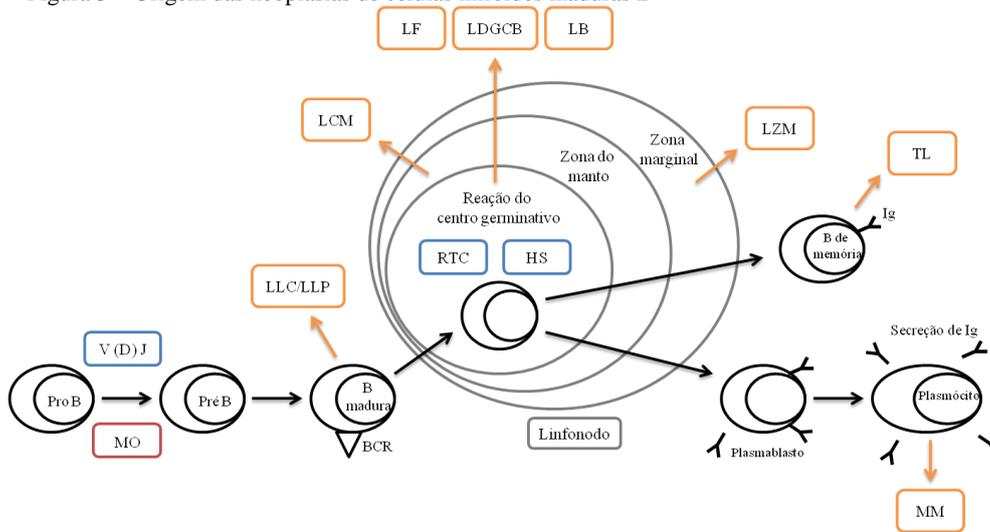
chamado recombinação V (D) J (KUPPERS et al., 1999; NOGAI et al., 2011). Esse processo envolve quebras no ácido desoxirribonucleico (DNA) de fita dupla e, posteriormente, em células normais, ativação dos processos de reparação de DNA (SHANKLAND et al., 2012). Após a recombinação V (D) J, apenas as células que adquiriram genes das regiões variáveis das cadeias leves e pesadas capazes de serem codificados em proteína sobrevivem, enquanto as demais entram em apoptose. As células B que expressam o receptor BCR, denominadas células B maduras ou virgens, saem da MO (NOGAI et al., 2011). Paralelamente, por um processo de seleção negativa, as células B com um receptor BCR autorreativo são eliminadas (DELFA, 2011).

Após sair da MO e alcançar os tecidos linfoides secundários em uma região chamada de centro germinativo (CG), as células B maduras entram em contato com os antígenos e, dessa forma, são ativadas (NOGAI et al., 2011). Esse processo é denominado reação do CG, durante o qual as células sofrem dois diferentes processos de modificação em seu DNA: 1) recombinação de troca de classe (RTC) de imunoglobulina, em que a classe de imunoglobulina pode variar de IgM para IgG, IgA ou IgE; e 2) hipermutação somática (HS), em que a região variável da cadeia leve (IgV) sofre mutação, criando a afinidade de um clone de células B a um antígeno específico (SHANKLAND et al., 2012). Posteriormente ao processo de reação do CG, as células B se diferenciam em células de memória ou em células plasmocitárias (ver Figura 3) (NOGAI et al., 2011).

A ocorrência de um erro em alguma etapa dos três processos de recombinação gênica envolvidos no desenvolvimento das células B pode contribuir para a formação de translocações cromossômicas e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de uma NCLM-B. Em relação ao processo de HS, pode-se dividir molecularmente as neoplasias de acordo com a passagem ou não das células clonais por esse processo de mutação na IgV (SHANKLAND et al., 2012). Além disso, de acordo com o local de origem da neoplasia, nesse caso mais especificamente para LCB, divide-se como CG ou não CG (NOGAI et al., 2011). De acordo com a avaliação da expressão gênica, foi definido o perfil das células derivadas do CG. Assim, observou-se que as células de leucemia linfocítica crônica de células B/linfoma linfocítico de pequenas células (LLC/LLP) não apresentavam esse padrão de expressão gênica, enquanto as células de linfoma folicular (LF) expressavam um perfil fortemente sugestivo da origem no CG. As células de LDGCB expressavam de forma heterogênea os genes do

perfil do CG, indicando origem em estágios tanto dentro do CG quanto fora do CG (ALIZADEH & STAUDT, 2000).

Figura 3 – Origem das neoplasias de células linfoides maduras B



Fonte: Adaptado de: DELFA, 2011; NOGAI et al., 2011.

Notas: As NLCM-B podem ter origem em diferentes estágios da diferenciação das células B. Em destaque nos retângulos azuis, os três processos de recombinação gênica que são eventos críticos para o possível desenvolvimento de uma neoplasia. A recombinação V (D) J, que ocorre na MO com a finalidade da formação do receptor BCR, e a RTC e a HS que ocorrem no CG dos tecidos linfoides secundários, como os linfonodos. A reação do CG termina com a diferenciação das células B em células B de memória ou efetoras secretoras de Ig (células plasmocitárias). Em destaque nos retângulos alaranjados, os principais tipos de NLCM-B de acordo com os momentos da diferenciação em que comumente têm origem. NCLM-B: neoplasias de células linfoides maduras B; MO: medula óssea; BCR: receptor de células B; RTC: recombinação de troca de classes; HS: hipermutação somática; Ig: imunoglobulina; LLC/LLP: leucemia linfocítica crônica de células B/linfoma linfocítico de pequenas células; LCM: linfoma de células do manto; LF: LF; LDGCB: linfoma difuso de grandes células B; LB: LB; LZM: linfoma da zona marginal; TL: tricolecemia; MM: mieloma múltiplo.

2.5 FATORES DE RISCO

É de extrema importância a investigação epidemiológica dos fatores de risco ambiental e genético, os quais podem explicar o aumento da incidência de NCLM-B ao longo das últimas décadas (BASSIG et al., 2012).

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um dos fatores de risco que está mais bem descrito como fator associado ao desenvolvimento de NCLM-B, especialmente de LCB. O risco relativo de desenvolver um linfoma é de 60 a 400 vezes maior em pacientes infectados pelo HIV quando comparados à população em geral, sendo na maior parte dos casos linfomas de alto grau com envolvimento de sítios extranodais. Esse risco extremamente elevado parece estar relacionado a vários fatores, tais como as propriedades retrovirais do vírus, a imunossupressão e a desregulação de citocinas causadas pela própria infecção ou por infecções oportunistas de outros vírus com afinidade a linfócitos, tais como vírus Epstein-Barr (EBV), herpes-vírus humano-8 (HHV8) e vírus T-linfotrópico humano (HTLV-I) (GROGG et al., 2007; BASSIG et al., 2012).

O aumento da frequência de LCB relacionado ao EBV, principalmente em pacientes com imunodeficiências primárias e adquiridas, pode estar relacionado à maior sobrevivência de pacientes HIV soropositivos, ao número crescente de transplantes de órgãos e ao uso mais amplo de quimioterápicos como a fludarabina (TAO & WASIK, 2001). Aproximadamente 50% dos casos de LDGCB HIV-soropositivos apresentam infecção pelo EBV, enquanto que cerca de 30% dos casos de LB são associados a essa infecção (HJALGRIM & ENGELS, 2008).

Além disso, há evidências que sugerem que a infecção pelos vírus da hepatite B (HBV) e C (HCV) também pode elevar o risco de desenvolvimento de linfomas, porém os resultados desses estudos ainda são inconclusivos (BASSIG et al., 2012). De fato, o HCV tem sido associado a alguns casos de linfoma linfoplasmacítico, linfoma da zona marginal nodal (LZMN), linfoma da zona marginal esplênica (LZME) e LDGCB (JAFJE et al., 2008). Em conjunto, estudos sugerem que o HCV contribui diretamente para a proliferação linfóide em alguns subtipos de linfomas (HJALGRIM & ENGELS, 2008).

Por outro lado, já está bem estabelecido o envolvimento da inflamação causada por diversos agentes infecciosos com o desenvolvimento de linfomas da zona marginal extranodal de tecido linfóide associado à mucosa (MALT), os quais têm sido considerados importantes alvos terapêuticos (FERRERI et al., 2004; KIESEWETTER &

RADERER, 2013). De fato, a lista de agentes infecciosos associados a linfomas tem crescido juntamente com as recentes investigações moleculares e, atualmente, compreendem cinco membros distintos: *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Borrelia burgdorferi*, *Chlamydophila psittaci* e HCV, os quais têm sido associados ao linfoma MALT gástrico, à doença linfoproliferativa do intestino delgado, ao linfoma MALT cutâneo, ao linfoma MALT ocular e LZME, respectivamente (SAGAERT et al., 2007; AIGELSREITER et al., 2011; ZUCCA et al., 2014).

Diversos estudos epidemiológicos reportaram que há um aumento no risco de desenvolvimento de NCLM-B em pacientes portadores de algumas doenças autoimunes, como síndrome de Sjögren, lúpus eritematoso sistêmico, doença celíaca e artrite reumatoide (BASSIG et al., 2012).

Em relação ao tabagismo, os resultados dos estudos não são concordantes: enquanto alguns não encontraram associação entre o hábito de fumar e o maior risco de desenvolver NCLM-B (WILLET et al., 2004; FERNBERG et al., 2006), outros suportam uma modesta associação entre o tabagismo e o risco mais elevado de desenvolvimento de LF (MORTON et al., 2005; SCHÖLLKOPF et al., 2005; GIBSON et al., 2013).

A exposição ambiental a agentes tóxicos, tais como pesticidas, dioxina, solventes e óleos, também é um fator de risco intensamente estudado (SCHINASI & LEON, 2014). Estudos de diversos países sugerem um aumento do risco de desenvolver NCLM-B, tanto LCB como MM, com o uso de alguns tipos de pesticidas (inseticidas, fungicidas e herbicidas). Como exemplo, pode-se citar o estudo realizado por Alavanja e colaboradores (2014), em que foi observada uma associação significativa entre LCB e os pesticidas lindano (organoclorado) e DDT (diclorodifeniltricloroetano) (ALAVANJA et al., 2014). Além disso, uma meta-análise publicada em 2007 observou a associação significativa entre exposição a pesticidas e neoplasias hematológicas, incluindo NCLM-B (MERHI et al., 2007).

2.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Segundo os critérios estabelecidos pela OMS, o diagnóstico das NCLM-B é realizado somando-se as informações fornecidas pelos resultados laboratoriais com as características clínicas do paciente (SWERDLOW et al., 2008). Na maioria dos casos, a avaliação da morfologia, da imuno-histoquímica (IHQ) e da imunofenotipagem por

citometria de fluxo (IMF) é suficiente para definir o diagnóstico. Além disso, diversas NCLM-B apresentam anormalidades genéticas que, se forem detectadas por citogenética e biologia molecular, podem ser muito úteis para o diagnóstico diferencial (JAFTE et al., 2008).

Até pouco tempo atrás, o diagnóstico das NCLM-B era realizado apenas pela observação morfológica das células neoplásicas (BRAYLAN, 2004). Posteriormente, a IHQ se tornou uma ferramenta essencial para o diagnóstico dessas neoplasias. Entretanto, apesar de esse método apresentar alta especificidade diagnóstica, a influência de diversos fatores e a falta de padronização entre os laboratórios têm ocasionado resultados inconsistentes (LIN & CHEN, 2014). Além disso, esse é um método moroso e com sensibilidade por vezes limitada (EL-SAYED et al., 2008). Nesse sentido, estudos mostram que a IMF é um método bastante rápido e altamente sensível (BRAYLAN, 2004).

Por mais de duas décadas, a IMF tem fornecido informações relevantes para o diagnóstico, a classificação e o monitoramento de neoplasias hematológicas (VAN DONGEN et al., 2012). Em 1997, um artigo de revisão escrito por Jennings e Foon (1997) trouxe em seu título os recentes avanços da citometria de fluxo e a aplicação no diagnóstico de neoplasias hematológicas malignas (JENNINGS & FOON, 1997).

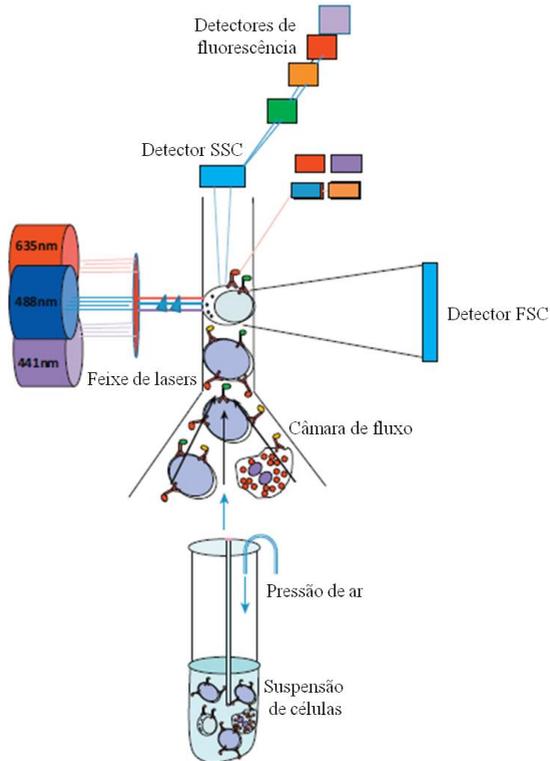
Nos dias atuais, a IMF é amplamente utilizada para a identificação, a quantificação e a caracterização de células normais, reativas e malignas em laboratórios clínicos e de pesquisa (VAN DONGEN et al., 2012; PEDREIRA et al., 2013). Essa metodologia avalia individualmente células em suspensão em relação à presença e à ausência de antígenos específicos, ou seja, o fenótipo celular. Assim, quando o exame de IMF é solicitado para determinada amostra biológica, é necessário tomar uma decisão em relação aos antígenos que serão avaliados. Essa decisão é baseada no tipo de amostra biológica recebida, na indicação clínica, na história clínica do paciente, nos achados morfológicos e, se possível, no histórico de exames de IMF (CRAIG & FOON, 2008).

Os anticorpos monoclonais utilizados no diagnóstico das neoplasias são desenvolvidos contra epítomos de partículas presentes na superfície dos leucócitos denominadas *clusters of differentiation* (CD). A nomenclatura dos CDs foi proposta e estabelecida na primeira Conferência e Workshop Internacional dos Antígenos de Diferenciação Leucocitárias Humanas (HLDA), que ocorreu em Paris em 1982. Atualmente, foram identificados mais de 350 CDs, muitos dos quais são utilizados largamente na área da pesquisa básica, no diagnóstico de

imunodeficiências e de neoplasias e no monitoramento e tratamento de algumas doenças (ZU et al., 2009).

A preparação da amostra (células em suspensão) em geral envolve a lise dos eritrócitos e a marcação dos leucócitos com anticorpos conjugados a fluorocromos. Resumidamente, ao passar pelo sistema hidrodinâmico e óptico do citômetro de fluxo, as células são avaliadas em relação a diversos parâmetros, tais como: o tamanho, avaliado pelo *forward scatter* (FSC), a complexidade interna, avaliada pelo *side scatter* (SSC), e a emissão da fluorescência, a qual é proporcional à quantidade de antígeno que se ligou ao anticorpo conjugado a determinado fluorocromo (DE TUTE, 2011). Após a aquisição dos dados, há a conversão dos sinais ópticos em eletrônicos, os quais são analisados em um computador com auxílio do *software* de análise (PEDREIRA et al., 2013) (Figura 4).

Figura 4 – Representação esquemática do funcionamento do citômetro de fluxo



Fonte: Adaptado de: PEDREIRA et al., 2013.

Nota: As células passam alinhadas individualmente por uma câmara de fluxo e cruzam os feixes de três *lasers* (azul, vermelho e violeta). O detector *forward light scatter* (FSC) está posicionado em frente aos feixes de *lasers* e coleta a informação do tamanho celular. Já o detector *side light scatter* (SSC) está posicionado a um ângulo de 90° dos feixes de *lasers* e coleta a informação da complexidade interna da célula. Os detectores de fluorescência também estão posicionados a 90° dos feixes de *lasers* e coletam a informação da fluorescência emitida quando há a ligação dos antígenos aos anticorpos conjugados aos fluorocromos.

Essa metodologia é considerada altamente específica, pois avalia um grande número de antígenos celulares simultaneamente, e altamente sensível, pois pode detectar pequenas quantidades de diferentes

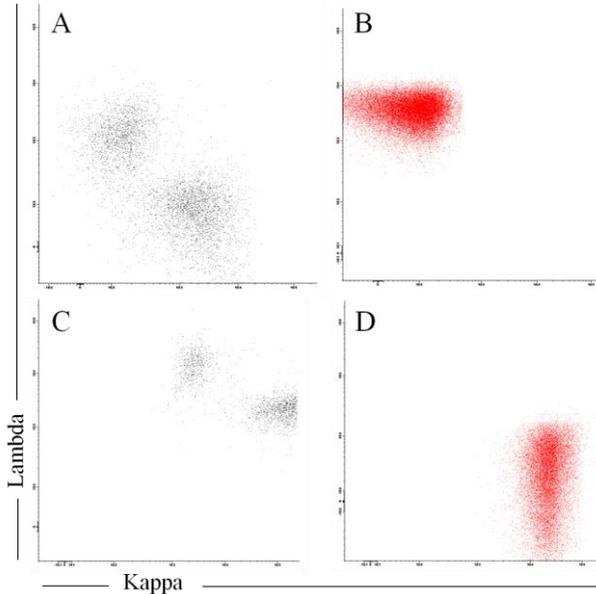
populações celulares. Além disso, a partir da IMF, pode-se ter acesso às seguintes informações: linhagem celular, estágio do desenvolvimento celular, presença de populações clonais e fenótipo detalhado da população de interesse (DE TUTE, 2011).

Assim, a IMF é indispensável para o diagnóstico das NCLM-B por detectar a presença de células linfoides B maduras anormais ou clonais, identificar alvos terapêuticos para tratamento com anticorpos (imunoterapia) e fornecer informações em relação ao prognóstico dos pacientes (CRAIG & FOON, 2008).

Habitualmente, as NCLM-B são originadas a partir de um único clone de células neoplásicas, o qual é reconhecido pela presença de cadeia leve de Ig do tipo kappa ($Ig\kappa$) ou lambda ($Ig\lambda$). Esse fato diferencia do padrão policlonal (kappa e lambda), que ocorre na grande maioria dos casos de linfocitose reativa e nas células B normais (REGO & SANTOS, 2009) (ver Figura 5). Para a avaliação de clonalidade, utiliza-se a relação entre os linfócitos B que expressam cadeia leve do tipo kappa e aqueles que expressam cadeia leve do tipo lambda. Assim, é considerada policlonal a população linfocitária que apresenta o valor da relação kappa/lambda entre 0,5 e 3,0 (WITZIG et al., 1990; SEGAL et al., 1991).

No entanto, embora a detecção de populações monoclonais para a cadeia leve seja extensamente usada como sinônimo de neoplasia, uma análise cuidadosa se faz necessária, pois existem relatos de monoclonalidade em populações linfocitárias reativas (REGO & SANTOS, 2009).

Figura 5 – *Dot plots* ilustrativos que mostram a clonalidade das células linfoides B maduras e das células plasmocitárias



Fonte: Elaborada pela autora.

Notas: As células linfoides B maduras foram selecionadas pelo marcador CD19 e CD20; e as células plasmocitárias foram selecionadas pelo marcador CD38 e CD138. A) células linfoides B maduras policlonais em amostra de sangue periférico; B) células linfoides B maduras monoclonais, com restrição de cadeia leve do tipo lambda, em amostra de aspirado de linfonodo; C) células plasmocitárias policlonais em amostra de medula óssea; D) células plasmocitárias monoclonais, com restrição de cadeia leve do tipo kappa, em amostra de medula óssea.

Desde a sua implantação no Setor de Onco-Hematologia da Divisão de Análises Clínicas do HU/UFSC (DACL-HU), em junho de 2011, a IMF tem sido aplicada no estudo das NCLM-B. De 2011 até o início de 2013, o diagnóstico por IMF no Setor de Onco-Hematologia da DACL-HU era realizado com a utilização de um painel de quatro cores, ou seja, composto de anticorpos monoclonais conjugados a quatro fluorocromos diferentes. Entre os meses de março e abril de 2013, foi implantado o painel de oito cores baseado nas recomendações do consórcio internacional Euroflow, no qual há uma maior possibilidade de combinação de anticorpos monoclonais que contribuem para responder a maioria das questões clínicas (VAN DONGEN & ORFAO,

2012). No momento, esse setor faz parte de um dos poucos serviços brasileiros que utilizam a IMF com o painel de oito cores completo no diagnóstico e no acompanhamento de pacientes em um hospital público.

O consórcio Euroflow é formado por 19 grupos de pesquisa e uma empresa associada, compostos de profissionais com ampla experiência em citometria de fluxo e diagnóstico molecular. Desde 2005, quando foi formado, esse consórcio tem publicado estudos em relação ao desenvolvimento, à padronização e à validação de testes com alta sensibilidade para o diagnóstico e o acompanhamento dos pacientes portadores de neoplasias hematológicas (EUROFLOW, 2015).

Os painéis desenvolvidos pelo consórcio Euroflow foram testados em diversas amostras normais, reacionais e neoplásicas até o estabelecimento da combinação ideal de anticorpos monoclonais. O fluxo de investigação diagnóstica das NCLM-B por IMF se inicia com um painel de triagem de células linfoides, com o qual é possível discriminar células neoplásicas de células normais ou reacionais pela detecção de fenótipos aberrantes e de populações clonais (Quadro 2) (VAN DONGEN et al., 2012).

Quadro 2 – Painel de triagem de células linfoides do consórcio Euroflow

Fluorocromos e marcadores							
PacB	PacO	FITC	PE	PC5	PECy7	APC	APCCy7
CD4	CD45	CD8	CD56	CD5	CD19	CD3	CD38
CD20		sIgλ	sIgκ		TCRγδ		

Fonte: Adaptado de: VAN DONGEN et al., 2012.

Nota: PacB: pacific blue; PacO: pacific orange; FITC: fluoresceína; PE: ficoeritrina; PC5: ficoeritrina-cianina; PECy7: ficoeritrina-cianina 7; APC: alofococianina; APCCy7: alofococianina cianina 7; sIgκ: cadeia leve kappa de superfície; sIgλ: cadeia leve lambda de superfície; TCRγδ: TCR gama delta.

Após a detecção de uma população de células anormais ou monoclonais pelo painel de triagem linfóide, segue-se a investigação do fenótipo detalhado dessas células. Para isso, utiliza-se o painel “doenças linfoproliferativas crônicas B” em caso de suspeita de LCB e o painel “neoplasias de células plasmocitárias” em caso de suspeita de MM ou outra NCP, ambos desenvolvidos pelo grupo Euroflow (ver Quadros 3 e 4). Esses painéis objetivam avaliar o fenótipo de células clonais detectadas pelo painel de triagem e estabelecer o subtipo do LCB ou de NCP.

Quadro 3 – Pannel doenças linfoproliferativas de células B do consórcio Euroflow

Fluorocromos e marcadores							
PacB	PacO	FITC	PE	PC5	PECy7	APC	APCCy7
CD20	CD45	CD23	CD10	CD79b	CD19	CD200	CD43
CD20	CD45	CD31	LAIR-1	CD11c	CD19	sIgM	CD81
CD20	CD45	CD103	CD95	CD22	CD19	CXCR5	CD49d
CD20	CD45	CD62L	CD39	HLA-DR	CD19	CD27	X

Fonte: Adaptado de: VAN DONGEN et al., 2012.

Notas: Em destaque, marcadores incluídos no pannel de oito cores. PacB: pacific blue; PacO: pacific orange; FITC: fluoresceína; PE: ficoeritrina; PC5: ficoeritrina-cianina; PECy7: ficoeritrina-cianina 7; APC: alofocianina; APCCy7: alofocianina cianina 7; sIgM: IgM de superfície; X: nenhum marcador inserido.

Quadro 4 – Pannel neoplasias de células plasmocitárias do consórcio Euroflow

Fluorocromos e marcadores							
PacB	PacO	FITC	PE	PC5	PECy7	APC	APCCy7
CD45	CD138	CD38	CD56	B2M	CD19	cyI κ	cyI λ
CD45	CD138	CD38	CD28	CD27	CD19	CD117	CD81

Fonte: Adaptado de: VAN DONGEN et al., 2012.

Notas: Em destaque, marcadores incluídos no pannel de oito cores. PacB: pacific blue; PacO: pacific orange; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PC5: ficoeritrina-cianina; PECy7: ficoeritrina-cianina 7; APC: alofocianina; APCCy7: alofocianina cianina 7; B2M: beta-2-microglobulina; cyI κ : cadeia leve kappa de citoplasma; cyI λ : cadeia leve lambda de citoplasma.

Apesar de os painéis de oito cores serem muito informativos, alguns diagnósticos diferenciais entre os subtipos de NCLM-B não podem ser completamente esclarecidos, especialmente quando ocorre sobreposição fenotípica, ou seja, expressão de marcadores em comum entre os diferentes subtipos de NCLM-B ou presença de fenótipos atípicos. Além disso, alguns marcadores fenotípicos ainda não possuem relação estabelecida com a classificação ou com o prognóstico dessas doenças. Sendo assim, a intensidade de expressão desses marcadores e a sua relevância devem ser investigadas.

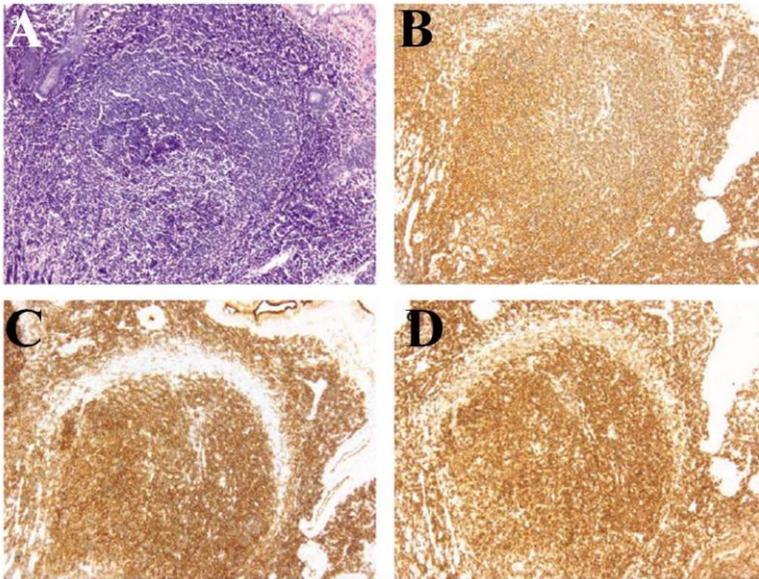
Além da IMF, os exames anatomopatológicos e imuno-histoquímicos também fazem parte da rotina laboratorial no diagnóstico e no acompanhamento dos pacientes portadores de NCLM-B no HU/UFSC. De fato, esses métodos são considerados as principais

ferramentas para a realização do diagnóstico de linfomas (ZHANG & AGUILERA, 2014). Na análise morfológica das células obtidas por biópsias de tecidos linfoides, observa-se se há alterações na arquitetura do tecido, tanto nas regiões foliculares (CG, zona do manto e zona marginal) quanto nas regiões de células T (área interfolicular). Quando uma população anormal estiver presente, deve-se determinar o tamanho celular e as características do núcleo com presença ou ausência de nucléolos. Além disso, é importante verificar se há presença de componente reacional. Em sítios extranodais, avalia-se a localização anatômica da amostra, a evidência de invasão epitelial e vascular e a presença de zonas de necrose (HIGGINS et al., 2008).

Após a análise morfológica, a investigação diagnóstica segue com a IHQ para três finalidades: avaliar o fenótipo de uma população anormal detectada morfológicamente, caracterizar uma população anormal identificada pela citometria de fluxo e rastrear populações de células reacionais a fim de determinar se há pequenas populações de células anormais presentes concomitantemente na amostra (HIGGINS et al., 2008).

Na técnica de IHQ, o material biológico é fixado e processado em blocos de parafina. Posteriormente, lâminas muito finas do bloco de parafina são colocadas em contato com os anticorpos. De forma mais comum, a ligação dos anticorpos aos antígenos é revelada por uma reação enzimática, em que o anticorpo é conjugado a uma enzima, como uma peroxidase, responsável por catalisar a reação com consequente produção de coloração (ver Figura 6). Atualmente, mais de 200 tipos de anticorpos estão disponíveis para auxiliar no diagnóstico de neoplasias hematológicas e não hematológicas e na detecção de alguns tipos de vírus, como, por exemplo, o citomegalovírus (LIN & CHEN, 2014).

Figura 6 – Cortes histológicos de amostra de gânglio linfático comprometido por linfoma folicular analisado pela técnica de imuno-histoquímica



Fonte: (TAKATA et al., 2009).

Nota: Observa-se que o folículo apresenta um infiltrado uniforme de células pequenas (A), as quais expressam CD20 (B), CD10 (C) e Bcl-2 (D).

Apesar do desenvolvimento tecnológico e da introdução de novos marcadores para aprimorar o diagnóstico das NCLM-B por IMF e IHQ, em alguns casos não é possível definir com clareza o subtipo de NCLM-B. Nesses casos, há a necessidade de avaliar as anormalidades genéticas presentes nessas neoplasias. Diversas translocações cromossômicas são relacionadas a um subtipo de NCLM-B específico, como, por exemplo, a t(11;14) com o linfoma de células do manto (LCM), a t(14;18) com o LF, a t(8;14) e variações com o LB e a t(11;18) com o linfoma MALT (JAFFE et al., 2008).

O principal objetivo do exame molecular no diagnóstico das NCLM-B é a detecção da clonalidade, de translocações cromossômicas e de anormalidades genéticas. Atualmente, as técnicas moleculares podem ser utilizadas de forma isolada ou em conjunto. Entre elas, pode-se citar a reação em cadeia da polimerase (PCR), a hibridização fluorescente *in situ* (FISH), a hibridização genômica comparativa e o *microarray* ou perfil de expressão gênica (KOCJAN, 2005).

2.7 PROGNÓSTICO

A definição do tratamento dos pacientes portadores de um subtipo de NCLM-B envolve a análise de informações que vão além do diagnóstico de determinado subtipo de neoplasia. Pacientes com o mesmo diagnóstico podem apresentar condições clínicas, perfis moleculares e prognósticos notavelmente diferentes. Dessa forma, a estratificação de acordo com os índices e os marcadores prognósticos celulares e moleculares permite a identificação de subgrupos de pacientes que podem necessitar de uma abordagem terapêutica alternativa (SEHN, 2006).

2.7.1 Índices prognósticos

Estabelecer o diagnóstico de uma neoplasia com agilidade e exatidão é apenas o primeiro passo na conduta clínica a ser tomada com o paciente. A decisão sobre o início e o tipo de tratamento é muitas vezes influenciada por parâmetros adicionais, tais como, as dosagens bioquímicas, os marcadores celulares, os índices prognósticos e os testes moleculares. Um dos fatores prognósticos mais importantes é o estadiamento, ou seja, a determinação do grau de invasão de diferentes tecidos pelas células neoplásicas, o que indica a agressividade da doença. O estadiamento é incorporado aos índices de prognóstico, os quais podem variar de acordo com o tipo de NCLM-B (GORCZYCA, 2011).

De forma geral, para a avaliação do prognóstico, são considerados os seguintes fatores: idade, gênero, estadiamento, porcentagem de células patológicas, doença *bulky*, envolvimento da MO, presença de sintomas B, *performance status* (bem-estar geral do paciente), velocidade de hemossedimentação (VHS), atividade da lactato desidrogenase (LDH) e concentração sérica de beta-2-microglobulina (B2M), anemia e trombocitopenia (ARCAINI et al., 2012). A doença *bulky* é definida por linfonodomegalia maior que 10 centímetros ou que represente mais de um terço do tamanho do mediastino (CULTRERA & DALIA, 2012). O *performance status* pode ser estimado por um sistema de pontuação publicado pelo Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG). Esse sistema, desenvolvido em 1960, define seis categorias (de 0 a 5), as quais representam o bem-estar geral do paciente: a categoria 0 representa o paciente assintomático e a categoria 5 representa o óbito (OKEN et al., 1982).

Os critérios para o estabelecimento do prognóstico em pacientes com linfoma surgiram na década de 1970, quando o primeiro índice, chamado de sistema Ann Arbor, foi formulado para LH e adaptado para o uso nos LCB (Tabela 1) (TAKVORIAN & DIPIRO, 2002).

Tabela 1 – Sistema de estadiamento Ann Arbor

Estágio	Características
I	Envolvimento de uma única região de linfonodo
II	Envolvimento de duas ou mais regiões de linfonodo localizados do mesmo lado do diafragma (para cima ou para baixo)
III	Envolvimento de duas ou mais regiões de linfonodo localizados dos dois lados do diafragma (para cima e para baixo)
IV	Envolvimento de um ou mais órgãos extranodais: medula óssea, fígado, pulmões, etc.
Subestágio	Características
A	Assintomático
B	Sintomas B
C	Doença <i>bulky</i>
D	Envolvimento extranodal adjacente
E	Envolvimento do baço
F	Envolvimento do fígado

Fonte: TAKVORIAN & DIPIRO, 2002.

Posteriormente, em 1993, o International Prognostic Index (IPI) foi desenvolvido por oncologistas para prever o prognóstico de pacientes com linfomas agressivos (ver Tabela 2) (THE INTERNATIONAL NON-HODGKIN'S LYMPHOMA PROGNOSTIC FACTORS PROJECT, 1993). Diversas características dos pacientes foram analisadas e associadas ao tempo de sobrevida dos mesmos. Os parâmetros que tiveram associação significativa foram idade, atividade da LDH, *performance status* e quantidade de sítios extranodais envolvidos. Atualmente, com a subdivisão de acordo com o risco, o IPI é amplamente utilizado como índice de prognóstico em pacientes com LDGCB (GORCZYCA, 2011).

Assim como para o LDCGB, para o LB, sugere-se a definição do estadiamento pelo sistema Ann Arbor. Devido a sua agressividade, é essencial que o paciente com suspeita de LB seja avaliado o mais breve possível a fim de iniciar o tratamento (PERKINS & FRIEDBERG, 2008). O sistema de estadiamento St. Jude/Murphy também pode ser empregado (PERKINS & FRIEDBERG, 2008; MOLYNEUX et al., 2012); no entanto, o

Serviço de Hematologia do HU/UFSC prioriza o Ann Arbor, seguido do sistema IPI.

Tabela 2 – Sistema de estadiamento IPI

Fatores de risco (1 ponto cada)	Características
Idade	Maior que 60 anos
Sistema Ann Arbor	Estágios III ou IV
LDH	Acima dos valores de referência*
<i>Performance status</i> (ECOG)	2, 3 ou 4
Sítios extranodais	Mais de 1
Classificação	Sobrevida de cinco anos
Risco baixo (0 – 1 ponto)	73%
Risco intermediário (2 pontos)	51%
Risco intermediário-alto (3 pontos)	43%
Risco alto (4 – 5 pontos)	26%

Fonte: GORCZYCA, 2011.

Nota: IPI: International Prognostic Index; LDH: lactato desidrogenase; ECOG: Eastern Cooperative Oncology Grou. *Os valores de referência podem ser observados no Anexo A.

A partir do momento em que o IPI passou a ser utilizado para pacientes portadores de LCB indolentes, houve diversos resultados conflitantes. Assim, surgiu a necessidade de se desenvolver novos índices de prognóstico direcionados a pacientes com esse tipo de LCB, como o LF (ARCAINI et al., 2012).

Desse modo, o Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) foi proposto no ano de 2004 como resultado de um grande estudo com 4.167 pacientes diagnosticados com LF entre 1985 e 1992, sendo utilizado atualmente como um índice eficaz de prognóstico (ARCAINI et al., 2012; FREEDMAN, 2012) (ver Tabela 3). Em seguida, uma versão modificada denominada FLIPI2 foi criada; porém, sua utilidade permanece duvidosa (FREEDMAN, 2012).

Tabela 3 – Sistema de estadiamento FLIPI

Fatores de risco (1 ponto cada)	Características
Idade	Maior que 60 anos
Sistema Ann Arbor	Estágios III ou IV
Sítios nodais	Mais de 4
LDH sérica	Acima do valor de referência*
Hemoglobina	Menor que 12 g/dL
Classificação	Sobrevida de cinco anos
Risco baixo (0 – 1 ponto)	91%
Risco intermediário (2 pontos)	78%
Risco alto (3 – 5 pontos)	52%

Fonte: FREEDMAN, 2012.

Nota: FLIPI: Follicular Lymphoma International Prognostic Index; LDH: lactato desidrogenase. *Os valores de referência podem ser observados no Anexo A.

Como os estudos revelaram haver limitações na aplicação dos índices IPI e FLIPI nos pacientes portadores de LCM avançado, em 2008, Hoster e colaboradores propuseram um índice prognóstico direcionado a esses pacientes: o Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index (MIPI). Esse índice é baseado em quatro fatores independentes: idade, *performance status*, LDH e contagem leucocitária. Além disso, o índice de proliferação celular Ki-67 mostrou ser um marcador relevante na avaliação prognóstica (HOSTER et al., 2008; LIM et al., 2010).

Em 1975, foi proposto o sistema Durie-Salmon para a estratificação prognóstica de pacientes com MM, o qual se baseava principalmente na concentração e no tipo de proteína monoclonal, na hemoglobina, no cálcio e no número de lesões líticas (GREIPP et al., 2005). Mais recentemente, em 2005, o International Myeloma Working Group propôs um sistema de estadiamento para pacientes portadores de MM: o International Staging System (ISS) (GREIPP et al., 2005). O ISS define três grupos de risco (I, II e III) baseados nas concentrações séricas de B2M e albumina (ver Tabela 4). Esse sistema é simples, mas apresenta grande utilidade, especialmente para prever a sobrevida dos pacientes (CHOU, 2012).

Tabela 4 – Sistema de estadiamento ISS

Estágio	Características	Mediana de sobrevida (meses)
I	B2M < 3.500 ng/mL ALB ≥ 3.5 g/dL	62
II	Quando não se classifica como I ou III*	44
III	B2M > 5.500 ng/mL	29

Fonte: GREIPP et al., 2005.

Notas: *Há duas categorias para o estágio II: B2M < 3.500 ng/mL, mas ALB < 3,5 g/dL; ou B2M de 3.500 a 5.500 ng/mL independente da concentração de ALB. ISS: International Staging System; B2M: beta-2-microglobulina sérica; ALB: albumina sérica.

Em relação aos índices prognósticos direcionados aos pacientes com diagnóstico de LLC/LLP, foi proposto, em 1975, o primeiro índice chamado de sistema de estadiamento Rai. Esse índice utiliza determinadas características clínicas para definir cinco grupos (0 a IV) associados a diferentes tempos de sobrevida (RAI et al., 1975) (ver Tabela 5).

O sistema de estadiamento Rai tem como objetivo principal separar os pacientes de alto risco, ou seja, aqueles que apresentam anemia e/ou trombocitopenia. No entanto, observou-se que entre os pacientes que não são de alto risco, cerca de 80% dos casos, havia uma grande variabilidade no curso clínico da neoplasia e, assim, se requeria uma nova avaliação para o possível início de tratamento. A presença de cinco grupos definidos pelo índice de Rai se tornou um fator complicador. Por esse motivo, em 1981, Binet e colaboradores propuseram um índice simplificado composto de apenas três grupos: A, B e C (BINET et al., 1981) (ver Tabela 6).

Os dois sistemas de estadiamento juntos não apenas estimam o prognóstico, mas também identificam os pacientes que devem receber tratamento: Rai III e IV e Binet C (FURMAN, 2010). Atualmente, o sistema de estadiamento Rai é mais comumente utilizado nos Estados Unidos, enquanto o sistema Binet é mais empregado nos países europeus (ZENZ et al., 2010).

Tabela 5 – Sistema de estadiamento Rai

Estágio	Características clínicas	Mediana de sobrevida (meses)
0	Linfocitose	150
I	Linfocitose e linfonodomegalia	101
II	Linfocitose e hepatoesplenomegalia	71
III	Linfocitose e anemia	19
IV	Linfocitose e trombocitopenia	19

Fonte: Adaptado de: RAI et al., 1975.

Tabela 6 – Sistema de estadiamento Binet

Estágio	Características clínicas	Mediana de sobrevida (meses)
A	< 3 áreas nodais envolvidas	> 10
B	≥ 3 áreas nodais envolvidas	7
C	Anemia (Hb < 10 g/dL) e/ou trombocitopenia (< 100.000/mm ³)	2

Fonte: Adaptado de: BINET et al., 1981.

Nota: Hb: hemoglobina.

2.7.2 Marcadores prognósticos celulares

Os marcadores prognósticos celulares podem ser avaliados pelas técnicas de IMF e de IHQ. Atualmente, além dos índices prognósticos e parâmetros laboratoriais, muitos estudos têm identificado marcadores celulares ou fenotípicos como potenciais fatores prognósticos (ROSENQUIST et al., 2013).

Em relação à LLC/LLP, já está bem estabelecida a relação da expressão de CD49d, CD38 e ZAP-70 nas células patológicas e a agressividade da doença. Nesses casos, as células são mais resistentes ao tratamento quimioterápico e apresentam maiores taxas de proliferação (CHIORAZZI, 2012; BRACHTL et al., 2014). Além disso, uma análise multicêntrica demonstrou que pacientes portadores de LLC/LLP cujas células patológicas expressavam CD49d (≥ 30% das células) apresentaram menores taxas de sobrevida, independentemente da expressão de CD38 e ZAP-70, outros marcadores de prognóstico desfavorável (BULIAN et al., 2014).

Mateo e colaboradores (2008) demonstraram, em um estudo com 685 casos de MM sintomático, que a expressão dos antígenos CD19 e

CD28 nas células plasmocitárias clonais indica prognóstico desfavorável, enquanto a expressão de CD56 e CD117 está associada a um bom prognóstico (Mateo *et al.*, 2008). Nesse trabalho, os pacientes cujas células plasmocitárias clonais expressavam CD19 e/ou CD28 apresentaram tempo de sobrevida global (SG) e tempo de sobrevida livre de progressão (SLP) claramente inferiores ao grupo que não expressava esses marcadores; enquanto aqueles cujas células plasmocitárias expressavam CD117 apresentaram tempo de SG e de SLP significativamente superiores (MATEO *et al.*, 2008). Além disso, em 2012, Paiva e colaboradores publicaram um estudo que avaliou a expressão de CD81 em células plasmocitárias clonais de 230 casos de MM recém-diagnosticados e constataram que a expressão de CD81 é um marcador prognóstico independente para menores taxas de sobrevida (PAIVA *et al.*, 2012).

Em relação ao LDGCB, alguns estudos demonstram que a expressão de marcadores nas células patológicas que sugere que o LCB tem origem no CG está relacionada a um maior tempo de sobrevida. No entanto, seu real valor prognóstico continua indefinido (HANS *et al.*, 2004). A fim de classificar os LDGCB de acordo com a origem e avaliar o prognóstico, Hans e colaboradores (2004) publicaram um algoritmo para definir se o LDGCB é do tipo CG. Esse algoritmo é baseado nas expressões dos marcadores CD10, Bcl-6 e MUM1.

Assim como os marcadores de CG, a expressão de CD5 pelas células de LDGCB também tem apresentado resultados controversos em relação ao prognóstico (YAMAGUCHI *et al.*, 2008). Em contrapartida, já melhor elucidada está a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e sua relação a um prognóstico adverso (COOK *et al.*, 2003; SEHN, 2006).

Com relação aos pacientes portadores de LF, apesar de a grande maioria dos casos apresentar células com superexpressão de Bcl-2, a expressão dessa proteína em quantidades ainda mais elevadas tem sido relacionada a um pior prognóstico. Por outro lado, a alta expressão dos marcadores relacionados ao CG, como o CD10, tem sido associada a um prognóstico favorável (SEHN, 2006; CAMACHO *et al.*, 2011; CIOBANU *et al.*, 2013).

2.8 ASPECTOS TERAPÊUTICOS

A heterogeneidade clínica e laboratorial das NCLM-B reflete diretamente na conduta e no tratamento a ser administrado nos pacientes. Em alguns casos de NCLM-B indolentes a conduta pode ser expectante, ou seja, pacientes que seguem em observação sem tratamento quimioterápico. Já em casos de NCLM-B com um curso clínico mais agressivo a conduta pode envolver a aplicação de protocolos de quimioterapia de altas doses, a radioterapia, a imunoterapia (anticorpos monoclonais) e o transplante de MO (TMO). Na presente revisão da literatura, serão citados os aspectos terapêuticos dos subtipos de NCLM-B mais frequentes na população em estudo: MM, LLC/LLP, LDGCB, LF e LB.

2.8.1 Mieloma múltiplo

No momento em que um paciente é diagnosticado com MM, há alguns parâmetros que definem a elegibilidade do início do tratamento, denominado, do inglês, critério CRAB (cálcio, falha renal, anemia e lesões em ossos). É elegível ao tratamento o paciente que apresentar um ou mais dos seguintes aspectos clínicos e laboratoriais: lesões osteolíticas, anemia (hemoglobina menor que 10 g/dL), insuficiência renal (creatinina maior que 2 mg/mL) e hipercalcemia (maior que 11 mg/dL) (LUDWIG et al., 2014).

Além do critério CRAB, os pacientes são estratificados de acordo com a elegibilidade ao TMO autólogo, o qual é destinado preferencialmente aos pacientes jovens. Nesse caso, os pacientes recebem de dois a quatro ciclos de um regime quimioterápico isento de melfalan, pois este prejudica a recuperação hematopoiética pós TMO. Em seguida, são conduzidos à coleta de células-tronco hematopoiéticas. Quando há uma boa resposta ao tratamento inicial, os pacientes são encaminhados ao TMO. No entanto, quando a resposta não é boa, o tratamento quimioterápico inicial pode ser retomado após a coleta das células-tronco, protelando o TMO até a primeira recaída. Por outro lado, os pacientes idosos e não elegíveis ao TMO recebem tratamento inicial de 9 a 18 meses para a maioria dos protocolos quimioterápicos (RIA et al., 2014).

Diversas classes de medicamentos são utilizadas nos protocolos quimioterápicos, tais como agentes alquilantes (melfalan e ciclofosfamida), corticosteroides (prednisona e dexametasona) e

antraciclina (doxorrubicina e doxorrubicina lipossomal). Novas classes de medicamentos, como os inibidores de proteossoma (bortezomibe) e fármacos imunomodulatórios (talidomida e lenalidomida), completam as opções terapêuticas que podem ser utilizadas para o MM (RIA et al., 2014). Além desses, um novo medicamento da classe dos bifosfonatos, o pamidronato, tem sido amplamente utilizado para a prevenção e o tratamento do comprometimento ósseo (LUDWIG et al., 2014). No entanto, apesar do desenvolvimento de novos fármacos pela indústria farmacêutica, o MM continua sendo uma doença sem cura (RIA et al., 2014).

2.8.2 Leucemia linfocítica crônica de células B/linfoma linfocítico de pequenas células

Em geral, a maioria dos pacientes portadores de LLC/LLP não apresenta sintomatologia ao diagnóstico e segue a conduta expectante, ou seja, de observação. Já os pacientes sintomáticos ou com a doença em progressão têm indicação de receber tratamento (ZENZ et al., 2010; LADYZYNSKI et al., 2015).

Atualmente, algumas opções terapêuticas estão disponíveis para o tratamento da LLC/LLP sintomática ou em progressão, as quais incluem agentes alquilantes (clorambucil e bendamustina), análogos de purina (fludarabina) e anticorpos monoclonais (alantuzumabe e rituximabe), tanto como monoterapia ou terapia combinada (LADYZYNSKI et al., 2015).

2.8.3 Linfoma difuso de grandes células B

Em relação ao LDGCB, estamos na chamada “era rituximabe”, em que o protocolo R-CHOP (rituximabe, ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona) é amplamente utilizado com resultados bastante promissores. O rituximabe é um anticorpo monoclonal que possui como alvo o CD20, um marcador de células B maduras comumente expresso em altas concentrações nas células neoplásicas desse tipo de LCB. O mecanismo de ação desse anticorpo monoclonal ainda não foi totalmente elucidado; no entanto, algumas ações, como toxicidade mediada pelo complemento, têm sido observadas (CULTRERA & DALIA, 2012).

Pacientes com LDGCB recidivado ou refratário ao tratamento de primeira escolha, usualmente, são tratados com os seguintes protocolos: R-ICE (rituximabe, ifosfamida, carboplatina e etoposide) e R-DHAP

(rituximabe, dexametasona, altas doses de citarabina e cisplatina), além da possibilidade de transplante de células-tronco hematopoiéticas para os pacientes elegíveis (CULTRERA & DALIA, 2012).

2.8.4 Linfoma folicular

Para a definição do tratamento, os pacientes portadores de LF podem ser divididos em dois grupos: os pacientes com diagnóstico em estágios iniciais da neoplasia, os quais representam cerca de 10% dos casos; e aqueles com diagnóstico em estágios avançados da doença, os quais representam 90% dos casos. Nos casos em que o diagnóstico foi realizado nos estágios iniciais, a radioterapia ou a conduta expectante podem ser aplicadas. Já os casos de LF em estágios avançados podem ser direcionados à conduta expectante, quando não há sintomatologia, ou podem ser tratados com protocolos quimioterápicos, tais como R-CHOP e R-CVP (rituximabe, ciclofosfamida, vincristina e prednisona), quando há linfadenopatia, sintomas B, sintomas de doença extranodal ou citopenias (FREEDMAN, 2012).

2.8.5 Linfoma de Burkitt

Os princípios básicos aplicados ao tratamento do LB são baseados em altas doses de agentes alquilantes, administração frequente da quimioterapia e atenção constante à profilaxia em relação à infiltração do sistema nervoso central (SNC) com altas doses de quimioterapia sistêmica e/ou intratecal. Atualmente, não se recomenda radioterapia (PERKINS & FRIEDBERG, 2008).

Os regimes terapêuticos convencionais para outros LNH, como o protocolo CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona), apresentam resultados insatisfatórios para o tratamento do LB, com uma taxa de resposta completa ao tratamento que varia de 30% a 70%. Ainda, ao contrário do que se observa em outros tipos de LCB, o impacto da inserção do rituximabe à quimioterapia não é claro, com resultados contraditórios (WILDES et al., 2014).

Dessa forma, os protocolos mais comumente utilizados em pacientes com LB são combinações elaboradas de quimioterápicos, como os protocolos HyperCVAD (ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina e dexametasona, alternados com ciclos de metotrexato e citarabina), R-HyperCVAD (com a inserção do rituximabe) (WILDES et al., 2014), EPOCH (etoposide, prednisona, vincristina, ciclofosfamida e doxorubicina), R-DA-EPOCH (dose ajustada, com a inserção do

rituximabe) e CODOX-M/IVAC (ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, altas doses de metotrexato alternadas com ifosfamida e etoposide e altas doses de citarabina, seguidas de metotrexato e citarabina intratecal), este último amplamente utilizado nos Estados Unidos (PERKINS & FRIEDBERG, 2008).

3 JUSTIFICATIVA

Considerando-se que as NCLM-B constituem o grupo de neoplasias hematológicas mais prevalente nos países ocidentais, reforça-se a importância de se conhecer o perfil dos pacientes portadores de um grupo tão heterogêneo de neoplasias. O conhecimento do perfil dos casos atendidos pela instituição é fundamental para um correto planejamento diagnóstico e terapêutico local, além de poder acrescentar dados epidemiológicos importantes em âmbito nacional. Vale destacar que existem poucos estudos que avaliem essas características no Brasil.

Alguns fatores como a presença de sintomas inespecíficos, a dificuldade na obtenção de alguns tipos de amostras biológicas e a sobreposição fenotípica observada entre alguns subtipos de NCLM-B podem atrasar o diagnóstico e, conseqüentemente, o início do tratamento dos pacientes. Assim, são de grande importância estudos que busquem novos alvos que auxiliem o diagnóstico, e que avaliem fatores de risco e de prognóstico, os quais podem direcionar o tratamento.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os casos de NCLM-B diagnosticados entre junho de 2011 e outubro de 2014 e acompanhados pelo Serviço de Hematologia do HU-UFSC a fim de traçar o perfil clínico e laboratorial desses pacientes.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a frequência dos diferentes tipos de NCLM-B no HU-UFSC entre 2011 e 2014;
- Traçar o perfil dos pacientes portadores de NCLM-B diagnosticados e tratados no HU-UFSC em relação às variáveis como idade e gênero;
- Avaliar os fatores de risco, tais como infecções virais, exposição ocupacional a agrotóxicos e tabagismo, nos pacientes portadores de NCLM-B;
- Analisar os resultados dos exames laboratoriais no momento do diagnóstico;
- Avaliar a expressão fenotípica de marcadores de diagnóstico;
- Avaliar a concordância entre os métodos laboratoriais, IHQ e IMF, utilizados para a realização do diagnóstico de NCLM-B;
- Estratificar os pacientes portadores de NCLM-B conforme os índices prognósticos, avaliar a expressão de marcadores prognósticos e relacioná-los à evolução clínica;
- Avaliar a resposta ao tratamento dos pacientes portadores de NCLM-B;
- Investigar a frequência de óbito e estimar as taxas de SG nos pacientes portadores de NCLM-B.

5 CASUÍSTICA E MÉTODOS

5.1 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da UFSC (processo 913/2013) (Anexo B). Os pacientes foram esclarecidos quanto aos objetivos da pesquisa e à metodologia utilizada na coleta dos dados. Apenas participaram do estudo os pacientes que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

5.2 DESCRIÇÃO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional longitudinal.

5.3 LOCAL E POPULAÇÃO DE ESTUDO

O estudo foi realizado no Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH) e no Setor de Onco-Hematologia, ambos situados na DACL-HU, coordenados pela Prof.^a Dr.^a Maria Claudia Santos da Silva. A população de estudo é constituída por pacientes adultos portadores de NCLM-B que foram diagnosticados e acompanhados pelo Serviço de Hematologia do HU-UFSC, com data de diagnóstico entre junho de 2011 e outubro de 2014.

5.4 PROCEDIMENTOS

Os prontuários da população de estudo foram avaliados no arquivo do Serviço de Agendamento Médico e Estatística (SAME) do HU-UFSC. Os resultados dos exames laboratoriais (exames bioquímicos e de IMF) no momento do diagnóstico foram obtidos do sistema de informação da DACL-HU e o da IHQ, do Serviço de Patologia do mesmo hospital. Os dados relevantes dos prontuários foram anotados em ficha elaborada estritamente para este levantamento (ver Apêndice B). Com relação ao fluxo de entrada dos pacientes no HU-UFSC, ao ser constatada uma suspeita de NCLM-B, o paciente é encaminhado a um médico hematologista do Serviço, o qual solicita os exames de rotina e os exames com fins diagnósticos (IMF e IHQ). Após a coleta da amostra biológica, esta é direcionada simultaneamente aos setores de Onco-hematologia e Patologia, onde são processadas e analisadas e, em seguida, o laudo é emitido. O mesmo fica disponível no sistema de

informação. De acordo com o resultado do laudo, o paciente era incluído no presente estudo.

5.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos no estudo os pacientes portadores de NCLM-B cujo diagnóstico foi realizado no HU-UFSC entre junho de 2011 e outubro de 2014 e que foram acompanhados pelo Serviço de Hematologia do HU-UFSC. Apenas foram incluídos no estudo os pacientes que concordaram em assinar o TCLE (ver Apêndice A).

5.6 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo pacientes cujo prontuário não foi localizado ou não continha informações e aqueles que abandonaram o tratamento.

5.7 PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO

Para o presente estudo foram avaliadas as seguintes variáveis: idade, gênero, escolaridade, etnia, sorologias, manifestações clínicas ao diagnóstico, comorbidades, subtipo de NCLM-B, ano do diagnóstico, exames laboratoriais no momento do diagnóstico, estratificação do prognóstico, perfil imunofenotípico e imuno-histoquímico das células, protocolos de tratamento, resposta ao tratamento e óbito.

A estratificação do prognóstico, quando não descrita no prontuário, foi definida por um único pesquisador, de acordo com os dados clínicos e laboratoriais e subtipo de NCLM-B. O bem estar geral do paciente, ou *performance status*, quando não descrito no prontuário, foi estabelecido de acordo com o sistema de pontuação ECOG e as informações de anamnese e exame físico presentes no prontuário. Dessa forma, para se determinar o prognóstico dos pacientes portadores de MM foi aplicado o sistema de estadiamento ISS, para os portadores de LLC/LLP os sistemas Rai e Binet, para os portadores de LDGCB e LB o IPI e, por último, para os portadores de LF o FLIPI. Sendo que para os três últimos subtipos, os índices foram associados ao sistema Ann Arbor de estadiamento.

A resposta ao tratamento foi avaliada com base nos critérios estabelecidos pelo International Working Group Recommendations (CHESON et al., 1999) para pacientes com LCB e pelo International Myeloma Working Group (DURIE et al., 2006) para pacientes com MM. As categorias foram definidas como resposta completa/parcial e recidiva/progressão. Devido à falta de informações nos prontuários e de exames laboratoriais, não foi possível separar os pacientes com resposta completa daqueles com resposta parcial. Além disso, foram criadas as seguintes categorias: “expectantes”, para pacientes que não receberam tratamento; “tratamento comorbidades”, para aqueles em que foi necessário tratar comorbidades, como infecções, e assim não foi realizada a quimioterapia; “tratamento recusado”, para aqueles que se recusaram a realizar o tratamento; e “diagnóstico seguido de óbito”, para aqueles que foram a óbito antes mesmo de receber o tratamento.

A SG foi calculada como o intervalo em meses entre o diagnóstico e o óbito ou a data da última consulta médica na Instituição.

O fenótipo das células neoplásicas foi analisado pela ferramenta de fusão de arquivos (do inglês, *file merge*) do *software* de análise Infinicyt[®] segundo descrito por Pedreira e colaboradores (2008) (PEDREIRA et al., 2008). Em um primeiro momento, foi realizada a fusão dos arquivos de cada paciente, ou seja, da mesma amostra. Para em seguida realizar a fusão dos arquivos de cada paciente em um único arquivo, ou seja, de amostras diferentes. O produto final consiste em um arquivo contendo as informações de um grupo de pacientes que permite a visualização simultânea das populações de células neoplásicas em relação a todos os marcadores fenotípicos presentes no painel de anticorpos.

A expressão de beta-2-microglobulina nas células plasmocitárias neoplásicas foi avaliada por imunofenotipagem e os resultados foram expressos conforme a intensidade de fluorescência média representada por unidades arbitrárias (U.A.). A intensidade de fluorescência média da beta-2-microglobulina foi obtida subtraindo-se a intensidade de fluorescência média das células plasmocitárias clonais do canal do fluorocromo ficoeritrina-cianina (PC5) marcado com beta-2-microglobulina do canal PC5 sem marcação, a fim de excluir interferência de *background* (ruído).

A data do final da coleta de dados foi estabelecida como fevereiro de 2015.

5.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A confecção do banco de dados e a análise estatística foi realizada com o auxílio dos softwares SPSS® versão 17.0 e MedCalc® versão 12.3.0.0.

Foi realizada a análise descritiva dos dados, estimando-se as frequências absolutas e relativas das variáveis categóricas e as medidas de tendência central e de dispersão das variáveis contínuas. As variáveis contínuas foram testadas quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ou de Shapiro-Wilk. As variáveis numéricas foram comparadas entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney U ou do t de Student. A comparação de três ou mais variáveis foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis ou da análise de variância (ANOVA). As frequências obtidas nas variáveis categóricas foram comparadas entre pacientes pelo teste de chi-quadrado ou exato de Fisher. As curvas de sobrevida foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-rank.

Para determinar a concordância entre os exames de imunohistoquímica e de imunofenotipagem foi utilizado o teste Kappa. Esse teste foi aplicado apenas nos pacientes em que o diagnóstico foi baseado nos dois métodos. A concordância foi definida segundo os seguintes valores de Kappa: 1) 0 – 0,2: pobre; 2) 0,21 – 0,4: razoável; 3) 0,41 – 0,6: moderada; 4) 0,61 – 0,8: boa; 5) 0,81 – 1,0: excelente (ALTMAN, 1991).

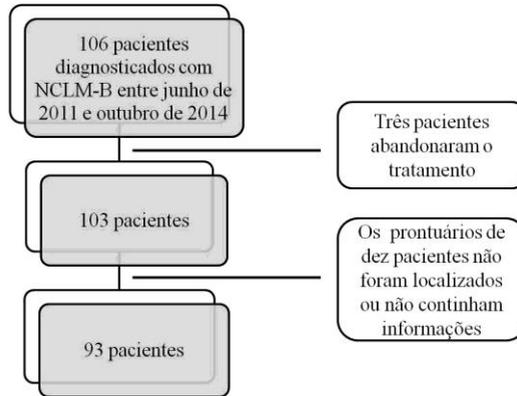
Foi considerado um nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram incluídos neste estudo 93 pacientes adultos portadores de NCLM-B cujo diagnóstico foi realizado entre junho de 2011 e outubro de 2014 no HU-UFSC e que foram acompanhados pelo Serviço de Hematologia do HU-UFSC (Figura 7).

Figura 7 – Número de pacientes conforme critérios de inclusão e exclusão



Nota: NCLM-B: neoplasias de células linfoides maduras B

A distribuição dos subtipos de NCLM-B diagnosticados segundo os critérios da OMS de 2008 englobam os LCB e as NCP. No presente estudo, entre os subtipos de LCB foram diagnosticados casos de LLC/LLP, LDGCB, LF, LB, LCB com aspectos intermediários (LCBAI) entre LDGCB e LB, tricoleucemia, linfoma da zona marginal (LZM), LCB não especificado (NE), LCM, linfoma linfoplasmacítico/macroglobulinemia de Waldenström (LLP/MW) e linfoma plasmablastico. Entre as NCP foram diagnosticados casos de MM, MGUS e LCP (Tabela 7). Como pode ser observado na Tabela 7, os subtipos de NCLM-B mais frequentes foram: MM, LLC/LLP, LDGCB, LF e LB.

Em relação ao método de IMF, o painel de quatro cores foi realizado para o diagnóstico de 46 pacientes (49,5%), o painel de transição entre quatro e oito cores para três pacientes (3,2%), e o painel de oito cores completo para 44 pacientes (47,3%).

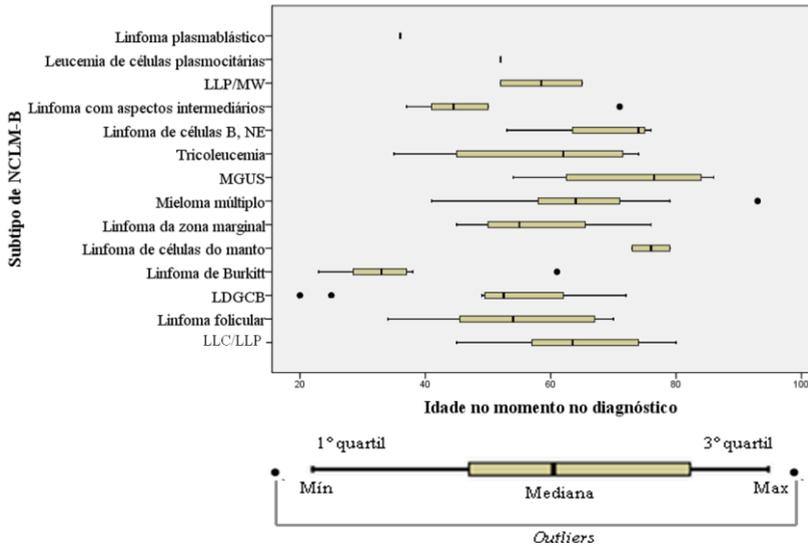
Tabela 7 – Distribuição dos pacientes de acordo com o subtipo de NCLM-B

Subtipo de NCLM-B	Número de pacientes	Frequência (%)
Mieloma múltiplo	22	23,7
LLC/LLP	14	15,1
LDGCB	12	12,9
Linfoma folicular	11	11,8
Linfoma de Burkitt	7	7,5
LCBAI	6	6,5
MGUS	4	4,3
Tricoleucemia	4	4,3
Linfoma da zona marginal	3	3,2
LCB, NE	3	3,2
LCM	2	2,2
LLP/MW	2	2,2
Linfoma plasmablástico	2	2,2
LCP	1	1,1
Total	93	100,0

Nota: NCLM-B: neoplasias de células linfoides maduras B; LLC/LLP: leucemia linfocítica crônica de células B/linfoma linfocítico de pequenas células; LDGCB: linfoma difuso de grandes células B; LCB: linfoma de células B; LCBAI: LCB com aspectos intermediários; MGUS: gamopatia monoclonal de significado indeterminado; NE: não especificado; LCM: linfoma de células do manto; LLP/MW: linfoma linfoplasmacítico/macroglobulinemia de Waldenström; LCP: leucemia de células plasmocitárias.

A mediana de idade dos 93 pacientes foi de 58 anos com um intervalo de 20 a 93 anos. A Figura 8 representa a variação entre as medianas de idade dos diferentes subtipos de NCLM-B. Posteriormente, esse parâmetro foi avaliado estatisticamente entre os subtipos de LCB e de NCP (ver Tabelas 10 e 16, respectivamente).

Figura 8 – Idade no momento do diagnóstico dos pacientes portadores de NCLM-B



Nota: NCLM-B: neoplasias de células linfoides maduras B; LLC/LLP: leucemia linfocítica crônica de células B/linfoma linfocítico de pequenas células; LDGCB: linfoma difuso de grandes células B; MGUS: gamopatia monoclonal de significado indeterminado; NE: não especificado; LLP/MW: linfoma linfoplasmacítico/macroglobulinemia de Waldenström.

Como mostra a Tabela 8, a qual apresenta as características gerais dos 93 pacientes portadores de NCLM-B estudados neste trabalho, pode-se observar que 53 (57%) dos pacientes eram do gênero masculino e 40 (43%) eram do gênero feminino, e que a maioria era de etnia caucasiana (85%). Em relação ao grau de instrução, a maior parte dos pacientes não concluiu o ensino fundamental (43,0%), seguido daqueles que concluíram o ensino fundamental (14,0%), o ensino médio (32,3%) e o ensino superior (9,7%).

Tabela 8 – Características gerais dos pacientes portadores de NCLM-B

Variável	Número de pacientes (n = 93)	Frequência (%)
Gênero		
Masculino	53	57,0
Feminino	40	43,0
Relação masculino/feminino	1,3	
Ano do diagnóstico		
2011	20	21,5
2012	21	22,6
2013	27	29,0
2014	25	26,9
Etnia		
Caucasiana	85	91,4
Outras	4	4,3
NI	4	4,3
Grau de Instrução		
Ensino fundamental incompleto	40	43,0
Ensino fundamental completo	13	14,0
Ensino médio completo	30	32,3
Ensino superior completo	9	9,7
NI	1	1,1
Sorologia para HIV		
Não reagente	65	69,9
Reagente	9	9,7
NI	19	20,4
Sorologia para HBV		
Não reagente	66	71,0
Reagente	5	5,4
NI	22	23,7
Sorologia para HCV		
Não reagente	69	74,2
Reagente	2	2,2
NI	22	23,7
Anti-HBS		
Não reagente	47	50,5
Reagente	11	11,8
NI	35	37,6

(continuação)

Variável	Número de pacientes (n = 93)	Frequência (%)
Tabagismo		
Não tabagista (relatado)	3	3,2
Ex-tabagista	11	11,8
Tabagista ativo	12	12,9
Tabagista passivo	1	1,1
NI	66	71,0
Exposição ocupacional a agrotóxicos		
Sim	7	7,5
Não	86	82,5
Neoplasia prévia		
Sim	6	6,5
Não	87	93,5
Diabetes		
Sim	16	17,2
Não	77	82,8
HAS		
Sim	44	47,3
Não	49	52,7

Nota: NCLM-B: neoplasias de células linfoides maduras B; NI: não informado; HIV: vírus da imunodeficiência humana; HBV: vírus da hepatite B; HCV: vírus da hepatite C; anti-HBS: anticorpo contra o HBV; HAS: hipertensão arterial sistêmica.

Dos 93 pacientes, nove (9,7%) eram soropositivos para o HIV. Dos nove pacientes, quatro eram portadores de LB. Um dos pacientes portadores de LB que era soropositivo para o HIV era também soropositivo para o HBV. Além disso, o paciente soropositivo para HBV portador de LDGCB era coinfestado pelo HCV, e um dos pacientes soropositivos para HIV portadores de LCBAI era coinfestado pelo HBV (Tabela 9). Em relação à infecção pelo EBV, avaliada por IHQ, apenas dois pacientes apresentaram resultado positivo: um portador de LDGCB e um de linfoma plasmablastico.

Tabela 9 – Distribuição dos pacientes soropositivos para HIV, HBV e HCV conforme subtipo de NCLM-B

HIV soropositivo (n = 9)	Linfoma de Burkitt (n = 4)
	Mieloma múltiplo (n = 1)
	LCBAI (n = 2)
	Linfoma plasmablástico (n = 2)
HBV soropositivo (n = 5)	Linfoma folicular (n = 1)
	LDGCB (n = 1)
	Linfoma de Burkitt (n = 1)
	Tricoleucemia (n = 1)
HCV soropositivo (n = 2)	LCBAI (n = 1)
	LDGCB (n = 1)
	LCBAI (n = 1)

Nota: NCLM-B: neoplasias de células linfoides maduras B; HIV: HIV: vírus da imunodeficiência humana; HBV: vírus da hepatite B; HCV: vírus da hepatite C; LDGCB: linfoma difuso de grandes células B; LCBAI: linfoma de células B com aspectos intermediários.

6.2 LINFOMAS DE CÉLULAS B

Do total de 93 pacientes incluídos no estudo, 66 (71,0%) foram diagnosticados com um subtipo de LCB. As características clínicas e laboratoriais dos pacientes de acordo com o subtipo de neoplasia podem ser observadas nas Tabelas 10 e 11.

Como mostra a Tabela 10, com relação à idade no momento do diagnóstico, foi observada uma diferença significativa entre o grupo LB e os grupos LLC/LLP ($P = 0,001$), LCB NE ($P = 0,041$) e LCM ($P = 0,016$). Os pacientes portadores de LCM foram os mais senis (mediana de 76 anos) enquanto que os pacientes portadores de LB foram os mais jovens (mediana de 33 anos).

Quando a atividade da LDH foi analisada, pode-se observar diferença significativa entre os subtipos de LCB avaliados ($P = 0,003$). Além disso, não foi observada diferença significativa ao comparar os subtipos que apresentaram atividade dessa enzima mais elevadas (LB, LCBAI e LDGCB).

Não houve diferença significativa para a relação entre os gêneros masculino e feminino nem para as concentrações de hemoglobina entre os diferentes subtipos de LCB (ver Tabela 10).

É importante destacar que os dois pacientes diagnosticados com linfoma plasmablástico apresentaram idade de 36 anos no momento do

diagnóstico e que a mediana da atividade da LDH dos pacientes com LCM não foi calculada, pois apenas um paciente tinha resultado desse exame.

A Tabela 11 mostra as características clínicas de maior importância no momento do diagnóstico de LCB e que estão intimamente relacionadas à definição do prognóstico: presença de sintomas B, de linfonodomegalias, de esplenomegalia e de doença *bulky*. A presença de sintomas B foi observada mais frequentemente nos pacientes diagnosticados com LB, enquanto que a presença de linfonodomegalia e de doença *bulky* foi mais comum naqueles diagnosticados com LDGCB. A presença de esplenomegalia foi observada principalmente nos casos de LF, tricoleucemia, LZM e LCB NE.

Os valores de referência dos parâmetros laboratoriais podem ser encontrados no Anexo A.

Tabela 10 – Idade, gênero, atividade de LDH e concentração de hemoglobina dos pacientes portadores de linfoma de células B

Subtipo de linfoma de células B (n = 66)	Número de casos n (%)	Idade no momento do diagnóstico Mediana (intervalo)	Gênero (M/F)	LDH (U/L)	Hemoglobina (g/dL)
				Mediana (intervalo)	Mediana (intervalo)
LLC/LLP	14 (21,2)	64 (45 – 80) ^a	1,3	188 (116 – 332) ^a	12,7 (7,4 – 16,8)
LDGCB	12 (18,2)	52 (20 – 72)	1,4	406 (184 – 2739) ^b	11,4 (8,3 – 16,5)
Linfoma folicular	11 (16,7)	54 (34 – 70)	2,7	229 (150 – 315) ^a	13,0 (5,3 – 17,1)
Linfoma de Burkitt	7 (10,6)	33 (23 – 61) ^b	2,5	1534 (243 – 7239) ^b	9,5 (5,8 – 14,9)
LCBAI	6 (9,1)	44 (37 – 71)	5,0	464 (170 - 6121) ^b	12,4 (7,1 – 15,0)
Tricoleucemia	4 (6,1)	62 (35 – 74)	3,0	152 (141 - 402) ^a	11,0 (9,1 – 13,8)
LZM	3 (4,5)	55 (45 – 76)	2,0	137 (113 – 397) ^a	11,3 (6,8 – 14,5)
LCB NE	3 (4,5)	74 (53 – 76) ^a	2,0	215 (182 - 232) ^a	12,3 (9,5 – 15,3)
LCM	2 (3,0)	76 (73 – 79) ^a	1,0	222	11,4 (10,7 – 12,1)
LLP/MW	2 (3,0)	58 (52 – 65)	1,0	214 (128 - 300) ^a	9,2 (8,9 – 9,4)
Linfoma plasmablástico	2 (3,0)	36	0,5	174 (148 - 199) ^a	9,3 (8,7 – 9,9)

Nota: LLC/LLP: leucemia linfocítica crônica de células B/linfoma linfocítico de pequenas células; LDGCB: linfoma difuso de grandes células B; LCBAI: linfoma de células B com aspectos intermediários; LZM: linfoma da zona marginal; LCB NE: linfoma de células B (não especificado); LCM: linfoma de células do manto; LLP/MW: linfoma linfoplasmacítico/macroglobulinemia de Waldenström; M/F: relação entre os gêneros masculino e feminino; LDH: lactato desidrogenase. Houve diferença significativa entre “a” e “b” em relação à idade do momento do diagnóstico pelos testes ANOVA e post hoc Bonferroni. Houve diferença significativa entre “a” e “b” em relação à atividade de LDH pelos testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney U.

Tabela 11 – Apresentação de sintomas B, de linfonodomegalia, de esplenomegalia e de doença *bulky* no momento do diagnóstico de acordo com os subtipos de linfomas de células B

Subtipo de linfoma de células B (n = 66)	Sintomas B n (%)	Linfonodomegalia n (%)	Esplenomegalia n (%)	Doença <i>bulky</i> n (%)
LLC/LLP (n = 14)	2 (14,3)	6 (42,9)	1 (7,1)	0
LDGCB (n = 12)	4 (33,3)	9 (75,0)	0	5 (41,7)
Linfoma folicular (n = 11)	2 (18,2)	6 (54,5)	3 (27,3)	1 (9,1)
Linfoma de Burkitt (n = 7)	6 (85,7)	1 (14,3)	0	1 (14,3)
LCBAI (n = 6)	2 (33,3)	3 (50,0)	1 (16,7)	0
Tricoleucemia (n = 4)	0	0	1 (25,0)	0
LZM (n = 3)	0	1 (33,3)	1 (33,3)	0
LCB NE (n = 3)	0	0	1 (33,3)	0
LCM (n = 2)	0	1 (50,0)	0	0
LLP/MW (n = 2)	0	0	0	0
Linfoma plasmablastico (n = 2)	1 (50,0)	0	0	0

Nota: LLC/LLP: leucemia linfocítica crônica de células B/linfoma linfocítico de pequenas células; LDGCB: linfoma difuso de grandes células B; LCBAI: linfoma de células B com aspectos intermediários; LZM: linfoma da zona marginal; LCB NE: linfoma de células B (não especificado); LCM: linfoma de células do manto; LLP/MW: linfoma linfoplasmacítico/macroglobulinemia de Waldenström.

Como pode ser observado nas Tabelas 12 e 13, que mostram o número de pacientes que apresentaram infiltração de MO e de SNC no momento do diagnóstico, todos os pacientes diagnosticados com LLC/LLP, tricoleucemia, LZM, LCB NE, LCM e LLP/MW apresentaram a MO infiltrada pela neoplasia, enquanto que a infiltração do SNC foi observada apenas nos subtipos LB e LCBAI. Vale ressaltar que foram avaliados apenas os casos em que as amostras de MO (53 pacientes) ou de líquido (12 pacientes) foram analisadas por IMF e/ou IHQ.

Tabela 12 – Distribuição dos subtipos de linfomas de células B de acordo com a presença de infiltração de medula óssea no momento do diagnóstico

Subtipo de linfoma de células B (n = 53)	Presença de infiltração de MO	
	n	%
LLC/LLP (n = 5)	5	100,0
LDGCB (n = 12)	3	25,0
Linfoma folicular (n = 9)	7	77,8
Linfoma de Burkitt (n = 7)	6	85,7
LCBAI (n = 6)	1	16,7
Tricoleucemia (n = 4)	4	100,0
LZM (n = 1)	1	100,0
LCB NE (n = 3)	3	100,0
LCM (n = 2)	2	100,0
LLP/MW (n = 2)	2	100,0
Linfoma plasmablástico (n = 2)	1	50,0

Nota: MO: medula óssea; LLC/LLP: leucemia linfocítica crônica de células B/linfoma linfocítico de pequenas células; LDGCB: linfoma difuso de grandes células B; LCBAI: linfoma de células B com aspectos intermediários; LZM: linfoma da zona marginal; LCB NE: linfoma de células B (não especificado); LCM: linfoma de células do manto; LLP/MW: linfoma linfoplasmacítico/macroglobulinemia de Waldenström.

Tabela 13 – Distribuição dos subtipos de linfomas de células B de acordo com a presença de infiltração de sistema nervoso central no momento do diagnóstico

Subtipo de linfoma de células B (n = 12)	Presença de infiltração de SNC	
	n	%
LDGCB (n = 2)	0	
Linfoma de Burkitt (n = 6)	3	50,0
LCBAI (n = 2)	2	100,0
Linfoma plasmablástico (n = 2)	0	

Nota: SNC: sistema nervoso central; LDGCB: linfoma difuso de grandes células B; LCBAI: linfoma de células B com aspectos intermediários.

A Tabela 14 mostra os resultados da porcentagem de expressão do antígeno nuclear e nucleolar Ki-67, a qual indica o índice de proliferação celular e é avaliada pela técnica de IHQ. Como demonstrado nessa Tabela, a mediana da positividade dessa proteína não foi calculada para os subtipos LCB NE, LCM e linfoma plasmablástico, pois essa análise foi realizada em apenas um caso de cada subtipo. Foi observada diferença significativa entre os grupos ($P = 0,013$). Além disso, ao comparar os subtipos LB, LDGCB e LCBAI, os quais apresentaram porcentagens mais elevadas, não foi observada diferença significativa.

Tabela 14 – Porcentagem de expressão de Ki-67 pelas células neoplásicas dos pacientes portadores de linfoma de células B

Subtipo de linfoma de células B (n = 30)	Ki-67 (%)	
	Mediana	Intervalo
LLC/LLP (n = 2)	30,0 ^a	10,0 – 50,0
LDGCB (n = 10)	80,0 ^b	50,0 – 95,0
Linfoma folicular (n = 6)	35,0 ^a	10,0 – 50,0
Linfoma de Burkitt(n = 4)	92,5 ^b	50,0 – 95,0
LCBAI (n = 5)	80,0 ^b	30,0 – 95,0
LCB NE (n = 1)	<1,0	
LCM (n = 1)	40,0	
Linfoma plasmablástico (n = 1)	20,0	

Nota: LLC/LLP: leucemia linfocítica crônica de células B/linfoma linfocítico de pequenas células; LDGCB: linfoma difuso de grandes células B; LCBAI: linfoma de células B com aspectos intermediários; LCB NE: linfoma de células B (não especificado); LCM: linfoma de células do manto. Houve diferença significativa entre “a” e “b” pelos testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney U.

Como supracitado, a expressão do CD10 é um dos marcadores que indica que o LCB foi originado no CG, sendo assim é importante avaliar a positividade desse marcador nas amostras dos pacientes portadores de LDGCB. Do total de 12 pacientes diagnosticados com LDGCB, cinco apresentaram expressão de CD10 tanto por IHQ como por IMF. Em três desses cinco pacientes, além do CD10, também foi observada a expressão de Bcl-6 por IHQ, outro marcador indicativo de LCB da região do CG. Além disso, de todos os casos, apenas um paciente apresentou expressão de CD5 nas células neoplásicas (Tabela 15).

Tabela 15 – Expressão dos antígenos CD10 e CD5 entre os casos de LDGCB

Número de casos de LDGCB		
(n = 12)		
CD10	n	%
Negativo	5	41,7
Positivo	5	41,7
Inconclusivo	1	8,3
Não realizado	1	8,3
CD5	n	%
Negativo	9	75,0
Positivo	1	8,3
Não realizado	2	16,7

Nota: LDGCB: linfoma difuso de grandes células B.

6.3 NEOPLASIAS DE CÉLULAS PLASMOCITÁRIAS

Do total de 93 pacientes incluídos no estudo, 27 (29,0%) foram diagnosticados com um subtipo de NCP. As características clínicas e laboratoriais dos pacientes podem ser encontradas nas Tabelas 16 e 17.

Para as análises estatísticas, o único caso de LCP foi excluído. Entre os grupos MM e MGUS não houve diferença significativa quando se comparou a idade, assim como a relação entre os gêneros masculino e feminino.

Alguns dados não foram incluídos na Tabela 17, pois os exames não foram realizados no momento do diagnóstico. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação aos exames laboratoriais.

Tabela 16 – Distribuição dos subtipos de neoplasias de células plasmocitárias de acordo com a idade e o gênero dos pacientes

Subtipo de NCP	Número de casos	Idade no momento do diagnóstico	Gênero
(n = 29)	n (%)	Mediana (intervalo)	(M/F)
MM	22 (81,5)	64 (41 – 93)	0,6
MGUS	4 (14,8)	76 (54 – 86)	1,0
LCP	1 (3,7)	52	M

Nota: NCP: neoplasia de células plasmocitárias; MM: mieloma múltiplo; MGUS: gamopatia monoclonal de significado indeterminado; LCP: leucemia de células plasmocitárias; M/F: relação entre os gêneros masculino e feminino; M: gênero masculino.

Tabela 17 – Características laboratoriais dos pacientes portadores de neoplasias de células plasmocitárias

	MM (n = 22)	MGUS (n = 4)	LCP (n = 1)
LDH (U/L)			
Mediana	166	203	268
(intervalo)	(96 - 583)		
Hemoglobina (g/dL)			
Mediana	8,3	10,3	10,7
(intervalo)	(5,6 – 15,0)	(8,0 – 13,6)	
B2M (ng/mL)			
Mediana	7.887,0	6.207,5	NR
(intervalo)	(1.535,0 – 33.275,0)	(1.922,0 – 17.333,0)	
Cálcio (mg/dL)			
Mediana	9,0	8,8	15,3
(intervalo)	(7,1 – 16,2)	(8,8 – 10,0)	
Ureia (mg/dL)			
Mediana	51,5	72,0	75,0
(intervalo)	(29,0 – 192,0)	(37,0 – 129,0)	
Creatinina (mg/dL)			
Mediana	1,4	1,8	2,0
(intervalo)	(0,9 – 5,3)	(0,8 – 3,3)	
Albumina (g/dL)			
Mediana	2,2	NR	2,4
(intervalo)	(1,2 – 3,6)		

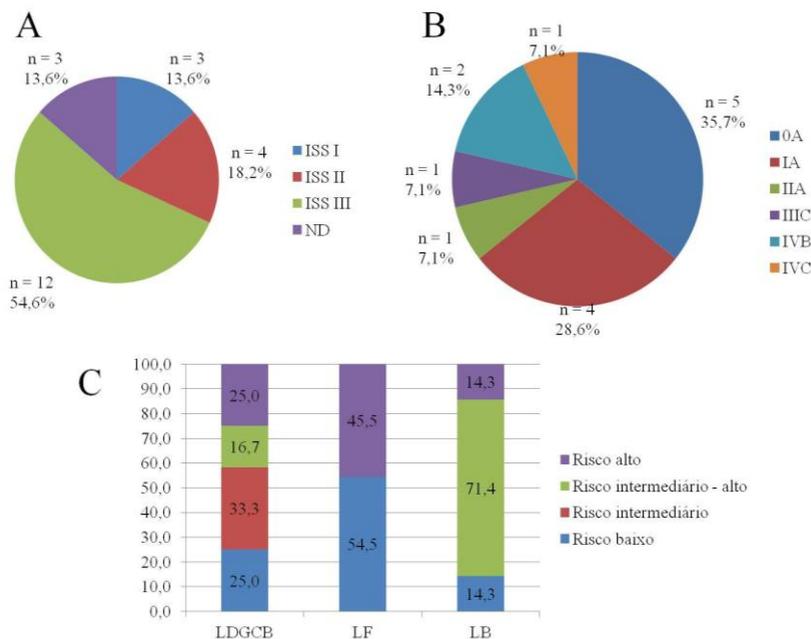
Nota: NCP: neoplasia de células plasmocitárias; MM: mieloma múltiplo; MGUS: gamopatia monoclonal de significado indeterminado; LCP: leucemia de células plasmocitárias; LDH: lactato desidrogenase; B2M: beta-2-microglobulina; NR: não realizado.

Do total de pacientes diagnosticados com MM, 13 (59,1%) apresentavam o componente monoclonal do tipo IgG, enquanto que apenas dois (9,1%) esse componente era do tipo IgA. Do restante, quatro casos foram considerados como portadores de MM não secretor, e em outros três, a dosagem das imunoglobulinas não foi realizada.

6.4 AVALIAÇÃO DOS SUBTIPOS MAIS FREQUENTES DE NCLM-B

Com o objetivo de determinar a estratificação prognóstica dos pacientes, foram avaliados apenas os subtipos mais frequentes de NCLM-B encontrados no presente estudo: MM, LLC/LLP, LDGCB, LF e LB, os quais somaram 66 pacientes. Essa medida foi tomada a fim de analisar um maior número de pacientes portadores de um mesmo subtipo de neoplasia. Como pode ser observado na Figura 9, a maioria dos pacientes diagnosticados com MM (54,6%) foi estratificada no estágio ISS III, ou seja, o de maior risco. Enquanto que a maioria dos pacientes portadores de LLC/LLP (64,3%) foi estratificada nos estágios 0A e IA, ou seja, de menor risco. Um pouco mais da metade dos pacientes portadores de LF apresentaram risco baixo ao diagnóstico, enquanto que 71,4% dos pacientes portadores de LB foram estratificados como de risco intermediário-alto e apenas 25,0% daqueles classificados como LDGCB foram classificados como de risco baixo.

Figura 9 – Estratificação prognóstica dos pacientes portadores dos subtipos mais frequentes de NCLM-B.



Nota: (A) Mieloma múltiplo (n = 22), (B) LLC/LLP (n = 14), (C) LDGCB (n = 12), LF (n = 11) e LB (n = 7). ISS: International Staging System; ND: não definido pela ausência do resultado do exame de beta-2-microglobulina. LLC/LLP: leucemia linfocítica crônica de células B/linfoma linfocítico de pequenas células; LDGCB: linfoma difuso de grandes células B; LF: linfoma folicular; LB: linfoma de Burkitt.

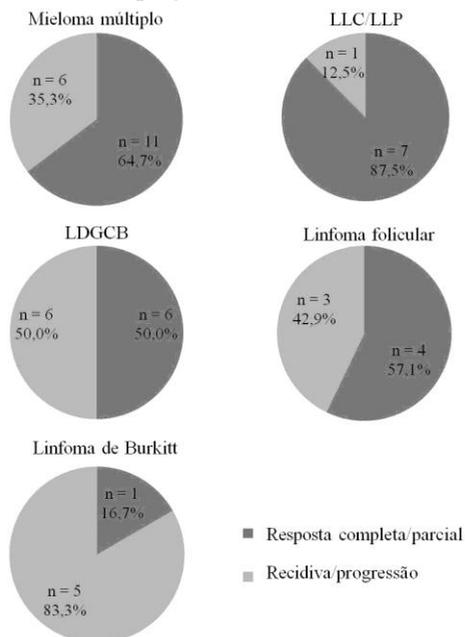
Após a estratificação prognóstica dos pacientes, foi avaliado o tipo de resposta ao tratamento, a frequência de óbito e as curvas de SG. As Tabelas detalhadas contendo informações de cada paciente, incluindo os protocolos de tratamento aplicados, podem ser encontradas nos Apêndices C a G.

A resposta ao tratamento foi avaliada como resposta completa/parcial ou recidiva/progressão. É importante ressaltar que foram avaliados apenas os pacientes diagnosticados com os subtipos mais frequentes de NCLM-B e que receberam tratamento quimioterápico. Observa-se que em todos os subtipos, exceto o LB, 50% ou mais dos pacientes apresentaram resposta completa/parcial.

Infelizmente, em mais de 80% dos casos de LB a neoplasia recidivou ou progrediu (ver Figura 10).

Aqueles pacientes em que não foi necessário ou não foi possível realizar o tratamento quimioterápico, foram classificados nas categorias “expectantes”, “tratamento comorbidades”, “tratamento recusado” e “diagnóstico seguido de óbito”. Esses dados também podem ser observados nos Apêndices C a G.

Figura 10 – Distribuição dos pacientes de acordo com a resposta ao tratamento completa/parcial ou recidiva/progressão



Nota: LLC/LLP: leucemia linfocítica crônica de células B/linfoma linfocítico de pequenas células; LDGCB: linfoma difuso de grandes células B.

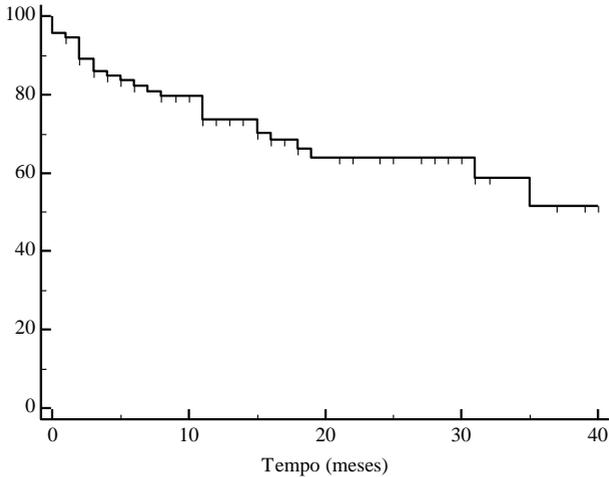
Inicialmente, a frequência de óbito e a curva de SG foram avaliadas de todos os 93 pacientes incluídos no estudo (ver Figura 11). Em seguida, calculou-se separadamente a SG dos subtipos de NCLM-B mais frequentes (ver Figura 12).

A frequência de óbito dos pacientes portadores de NCLM-B durante o período de estudo foi de 31,2%, ou seja, 29 dos 93 pacientes foram a óbito. As principais causas de óbito foram infecções

secundárias, que levaram 11 pacientes a óbito, seguidas de complicações da progressão da NCLM-B, responsável por sete óbitos, e de complicações da infecção pelo HIV, que levou três paciente a óbito.

A média da SG dos 93 pacientes foi de 27,6 meses (intervalo de confiança de 95%: 24,0 a 31,2 meses).

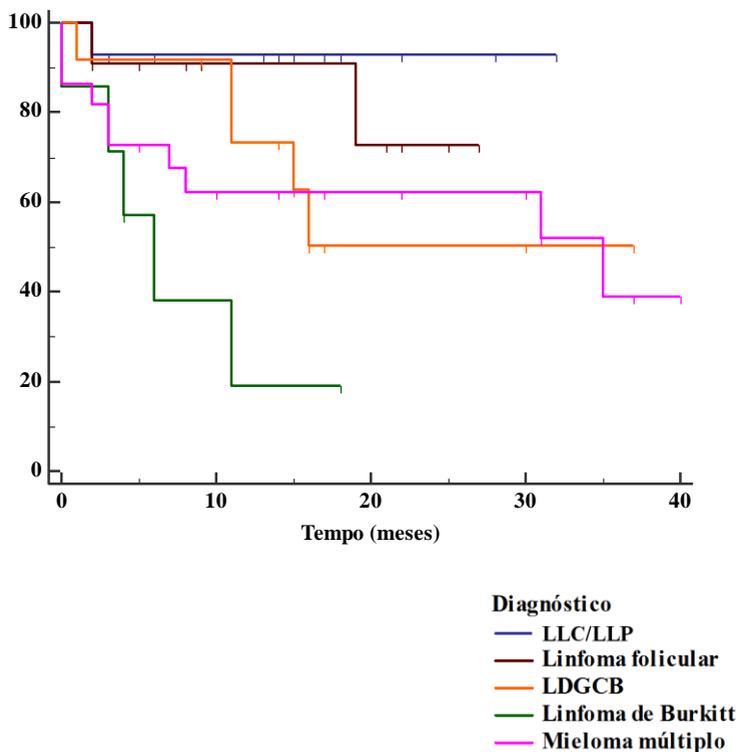
Figura 11 – Curva de sobrevida global dos pacientes diagnosticados com NCLM-B (n = 93)



Nota: NCLM-B: neoplasias de células linfoides maduras B

Como pode ser observado na Figura 12 e Tabela 18, os pacientes com LB apresentaram SG significativamente menor que a dos portadores de LLC/LLP ($P = 0,0021$), de LF ($P = 0,0121$) e de LDGCB ($P = 0,0412$). Além disso, observa-se que a SG dos pacientes portadores de LLC/LLP tende a ser maior que a dos portadores de MM ($P = 0,0530$).

Figura 12 – Curva de sobrevida global dos pacientes diagnosticados com as NCLM-B mais frequentes separadas por subtipo



Nota: NCLM-B: neoplasias de células linfoides maduras B; LLC/LLP: leucemia linfocítica crônica de células B/linfoma linfocítico de pequenas células; LDGCB: linfoma difuso de grandes células B.

Tabela 18 – Média de sobrevida global dos subtipos mais frequentes de NCLM-B

Subtipo de NCLM-B	Tempo médio de SG (meses)	Intervalo de confiança de 95% (meses)
Mieloma múltiplo	23,3	16,5 – 30,2
LLC/LLP	32,6	28,2 – 37,1 ^a
LDGCB	14,7	11,9 – 17,6 ^a
Linfoma folicular	24,0	19,0 – 29,0 ^a
Linfoma de Burkitt	7,9	2,8 – 12,9 ^b

Nota: NCLM-B: neoplasias de células linfoides maduras B; LLC/LLP: leucemia linfocítica crônica de células B/linfoma linfocítico de pequenas células; LDGCB: linfoma difuso de grandes células B; SG: sobrevida global. Houve diferença significativa entre “a” e “b” em relação ao tempo de SG pelo teste de Log-rank.

Como visto anteriormente, a IMF vem sendo utilizada para o diagnóstico de diferentes neoplasias hematológicas; no entanto, o método considerado como padrão ouro para o diagnóstico das NCLM-B é a IHQ. Sendo assim, em outra etapa do trabalho, foram analisados os graus de concordância entre esses exames para os subtipos mais frequentes de NCLM-B em que havia resultados dos exames pelos dois métodos. A concordância entre os exames de IMF e IHQ foi de 100%, 47,5%, 93,2%, 71,7% e 46,9%, para os subtipos MM, LLC/LLP, LDGCB, LF e LB, respectivamente (Tabela 19).

Tabela 19 – Graus de concordância entre os exames de imunofenotipagem e de imuno-histoquímica para os subtipos mais frequentes de NCLM-B

Subtipo de NCLM-B	Valor de Kappa	P	Concordância
Mieloma múltiplo	1,000	< 0,001	Excelente
LLC/LLP	0,475	0,216	Moderada
LDGCB	0,932	0,067	Excelente
Linfoma folicular	0,717	0,131	Boa
Linfoma de Burkitt	0,469	0,224	Moderada

Nota: P: valor de P para o teste Kappa; NCLM-B: neoplasias de células linfoides maduras B; LLC/LLP: leucemia linfocítica crônica de células B/linfoma linfocítico de pequenas células; LDGCB: linfoma difuso de grandes células B.

6.5 PERFIL DE EXPRESSÃO DOS MARCADORES FENOTÍPICOS DOS SUBTIPOS MAIS FREQUENTES DE NCLM-B

Nessa etapa dos resultados, foram avaliados apenas os pacientes diagnosticados com os subtipos mais frequentes de NCLM-B cujo diagnóstico foi realizado pela IMF com oito cores, ou seja, a partir de abril de 2013. Dessa forma, foram avaliados sete casos de LLC/LLP, cinco de LDGCB, quatro de LF, quatro de LB e oito de MM (ver Tabelas 20 e 21).

Posteriormente, a expressão dos marcadores fenotípicos foi avaliada pela fusão de arquivos (*file merge*) dos pacientes (ver 14 a 19). O objetivo do gráfico gerado por essa ferramenta é permitir a análise da expressão dos marcadores nas amostras de uma forma global. Dessa forma, os histogramas representam a expressão dos marcadores pelas células neoplásicas. Quanto mais deslocados para a direita do gráfico, maior é a expressão de determinado parâmetro pelas células. Quanto menor a amplitude do histograma, mais homogênea é a expressão de determinado parâmetro pelas células. Finalmente, a presença de dois ou mais histogramas para um mesmo parâmetro indica populações diferentes de células com expressões distintas. Nos histogramas, os parâmetros FSC e SSC estão em escala linear, enquanto que os demais parâmetros estão em escala *logical* ou bi-exponencial.

Não foi possível realizar a fusão de arquivos de todos os pacientes diagnosticados com o painel de oito cores, devido a algumas limitações, tais como a alteração de configuração quando amostras foram adquiridas em outro equipamento e o pouco volume de amostra não permitindo a realização do painel completo.

Tabela 20 – Perfil de expressão de marcadores nas células neoplásicas dos vinte pacientes portadores dos subtipos mais frequentes de linfoma de células B diagnosticados com o painel de oito cores do grupo Euroflow “doenças linfoproliferativas de células B”

	LLC/LLP (n = 7)	LDGCB (n = 5)	LF (n = 4)	LB (n = 4)
CD5	+	-	-	-
CD38	-/+	+	-/+	++
CD20	-/+	+	+	-/+++
CD45	++	+ /+++	++	+ /+++
CD23	+	-	-/+	-
CD10	-	-/+	+	+
CD200	+	-/+	-/+	-
CD79b	-/+	+	-/+	-/+
CD43	-/+	-	-/+	-/+
CD31	-/+	-	-	-
LAIR-1	-/+	-	-/+	-
CD11c	-/+	-/+	-	-/+
sIgM	-/+	++	-/+	+ /+++
CD81	-/+	+	-/+	+ /+++
CD103	-	-	-	-
CD95	-	-	-/+	-
CXCR5	+	+	+	-/+
CD49d	-/+	-	-/+	-/+
CD62L	-/+	-	-/+	-
CD39	+	+	-	-
CD27	-/+	-	-/+	-/+
Bcl-2	NA	+	+	-/+

Nota: LLC/LLP: leucemia linfocítica crônica de células B/linfoma linfocítico de pequenas células; LDGCB: linfoma difuso de grandes células B; LF: linfoma folicular; LB: linfoma de Burkitt; NA: não avaliado; +: positivo em todos os casos; ++: fortemente positivo em todos os casos; +/++: casos positivos e casos fortemente positivos; -/+ : casos negativos e casos positivos; -: negativo em todos os casos.

Tabela 21 – Distribuição dos oito casos de mieloma múltiplo diagnosticados com o painel de oito cores do grupo Euroflow “neoplasias de células plasmocitárias” em relação ao perfil de expressão de marcadores nas células plasmocitárias

Marcador	Número de casos n (%)		
	Expressão positiva	Expressão heterogênea (de negativa a positiva)	Expressão negativa
CD56	8 (100,0)	0	0
B2M	8 (100,0)	0	0
CD28	0	1 (12,5)	7 (87,5)
CD27	2 (25,0)	2 (25,0)	4 (50,0)
CD117	2 (25,0)	1 (12,5)	5 (62,5)
CD81	3 (37,5)	2 (25,0)	3 (37,5)
CD20	0	0	8 (100,0)
CD45	1 (12,5)	2 (25,0)	5 (62,5)

Nota: Todos os casos coexpressavam CD38 e CD138, além da ausência de expressão de CD19. B2M: beta-2-microglobulina.

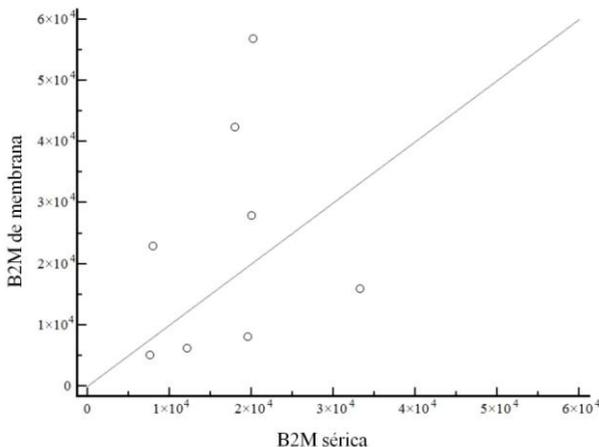
Como pode ser observado na Tabela 21 e na Figura 14, as células plasmocitárias neoplásicas dos oito pacientes portadores de MM apresentaram perda da expressão de CD19 e CD27, normalmente expressos em células plasmocitárias normais. Em contraste, observou-se a expressão aberrante, brilhante e homogênea de CD56 em todos os casos, a qual não é observada em células plasmocitárias normais. Praticamente em todos os casos não se observou a expressão de CD28 (n = 7). Pode-se observar ainda, a expressão heterogênea de CD45, com casos que variaram de negativos a positivos; no entanto, a grande maioria dos casos (n = 5) não apresentou expressão desse marcador, o que também é uma característica aberrante das células plasmocitárias neoplásicas. De uma forma homogênea, todos os oito casos de MM apresentaram expressão de B2M, em contraste, a expressão de CD81 foi heterogênea, com casos positivos, casos com expressão variável (de negativo a positivo) e casos negativos.

Em relação ao fenótipo dos pacientes diagnosticados com LLC/LLP (ver Tabela 20 e Figura 14), observou-se que todos os casos avaliados coexpressaram CD5 e CD23, e não expressaram CD10. Destaca-se entre os novos marcadores, a expressão brilhante de CD200 em todos os casos, a positividade para o CD39 e o CD62L, a negatividade homogênea para o CD95 e a expressão do CD49d em cinco dos sete casos em que o marcador foi avaliado.

Já na análise do fenótipo dos subtipos LDGCB, LF e LB (ver Tabela 20 e Figuras 16 a 19) pode-se constatar que a expressão de CD10 foi homogênea no LF e no LB, enquanto que no LDGCB foi heterogênea. De forma interessante, observou-se uma expressão crescente de CD19 e CD38 com o LDGCB com expressão mais fraca e o LB com expressão mais brilhante, enquanto que o contrário pode ser observado para o CD22. A expressão de CD45 parece ser de intensidade mais fraca no LF e no LB. A expressão de CD43 e de CD49d parece ser mais intensa no LB do que nos outros subtipos. A expressão de IgM de superfície tende a ser brilhante no LDGCB e no LB, enquanto que no LF é menos intensa. A expressão de CD81 nas células dos pacientes com LB se destacou por ser particularmente forte. O CD95 parece ter intensidade discretamente maior no LDGCB e no LF do que no LB. Enquanto que o CD39 apresentou maiores intensidades de expressão para o LDGCB.

Posteriormente, a expressão de B2M nas células plasmocitárias neoplásicas foi correlacionada com a concentração sérica dessa proteína. Quando os valores da intensidade de fluorescência média (IFM) das células plasmocitárias foram comparados às concentrações séricas, não foi possível observar correlação entre os dois parâmetros (Figura 13). Além disso, não foi possível relacionar as concentrações séricas de B2M à agressividade da doença.

Figura 13 – Beta-2-microglobulina sérica e de membrana dos oito casos de mieloma múltiplo diagnosticados com o painel de oito cores



Nota: B2M: beta-2-microglobulina

Adicionalmente, no Apêndice H, podem ser observadas imagens das células neoplásicas em amostras de pacientes diagnosticados com NCLM-B do presente estudo. Essa parte do trabalho objetivou caracterizar morfológicamente essas células neoplásicas a fim de auxiliar diagnósticos futuros.

Figura 14 – Histogramas da expressão de 14 parâmetros nas células plasmocitárias neoplásicas dos pacientes diagnosticados com mieloma múltiplo, utilizando-se o painel de oito cores (n = 6)

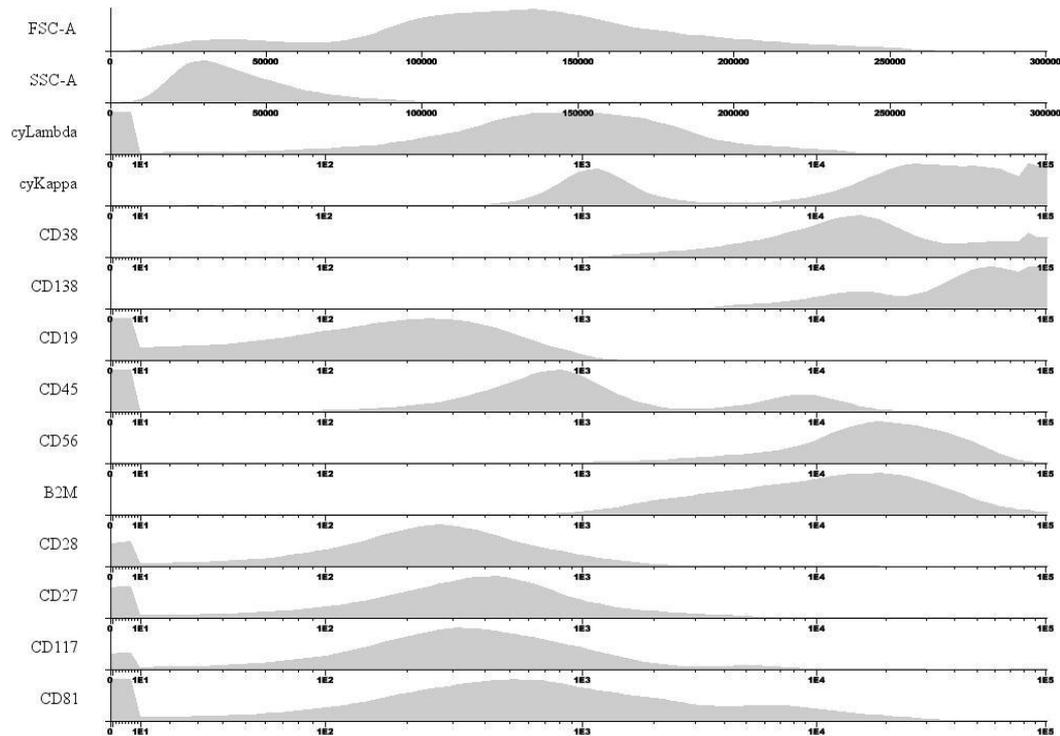


Figura 15 – Histogramas da expressão de 27 parâmetros nas células neoplásicas dos pacientes diagnosticados com leucemia linfocítica crônica de células B/linfoma linfocítico de pequenas células, utilizando-se o painel de oito cores (n = 5)

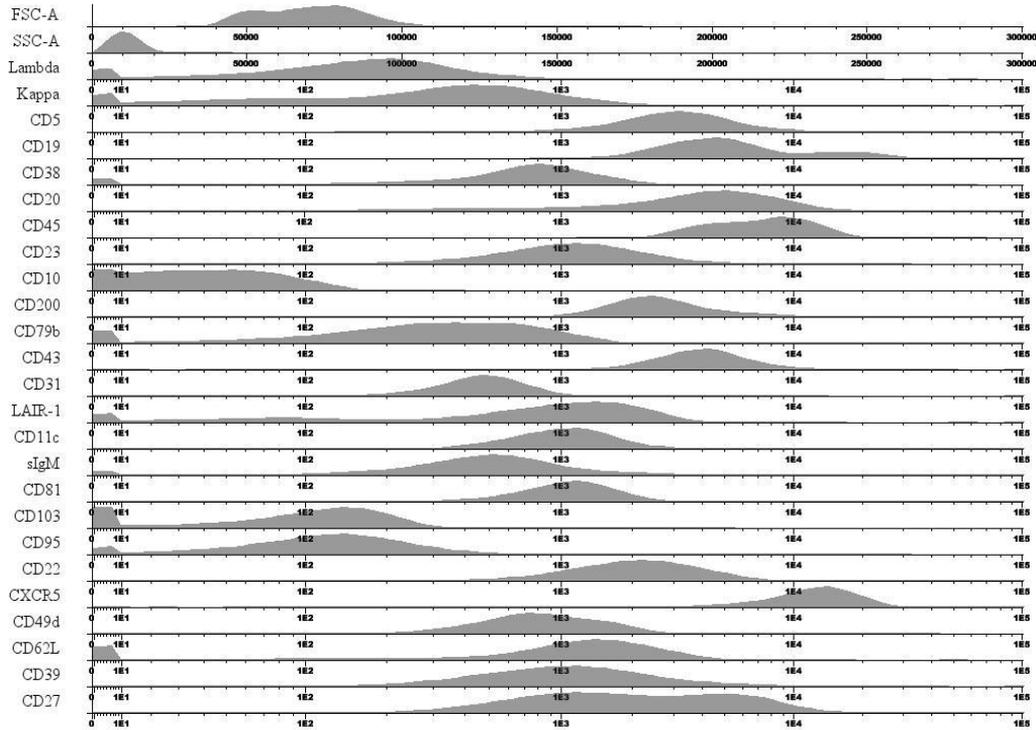


Figura 16 – Histogramas da expressão de 27 parâmetros nas células neoplásicas dos pacientes diagnosticados com linfoma difuso de grandes células B, utilizando-se o painel de oito cores (n = 4)

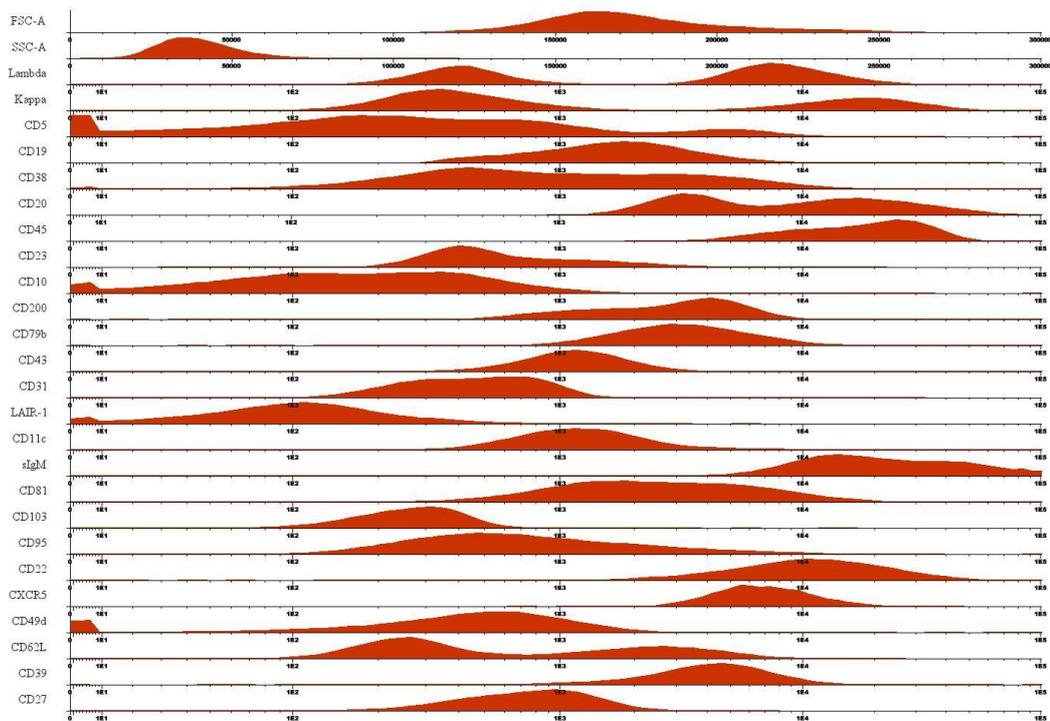


Figura 17 – Histogramas da expressão de 27 parâmetros nas células neoplásicas dos pacientes diagnosticados com linfoma folicular, utilizando-se o painel de oito cores (n = 4)

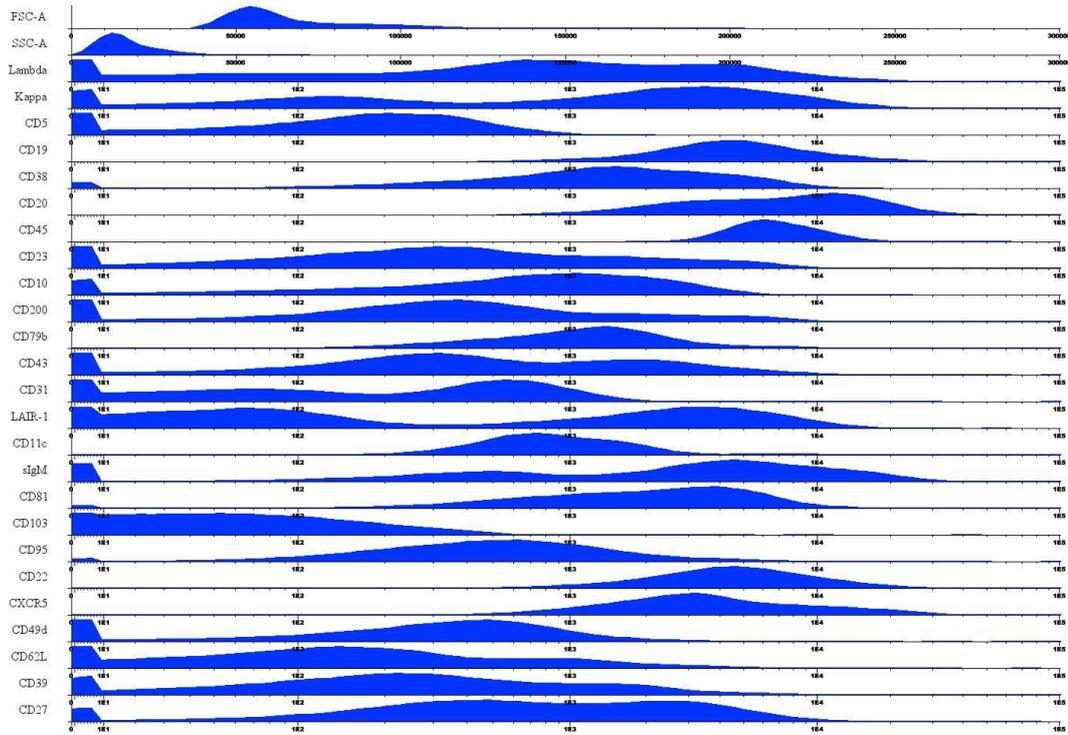


Figura 18 – Histogramas da expressão de 27 parâmetros nas células neoplásicas dos pacientes diagnosticados com linfoma de Burkitt, utilizando-se o painel de oito cores (n = 3)

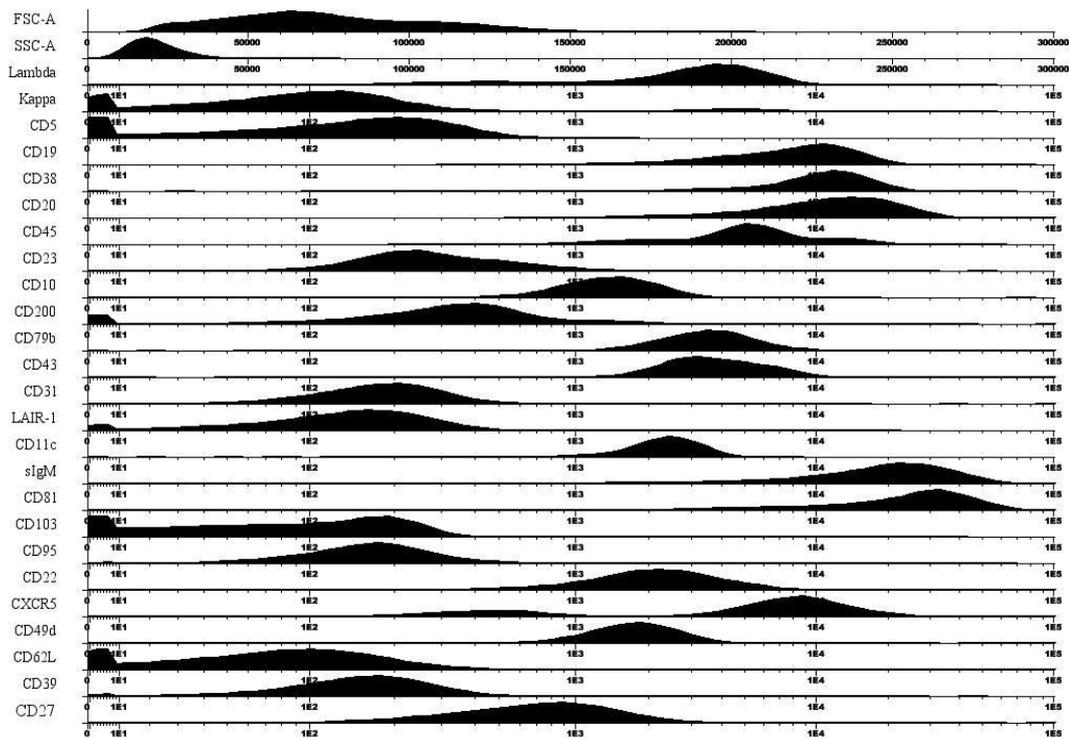


Figura 19 – Histogramas sobrepostos da expressão de 27 parâmetros nas células neoplásicas dos pacientes diagnosticados com linfoma difuso de grandes células B (vermelho), linfoma folicular (azul) e linfoma de Burkitt (preto), utilizando-se o painel de oito cores

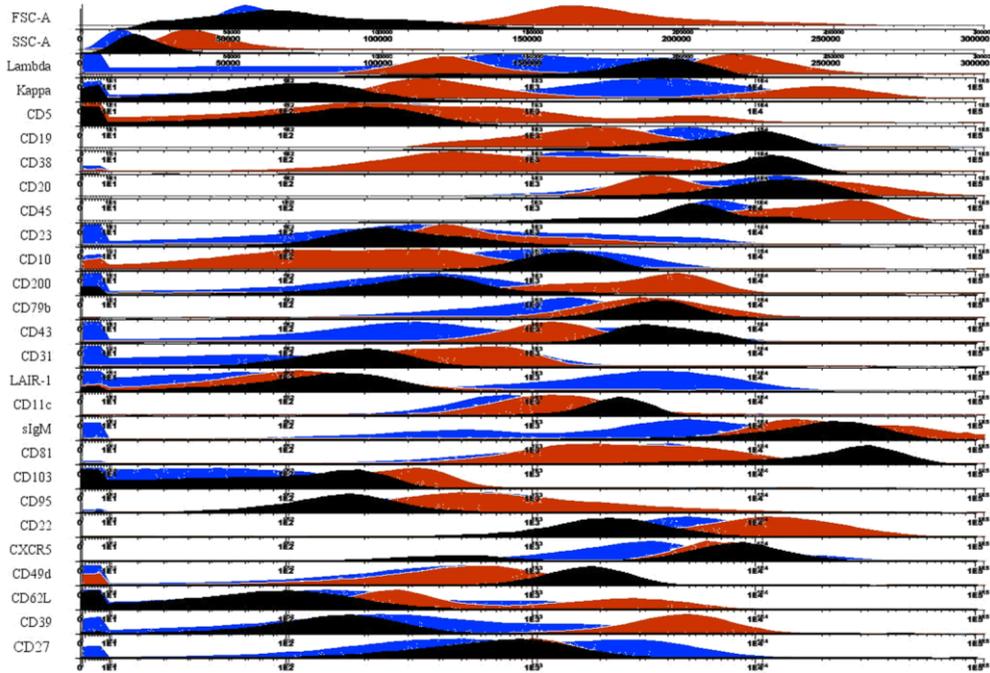
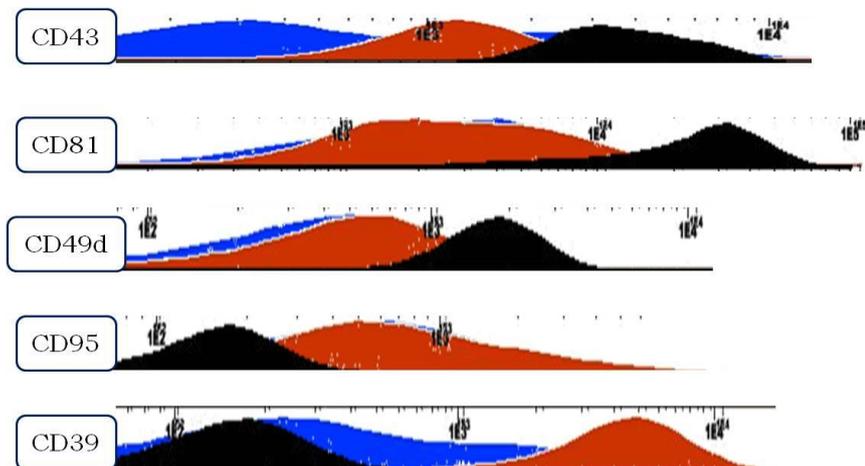


Figura 20 – Principais marcadores presentes no painel de oito cores que apresentaram diferenças de expressão entre os pacientes diagnosticados com linfoma difuso de grandes células B (vermelho), linfoma folicular (azul) e linfoma de Burkitt (preto).



7 DISCUSSÃO

As NCLM-B constituem um grupo heterogêneo de doenças caracterizadas pela expansão clonal de células linfoides maduras do tipo B (SWERDLOW et al., 2008). Essas neoplasias compreendem um grupo de doenças cujas taxas de incidência e mortalidade vêm crescendo mundialmente (LUZ & MATTOS, 2011). Esses aspectos motivaram a realização deste estudo, que teve como objetivo avaliar o perfil dos pacientes portadores de NCLM-B diagnosticados e acompanhados no HU-UFSC. Para tanto, foram analisados os dados clínicos e laboratoriais de 93 pacientes. Esses pacientes apresentavam diferentes subtipos de NCLM-B, entre eles, LCB e NCP.

Do total de casos analisados neste estudo, a NCLM-B mais frequente foi o MM (23,7%), um subtipo de NCP. Entre os pacientes diagnosticados com LCB, observou-se que os subtipos mais comuns foram: LLC/LLP, LDGCB, LF e LB. Esses dados são semelhantes aos encontrados na literatura mundial e brasileira (SMITH et al., 2010; GOUVEIA et al., 2011).

Em 1997, foi publicado um estudo do The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project baseado na classificação de linfomas International Lymphoma Study Group Classification. Esse estudo foi utilizado pela classificação da OMS de 2008 para relatar as frequências dos diferentes subtipos de linfomas, uma vez que analisou um total de 1.378 casos de linfomas de diferentes países, incluindo os de origem B e T (THE NON-HODGKIN'S LYMPHOMA CLASSIFICATION PROJECT, 1997). Os resultados encontrados por esse estudo mostraram que o LDGCB foi o subtipo mais comum, representando 30,6% dos casos, seguido pelo LF (22,1%). Acredita-se que os casos de LLC/LLP (6,7%) foram subestimados, pois foram avaliados apenas pacientes com aspectos clínicos de linfoma, os quais muitas vezes estão ausentes nos pacientes portadores de LLC/LLP.

É importante destacar que o estudo do The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project encontrou uma frequência para LB menor que 1%, sendo considerado um dos LCB menos comuns, enquanto que na população do presente estudo essa neoplasia é o quarto subtipo de LCB mais comum. No entanto, essa diferença pode ser devido ao fato de que, no estudo de 1997, os linfomas de alto grau *Burkitt-like* foram considerados em um grupo à parte com uma frequência de 2,1%. Ainda, os autores destacaram a dificuldade encontrada em diferenciar os LDGCB dos LB.

Esses pacientes, na classificação da OMS de 2008, seriam classificados como LCBAI entre LDGCB e LB.

Outro estudo, publicado em 2010 pelo grupo da Haematological Malignancy Research Network (HMRN), analisou 8.131 pacientes diagnosticados com neoplasias hematológicas na região do Reino Unido. Os casos foram classificados de acordo com a primeira classificação da OMS, publicada em 2001. Entre as NCLM-B, os seguintes subtipos foram os mais comuns: LDGCB (1.098 casos), MM (876 casos), LLC/LLP (835 casos), LF (446 casos), LZM (390 casos), LCM (100 casos), LB (54 casos) e tricoleucemia (48 casos) (SMITH et al., 2010). Novamente, o dado que difere em relação ao presente estudo é a frequência do LB.

No Brasil, um estudo publicado em 2011 no Estado de São Paulo que avaliou a prevalência dos subtipos de LNH em uma população total de 546 casos encontrou a seguinte frequência: LDGCB com 49,45% dos casos, LF com 7,69%, LB com 6,41%, linfoma difuso e de células pequenas inclassificável com 6,41% e LLC/LLP com 6,23% (GOUVEIA et al., 2011). Dessa forma, pode-se observar que, no estudo paulista, a prevalência do LB é semelhante à encontrada no presente estudo. Entretanto, a prevalência de LLC/LLP é discordante.

Vale ressaltar que estudos que avaliem a prevalência dos subtipos de NCLM-B no Brasil são escassos. Epidemiologicamente, a população pediátrica tem sido a mais estudada (PEDROSA et al., 2007; FERREIRA et al., 2012). Ferreira e colaboradores (2012) avaliaram casos de linfomas em crianças e adolescentes de 14 centros brasileiros de registro de câncer de capitais brasileiras. Na região Sul foram representados apenas os dados de Porto Alegre e de Curitiba, pois não havia dados provenientes de Florianópolis. Isso reforça a necessidade de estudos que avaliem os subtipos de NCLM-B no Estado de Santa Catarina, tanto em pacientes pediátricos como em adultos.

Queiroga e colaboradores (2008) demonstraram a distribuição do LB nas cinco regiões brasileiras e analisaram os casos em relação à idade (pediátricos ou adultos), entre outros parâmetros. De forma interessante, é possível observar nos seus resultados que o LB na região Sul acomete principalmente pacientes adultos (67%), enquanto que nas outras quatro regiões a maioria dos casos ocorre em pacientes pediátricos (QUEIROGA et al., 2008). Esse resultado corrobora a maior frequência de LB encontrada no presente estudo, o qual é composto em sua totalidade por pacientes adultos residentes da região Sul.

Segundo dados do Ministério da Saúde do Brasil, a cidade de Florianópolis corresponde ao terceiro município brasileiro com maiores taxas de detecção e de mortalidade pelo HIV e a região Sul lidera o *ranking* das maiores taxas de detecção (aproximadamente 2,3 vezes maior que a taxa do país) (BRASIL, 2014). Esses dados associados ao maior risco de desenvolvimento de LB em pacientes soropositivos para o HIV (Perkins e Friedberg, 2008) podem justificar a maior frequência de LB em pacientes adultos encontrados neste trabalho.

No presente estudo, foi observada uma frequência de pacientes portadores de NCLM-B soropositivos para o HIV de 9,7%, o qual é semelhante aos dados encontrados por Shiels e colaboradores (2013). Esses autores americanos avaliaram 115.643 casos de LNH e observaram uma frequência de 5.9% de infecção pelo HIV (SHIELS et al., 2013). Conforme a literatura, o LDGCB é o subtipo de linfoma mais comumente diagnosticado em pacientes soropositivos para o HIV, apesar de a incidência de LDGCB associado ao HIV ter declinado após a introdução da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) (CARBONE et al., 2014). Além do LDGCB, outros subtipos de linfomas também vêm sendo associados a essa infecção, tais como: LB, LH, linfoma primário de efusões e linfoma plasmablastico de cavidade oral (NAVARRO & KAPLAN, 2006; GROGG et al., 2007; CARBONE et al., 2014). De fato, dos nove pacientes diagnosticados com NCLM-B soropositivos para o HIV no presente estudo, quatro apresentavam LB, dois LCBAI e dois linfoma plasmablastico de cavidade oral.

O LCBAI é um subtipo de LCB agressivo que exhibe características morfológicas e genéticas de dois subtipos de linfomas, porém, por questões clínicas, não deve ser incluído em um subtipo específico (SWERDLOW et al., 2008). De acordo com a classificação da OMS de 2008, os LCBAI podem ser divididos em dois grupos: LCBAI entre LDGCB e LH e aqueles entre LDGCB e LB. No presente estudo, os seis casos de LCBAI correspondem ao segundo grupo. Dos seis pacientes, três (50% dos casos) foram a óbito em um tempo de 11, cinco e 18 meses após o diagnóstico, sendo que os dois últimos eram soropositivos para o HIV.

As NCP não são comumente associadas aos pacientes soropositivos para o HIV. No entanto, existem relatos de desenvolvimento de MM em pacientes soropositivos para esse vírus em indivíduos jovens, o que difere dos outros casos, pois em geral, essas neoplasias acometem indivíduos idosos (FIORINO & ATAC, 1997; DEZUBE et al., 2004). Esse fato está de acordo com um caso incluído neste estudo, o qual era soropositivo para o

HIV e portador de MM aos 43 anos. Infelizmente, não foi possível realizar o acompanhamento clínico desse paciente, pois, o mesmo havia abandonado o tratamento antirretroviral há alguns anos e a infecção estava em um estágio muito avançado, o que o levou a óbito em menos de um mês após o diagnóstico da neoplasia.

O EBV é associado a diversas doenças linfoproliferativas, em especial àquelas de origem de células B (TAO & WASIK, 2001). Neste estudo, a pesquisa de antígenos do EBV nas células neoplásicas foi realizada por IHQ. Dos sete casos analisados, apenas dois foram positivos, um caso de LDGCB EBV positivo do idoso e um linfoma plasmablastico. Em ambos os casos, os LCB apresentavam localização extranodal na cavidade abdominal e oral, respectivamente. Esses dados corroboram os relatos da literatura que associam linfomas EBV positivos com a predileção a sítios extranodais, além de um curso clínico agressivo (TAO & WASIK, 2001). O caso de linfoma plasmablastico também era soropositivo para o HIV e segue o tratamento com o protocolo EPOCH, enquanto que o paciente portador do LDGCB EBV positivo do idoso foi a óbito após 11 meses do diagnóstico. Entretanto, notou-se que os resultados da investigação da infecção pelo EBV e sua associação aos LCB do presente estudo estão subestimados, pois, em muitos casos, nem mesmo a pesquisa sorológica foi solicitada.

Ainda em relação aos fatores de risco, uma meta-análise que buscou associar o tabagismo a linfomas demonstrou que de 6.594 casos oriundos de estudos americanos, europeus e australianos, o risco de desenvolver linfoma foi discretamente maior em indivíduos fumantes quando comparados ao grupo controle. Quando estratificados entre os subtipos de linfoma, aquele que apresentou diferença significativa foi o LF (MORTON et al., 2005). Mais recentemente, outra meta-análise que avaliou 5.026 casos também observou uma associação significativa entre tabagismo ativo e LF, mas não em relação a outros subtipos de linfomas (GIBSON et al., 2013). Ao analisar os 12 pacientes tabagistas ativos do presente estudo, observou-se que quatro deles foram diagnosticados com LF, o que vai ao encontro dos estudos supracitados. Além disso, outros quatro casos foram diagnosticados com LLC/LLP; no entanto, não há associação na literatura entre esse subtipo de NCLM-B e tabagismo.

Segundo dados do Ministério da Agricultura, em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos e assumiu o posto de maior mercado mundial de agrotóxicos. Esse fato destaca a importância de estudos que relacionem o uso dessas substâncias carcinogênicas aos impactos na saúde

dos trabalhadores rurais (BOCCOLINI et al., 2013). Neste estudo, sete pacientes relataram exposição ocupacional a agrotóxicos. Desses, três foram diagnosticados com um subtipo de NCP (MM, MGUS e LCP) enquanto que outros três foram diagnosticados com LLC/LLP. Esses resultados se assemelham àqueles encontrados por Alavanja e colaboradores (2014), que ao analisar 523 casos de linfoma e de MM encontraram uma associação positiva entre indivíduos expostos ao pesticida permetrina (inseticida e acaricida) e o desenvolvimento de MM, assim como os pesticidas DDT e terbufos (inseticida organofosforado) e LLC/LLP (ALAVANJA et al., 2014).

No presente estudo, foi encontrada uma mediana de idade no momento do diagnóstico de 58 anos. De acordo com dados de um estudo brasileiro, a mediana de idade em pacientes diagnosticados com LNH é de 50 anos (GOUVEIA et al., 2011). Em um estudo epidemiológico mundial foi demonstrado que a mediana de idade de pacientes diagnosticados com linfomas é em torno de 70 anos, com apenas alguns subtipos que acometem pacientes mais jovens, tais como: LF, LB e linfoma primário do mediastino, com medianas de idade de 65, 52 e 36 anos, respectivamente (ROMAN & SMITH, 2011). De fato, no presente estudo foi observada a idade mediana de 33 anos nos pacientes com LB, a qual foi estatisticamente diferente da observada para outros subtipos de LCB.

Segundo os dados da literatura, os pacientes portadores de LCM apresentam uma pequena variação na distribuição das idades, cuja mediana é de 74 anos (ROMAN & SMITH, 2011). Neste trabalho, apesar do número pequeno de casos avaliados, pode-se observar que a variação da idade dos pacientes foi muito pequena (73 e 79 anos). Ao contrário, os casos de LDGCB são conhecidos por apresentarem as maiores variações de idade (ROMAN & SMITH, 2011), e essa característica também foi possível de se observar nos casos deste estudo, em que as idades variaram entre 20 a 72 anos.

Em relação aos dados clínicos dos pacientes portadores de LCB no momento do diagnóstico, pode-se destacar a presença de doença *bulky* em cinco dos 12 (41,7%) pacientes portadores de LDGCB. Já um estudo que avaliou os dados de 128 casos de LDGCB mostra uma frequência menor, de 25%, de doença *bulky* entre esses pacientes (COLOMO et al., 2003). O subtipo de LCB que se destacou em relação à presença de esplenomegalia foi o LF, com três casos (27,3%) com presença de discreta esplenomegalia. De fato, esse é um achado clínico comum em pacientes portadores de LF

(FREEDMAN, 2014). No entanto, para esse subtipo de LCM, esplenomegalia massiva é uma condição clínica rara (KOISO et al., 2012).

As NCLM-B podem apresentar um curso clínico que varia de indolente a extremamente agressivo (SHANKLAND et al., 2012). Dessa forma, além do diagnóstico correto, a definição do prognóstico do paciente é fundamental para a definição da conduta clínica, a qual pode ser desde expectante até protocolos combinados de quimioterapia (GORCZYCA, 2011).

Assim, os exames laboratoriais mais importantes para verificar o grau de agressividade de um linfoma são: a dosagem sérica da atividade da enzima LDH e a porcentagem do antígeno proteico nuclear e nucleolar Ki-67 por IHQ. Desde a década de 1970, quando os índices prognósticos começaram a ser propostos, a atividade da LDH elevada é considerada um fator de mau prognóstico independente do subtipo de linfoma ou de outros parâmetros clínicos (FERRARIS et al., 1979). No presente estudo foi observada uma diferença significativa entre os subtipos de LCB quando esse parâmetro foi avaliado. Os valores mais elevados foram observados nos subtipos LDGCB, LB e LCBAI com medianas e intervalos de 406 U/L (184 – 2.739 U/L, 1.534 U/L (243 – 7.239 U/L) e 464 U/L (170 – 6.121 U/L), respectivamente.

Na análise dos resultados da atividade da LDH de forma individual dos pacientes portadores de LB, observou-se que em apenas um caso essa dosagem ao diagnóstico foi menor que 500 U/L (243 U/L). Esse foi o único paciente com LB que apresentou resposta completa/parcial ao tratamento e que, atualmente, encontra-se em bom estado geral. Em relação aos pacientes portadores de LDGCB, não foi possível observar o mesmo padrão, pois, os pacientes com os valores mais altos de LDH em torno de 2.000 U/L apresentaram tanto resposta completa/parcial como recidiva/progressão.

Mais recentemente, a avaliação da expressão de Ki-67 passou a ser considerada como um fator prognóstico para linfomas, pois, indica o índice de proliferação celular (BROYDE et al., 2009). Como pode ser observado na Tabela 14, os subtipos LDGCB, LB e LCBAI apresentaram valores elevados de expressão de Ki-67 (80,0%, 92,5% e 80,0%, respectivamente), quando comparados aos subtipos indolentes, como o LF (35,0%). Esses resultados corroboram os dados de Broyde e colaboradores (2009), que mostraram a frequência da expressão de Ki-67 nos subtipos LDGCB, LF, LLC/LLP, LB atípico e LCM de 67,5%, 32,1%, 10,8%, 96,5% e 40,2%, respectivamente.

De forma interessante, para ambos os parâmetros LDH e Ki-67 houve diferença significativa entre os subtipos, e os que apresentaram valores mais elevados foram LDGCB, LB e LCBAI. Quando esses três grupos foram avaliados entre si, não houve diferença significativa, o que indica uma semelhança biológica entre essas entidades.

Da mesma forma que a atividade da LDH é importante para a estratificação prognóstica dos linfomas, a determinação das concentrações séricas de B2M é essencial para a estratificação dos casos de MM pelo índice ISS, o qual também se baseia nas concentrações de albumina sérica (CHOU, 2012). A B2M é um pequeno polipeptídeo que faz parte do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (do inglês, MHC-I) (GÜSSOW et al., 1987).

Um estudo conduzido por Ludwig e colaboradores (2013) reuniu os dados de 156 pacientes diagnosticados com MM e os resultados mostraram que os valores de B2M acima de 5.500 ng/mL estavam associados a um menor tempo de sobrevida (LUDWIG et al., 2013). No presente estudo, a concentração mediana de B2M foi de 7.887,0 ng/mL com um intervalo de 1.535,0 a 33.275,0 ng/mL. Dos 12 pacientes que apresentaram concentrações de B2M acima de 5.500 ng/mL, nove apresentaram resposta completa/parcial ao tratamento, enquanto que dois apresentaram recidiva/progressão da neoplasia. Além disso, durante o período de estudo, desses 12 pacientes quatro foram a óbito. Assim, não foi observada associação entre os pacientes que apresentaram concentrações de B2M acima de 5.500 ng/mL a piores respostas ao tratamento ou maior frequência de óbito.

Além disso, um estudo pioneiro avaliou a correlação entre a concentração sérica e a expressão na membrana celular de moléculas envolvidas nas interações entre as células plasmocitárias neoplásicas e o microambiente da MO, entre elas, a B2M. Os resultados obtidos demonstraram que, como esperado, os pacientes portadores de MM com concentrações séricas de B2M mais elevadas apresentaram uma doença com características agressivas. Em contrapartida, altos graus de expressão da B2M na membrana celular das células plasmocitárias neoplásicas, mensurada pela IFM por citometria de fluxo, foram associados a características favoráveis, como concentrações séricas mais elevadas de albumina e de imunoglobulina policlonal, além de maiores taxas de SG. Essa correlação inversamente proporcional entre as concentrações séricas e de membrana pode ser explicada pela ocorrência nas células plasmocitárias neoplásicas de uma quebra na ligação entre o complexo MHC-I e a B2M,

os quais são liberados da membrana celular para o plasma (PEREZ-ANDRES et al., 2009). Assim, no presente estudo, avaliou-se a correlação entre esses dois parâmetros nos pacientes com diagnóstico realizado com o painel de oito cores, visto que o anticorpo anti-B2M não estava inserido no painel de quatro cores. No entanto, não foi observada correlação inversa ou proporcional.

Ainda em relação aos pacientes portadores de MM, o predomínio do componente monoclonal do tipo IgG corrobora os dados da literatura. No estudo de Geng e colaboradores (2013) que avaliou 264 casos de MM, 42,0% eram do tipo IgG, 19,7% do tipo IgA e 8,0% do tipo IgD (GENG et al., 2013). Previamente, um estudo que avaliou um número ainda maior de casos (1.027) também observou perfil semelhante (KYLE et al., 2003).

Dando continuidade à avaliação de dados laboratoriais e fenotípicos que influenciam na definição do prognóstico dos pacientes, cada vez mais se tem dado importância à definição da origem do LDGCB como do tipo CG ou não CG pela expressão dos marcadores CD10, Bcl-6 e MUM1 nas células neoplásicas (HANS et al., 2004).

Barrans e colaboradores (2002) observaram que o LDGCB com fenótipo do CG (CD10 e Bcl-6 positivos) identifica um grupo de prognóstico favorável, enquanto que a expressão de Bcl-2 foi associada a um pior prognóstico (BARRANS et al., 2002). Outro estudo analisou fenotipicamente a expressão de Bcl-2 em 128 pacientes com LDGCB e encontrou correlação entre a expressão de Bcl-2 e uma doença mais avançada e menor SG. Entretanto, não foi observada correlação entre LDGCB com fenótipo do CG e o tempo de SG (COLOMO et al., 2003). No presente estudo, dos doze pacientes diagnosticados com LDGCB, cinco apresentaram expressão de CD10 e, desses, em três havia a coexpressão de CD10 e Bcl-6, o que caracteriza o LDGCB do tipo CG. Em apenas um caso a expressão de MUM1 foi avaliada com positividade em 20% das células. Três dos cinco pacientes com expressão de CD10 foram a óbito por progressão da neoplasia, enquanto que os outros dois apresentaram resposta completa/parcial ao tratamento, sendo que as células neoplásicas desses dois últimos pacientes apresentavam também expressão de Bcl-6. Além disso, as células dos cinco pacientes em que havia expressão de CD10 também expressavam Bcl-2. Dessa forma, não se observou uma tendência dos pacientes com LDGCB do tipo CG a apresentarem melhor prognóstico. Sugere-se, assim, que a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 pode estar relacionada à refratariedade dos casos que foram a óbito.

A agressividade da doença observada no caso de LDGCB CD5 positivo do presente estudo, o qual foi a óbito em menos de um mês após o diagnóstico, corrobora os dados encontrados por Harada e colaboradores (1999) que demonstraram um tempo de SG significativamente inferior no grupo dos pacientes com LDGCB CD5 positivo quando comparados ao grupo com LDGCB CD5 negativo (HARADA et al., 1999). Entretanto, um estudo mais recente não observou essa diferença significativa na sobrevida ao analisar 120 casos de LDGCB CD5 positivo, e ainda sugere que essas divergências podem ser devido à heterogeneidade genética presente dentro dos subgrupos de linfomas (YAMAGUCHI et al., 2008).

Para a avaliação prognóstica dos pacientes, os subtipos mais frequentes de NCLM-B foram estratificados conforme os índices prognósticos a fim de conhecer o estágio da neoplasia no momento do diagnóstico. Do total de casos de MM (n = 22), 54,6% (n = 12) foram estratificados como ISS III, ou seja, o grau de maior risco para essa neoplasia. Desses doze pacientes, quatro foram a óbito em um tempo médio de onze meses após o diagnóstico. No Brasil, há poucos estudos sobre características clínicas e epidemiológicas de pacientes portadores de MM. Em 2008, foi publicado um estudo que abrangeu dados de 16 instituições brasileiras com casos diagnosticados entre 1998 e 2004. Nesse estudo foram avaliados diversos parâmetros, entre eles, a estratificação prognóstica de 756 pacientes. Assim, 20,1% foram estratificados como ISS I, 48,7% como ISS II e 31,2% como ISS III (HUNGRIA et al., 2008). Esse perfil é diferente do encontrado no presente trabalho, o qual foi 13,6% estratificados como ISS I, 18,2% como ISS II e a maioria, 54,6%, como ISS III. Vale ressaltar que o estudo conduzido por Hungria e colaboradores (2008) não incluiu casos do Estado de Santa Catarina. Com resultados semelhantes aos do estudo de Hungria e colaboradores (2008) e diferentes dos do presente estudo, um grupo europeu encontrou a seguinte distribuição para 156 pacientes portadores de MM: 37,8% ISS I, 40,4% ISS II e 21,8% ISS III (LUDWIG et al., 2013). Por outro lado, um estudo chinês avaliou 264 casos de MM, que foram estratificados da seguinte forma: 8,7% ISS I, 36,4% ISS II e 54,9% ISS III (GENG et al., 2013), o que corrobora as frequências encontradas na população do presente estudo. Os pesquisadores chineses comentam que o predomínio de pacientes no estágio ISS III encontrado indica a necessidade de maior atenção no atendimento aos pacientes e na implantação de métodos mais sensíveis a fim de diagnosticar a neoplasia nos estágios iniciais.

Em relação à proveniência dos doze pacientes portadores de MM com estadiamento ISS III do presente estudo, a maioria era residente das cidades de Florianópolis e de São José (município da Grande Florianópolis), o que sugere que a demora em procurar o atendimento não se deve à distância dos hospitais que prestam assistência a esse tipo de neoplasia. Assim, sugere-se que o diagnóstico de MM em estágios avançados pode estar relacionado à falta de informação e aos sintomas inespecíficos, como dores ósseas, o que leva os pacientes a procurarem outras especialidades médicas e, muitas vezes, recorrerem à automedicação.

Com um perfil diferente, 64,3% (n = 9) dos pacientes diagnosticados com LLC/LLP (n = 14) foram estratificados nos estágios de menor risco pelos sistemas de estadiamento Rai e Binet (0A e IA). Além de 7,1% (n = 1) dos pacientes com estágio IIA. O restante, 28,5% (n = 4), foi diagnosticado em estágios de alto risco: IIIC, IVB e IVC. Esses dados corroboram os dados de um estudo publicado em 2014 que avaliou 924 casos de LLC/LLP quanto ao estadiamento. Em geral, foram observadas as seguintes frequências para o sistema Rai: 58% foram classificados como estágio 0, 34% como I/II e 8% como III/IV; e para o sistema Binet: 93% como A/B e 7% como C. O principal objetivo do estudo de Baumann e colaboradores (2014) foi avaliar as características clínicas dos pacientes idosos e relacioná-las aos pacientes mais jovens. De fato, os pacientes idosos (>70 anos) apresentaram de forma significativa estágios mais avançados da neoplasia (III/IV) (BAUMANN et al., 2014). Esse dado também pode ser observado no presente estudo, em que os dois pacientes mais idosos portadores de LLC/LLP com 80 e 78 anos no momento do diagnóstico foram estratificados nos estágios IVC e IIIC, respectivamente. De acordo com a literatura, o estágio 0A está relacionado a uma maior SG, com uma mediana esperada de cerca de 10 anos. Já os estágios IB e IIB apresentam mediana de sobrevida intermediária de cinco a sete anos, e os grupos mais agressivos (IIIC e IVC) uma mediana bem mais curta de menos de 3 anos (HAMBLIN, 2007). Até o momento do final da coleta de dados, 13 dos 14 pacientes diagnosticados com LLC/LLP do presente estudo permaneciam vivos. De acordo com os protocolos estabelecidos pela literatura, os pacientes com os estágios III e IV receberam tratamento logo após o diagnóstico, apresentaram resposta completa/parcial e seguem em acompanhamento. Três desses pacientes receberam clorambucil, e um paciente, com apresentação clínica com linfonodomegalia e sintomas B, recebeu o protocolo R-CHOP. De acordo com a literatura, não há benefícios no uso do protocolo R-CHOP para pacientes com LLC/LLP

(SMOLEJ, 2007), enquanto que protocolos com fludarabina têm mostrado bons resultados em pacientes portadores de LLC/LLP refratária (MAROTTA et al., 2000; LADYZYNSKI et al., 2015). Como o paciente citado acima foi classificado pela IHQ como LNH padrão de células intermediárias e pequenas, juntamente com a apresentação clínica, o corpo clínico decidiu tratá-lo como linfoma e não como LLC/LLP.

Os outros três subtipos de LCB mais frequentes foram avaliados da seguinte forma: LDGCB e LB pelo sistema Ann Arbor seguido do sistema de estadiamento IPI e os casos de LF pelo Ann Arbor seguido do FLIPI. Dessa forma, foi possível estratificá-los em categorias de acordo com o risco (ver Figura 9). A distribuição dos pacientes com LDGCB em relação ao risco foi bastante semelhante a um estudo europeu que avaliou 118 casos e encontrou os seguintes dados: 31% dos casos foram classificados como risco baixo, 22% como intermediário, 19% como intermediário-alto e 28% como alto (COLOMO et al., 2003). Esse mesmo estudo observou que o IPI teve um alto valor para prever a SG dos pacientes. De fato, os dados do presente estudo mostram que dos cinco pacientes portadores de LDGCB que foram a óbito durante o período de estudo, dois apresentavam risco alto, dois risco intermediário e um risco intermediário-alto. Enquanto que os três pacientes de risco baixo apresentaram resposta completa/parcial ao tratamento.

Já os pacientes portadores de LF foram quase que igualmente distribuídos em risco baixo com 54,5% dos casos ($n = 6$) e risco alto com 45,5% dos casos ($n = 5$). Sendo que os dois pacientes que foram a óbito no período de estudo foram classificados como risco alto, e dos seis com risco baixo, quatro seguiram conduta expectante. Recentemente, um estudo sueco avaliou 2.641 novos casos de LF. Desses, 628 foram avaliados em relação ao sistema de estadiamento FLIPI e estratificados de acordo com o risco em: risco baixo (33,8%), risco intermediário (32,8%) e risco alto (33,4%) (JUNLÉN et al., 2015), o que mostra uma distribuição bastante homogênea entre os grupos. Do mesmo modo, um estudo paquistanês que avaliou 70 pacientes encontrou o mesmo padrão de distribuição: risco baixo (30%), risco intermediário (30%) e risco alto (40%) (ATHAR et al., 2014). Como pode ser observado na Figura 9, no presente estudo não foram observados casos com risco intermediário, no entanto a distribuição entre risco alto e risco baixo foi homogênea.

Por outro lado, a grande maioria dos pacientes com LB do presente estudo, mais de 85% ($n = 6$), foram estratificados em risco intermediário-alto e alto. De fato, o único paciente classificado como risco baixo também

foi o único a apresentar boa resposta ao tratamento (protocolo R-CHOP seguido de Hyper-CVAD). Dos outros seis pacientes, cinco foram a óbito e um, com diagnóstico mais recente, se encontrava, no momento do término da coleta de dados, com a neoplasia em recidiva/progressão. Apesar de a literatura relatar que o LB, mesmo sendo agressivo, é altamente curável devido à introdução de protocolos quimioterápicos de altas doses e à profilaxia de SNC, com taxas de cura que chegam a 80% em pacientes adultos (COSTA et al., 2013), isso não se reflete nos pacientes incluídos no presente estudo.

Em um estudo realizado por Castillo e colaboradores (2013) foram avaliadas as características de 2.176 pacientes adultos portadores de LB e a estratificação do risco demonstrou que 23,6% apresentavam risco baixo, 23,3% risco intermediário, 27,8% risco intermediário-alto e 25,5% risco alto (CASTILLO et al., 2013). Esses resultados são diferentes dos encontrados no presente estudo, em que a estratificação do risco demonstrou que 14,3% apresentavam risco baixo, 71,4% risco intermediário-alto e 14,3% risco alto.

Não obstante, o estágio das NCLM-B no momento do diagnóstico continua intrinsecamente associado à SG dos pacientes, mesmo nos dias atuais, com o advento de novos protocolos de quimioterapia. Dessa forma, pacientes com a doença em estágios menos avançados têm menos risco de ir a óbito quando comparados a pacientes com a doença em estágios avançados (COSTA et al., 2013). Assim, sugere-se que a alta frequência de óbito observada nos pacientes portadores de LB deste estudo reflete o diagnóstico da neoplasia em estágios avançados.

Os resultados da SG de todos os casos avaliados de NCLM-B neste estudo mostram uma média de 27,6 meses. Houve diferença significativa entre os tempos de SG dos subtipos de NCLM-B (ver Tabela 18), o que corrobora os dados encontrados por Sant e colaboradores (2008). Nesse estudo foram avaliados 40 mil casos de LNH e os resultados mostram uma associação entre o subtipo morfológico de LNH e a SG, sendo que os subtipos com maiores taxas de SG foram os linfomas cutâneos, a LLC/LLP, o LF e o LLP/MW. Enquanto que entre os subtipos com menores taxas de sobrevida estavam o LB e o linfoma difuso (NE). Ao analisar o risco relativo de óbito entre LB e linfoma difuso, observou-se um risco muito elevado para o LB. Além disso, entre os subtipos que apresentaram menores riscos de óbito estavam LLC/LLP e LF (SANT et al., 2008).

Apesar de o LDGCB ser considerado um subtipo de LCB com comportamento agressivo, a SG dos pacientes com LDGCB (14,7 meses)

do presente estudo foi estatisticamente superior aos pacientes com LB (7,9 meses). Sugere-se que essa diferença seja devida ao fato de que desde a introdução do rituximabe (protocolo R-CHOP), os pacientes com LDGCB apresentaram perfis de resposta ao tratamento melhores do que aqueles tratados sem rituximabe (protocolo CHOP) (PFREUNDSCHUH et al., 2011; MOUNIER et al., 2012).

No HU-UFSC, a definição do subtipo de NCLM-B se baseia, além dos aspectos clínicos, nos resultados dos exames de IHQ e IMF. Estudos prévios têm avaliado a correlação entre a IHQ e a IMF para o diagnóstico de NCLM-B e têm reportado ótimos resultados (MARTÍNEZ et al., 2003; TALAULIKAR et al., 2008; ABDEL-GHAFAR et al., 2012). Adicionalmente, um estudo egípcio encontrou uma concordância de 88% entre os métodos, sendo que a sensibilidade da IMF foi de 94,9% e a especificidade de 100% (EL-SAYED et al., 2008). Além disso, outro estudo encontrou uma concordância de 94% entre a IMF e a classificação morfológica de 373 biópsias de tecidos linfóides (DUNPHY, 2000). Dessa forma, os resultados da IHQ e da IMF dos pacientes incluídos neste estudo em que o diagnóstico foi realizado pelos dois métodos foram comparados a fim de avaliar a concordância entre eles.

Como pode ser observado na Tabela 19, os resultados mostram que 100% dos casos de MM avaliados ($n = 15$) foram concordantes pelos dois métodos com um grau de concordância excelente. Para o LF, quatro casos foram conflitantes, sendo que pela IMF foram classificados como LF e pela IHQ foram classificados como LNH padrão de células pequenas ($n=2$), LNH padrão de células intermediárias e pequenas ($n=1$) e LNH de alto grau ($n=1$). Dessa forma, compreende-se que os resultados não são discordantes, visto que a IMF analisa uma maior quantidade de parâmetros, e, nesses casos, foi possível detectar o fenótipo indicativo de LF.

Da mesma forma, quatro casos foram classificados como LLC/LLP pela IMF e pela IHQ foram classificados como: LNH padrão de células pequenas ($n=2$) e LNH padrão de células intermediárias e pequenas ($n=2$), o que mais uma vez não é discordante. Além disso, muitas vezes o diagnóstico de LLC/LLP foi definido apenas pela análise morfológica e fenotípica do sangue periférico, o qual não foi analisado por IHQ. Por isso, o número de casos avaliados pelos dois métodos no estudo foi reduzido.

Entre os casos de LB, um deles foi classificado como LB pela IHQ e como LCB NE pela IMF. Enquanto que três casos foram classificados pela IMF como LB e pela IHQ como linfoma de alto grau, o que também indica resultados de certa forma concordantes.

De acordo com o exposto, observa-se que mesmo entre os subtipos em que a concordância não foi excelente pelo teste Kappa, houve concordância entre os exames de IHQ e IMF para detectar subtipos de NCLM-B e suas características biológicas, como alto grau e células pequenas. Os resultados sugerem que há a necessidade dos dois métodos para a realização do diagnóstico correto, pois, as informações fornecidas por eles se complementam.

Reunindo os resultados da literatura, pode-se concluir que a IMF tem um enorme potencial em melhorar de forma substancial o diagnóstico e o acompanhamento dos pacientes portadores de NCLM-B. Além disso, quando se avalia as vantagens, a IMF se destaca pela avaliação multiparamétrica com uma relevante rapidez na obtenção dos resultados (DE TUTE, 2011).

Os avanços tecnológicos da metodologia de IMF alcançados nas últimas décadas permitem a avaliação simultânea de cada vez mais parâmetros celulares. A produção em larga escala de anticorpos monoclonais, juntamente com a maior variedade de fluorocromos, contribuem para isso (PEDREIRA et al., 2013). Recentemente, o consórcio Euroflow desenhou e padronizou painéis de oito cores, ou seja, com oito fluorocromos diferentes, os quais são destinados a diagnosticar e classificar os diversos subtipos de neoplasias hematológicas de acordo com a classificação da OMS de 2008 (VAN DONGEN et al., 2012).

A partir de abril de 2013, os painéis de oito cores passaram a fazer parte da rotina laboratorial do Setor de Onco-Hematologia do HU-UFSC. Diversos estudos têm focado na avaliação da expressão de novos marcadores sugeridos pelo consórcio Euroflow, e sua aplicação no diagnóstico e/ou prognóstico das neoplasias hematológicas. Assim, no presente estudo, os pacientes diagnosticados com os subtipos de NCLM-B mais frequentes e com diagnóstico realizado com o painel de oito cores foram avaliados em relação à expressão dos marcadores presentes nesses painéis. Essa avaliação fenotípica visa auxiliar nos futuros diagnósticos e relacionar marcadores prognósticos ao desfecho clínico dos pacientes.

Entre os pacientes diagnosticados com MM, destaca-se a expressão dos marcadores CD81, CD28, CD117 e CD56. O CD81 é uma proteína de membrana da família das tetraspaninas que regula a expressão de CD19 em linfócitos B e que está envolvido na infecção causada pelo vírus da hepatite C nas células humanas (LUO et al., 2010). Em relação ao desfecho clínico desses pacientes com células que expressavam CD81, um deles foi a óbito com a neoplasia em progressão/recidiva, enquanto os outros dois

permanecem vivos em resposta completa/parcial. Os três pacientes em que a expressão para o marcador CD81 foi negativa encontram-se vivos em resposta completa/parcial. Devido ao pequeno número de casos, não foi possível relacionar a expressão do CD81 a um pior prognóstico, como previamente reportado por Paiva e colaboradores (2012) (PAIVA et al., 2012). Segundo a literatura, a expressão do CD28 está relacionada a menores tempos de sobrevida, a estágios mais avançados do índice ISS e a maior atividade de proliferação das células plasmocitárias neoplásicas (MATEO et al., 2008). Neste trabalho, foi observado que apenas um dos oito casos avaliados expressou esse marcador (ver Tabela 21). Corroborando dados de Mateo e colaboradores (2008), o paciente portador de MM que apresentou expressão de CD28 foi estratificado no estágio ISS III ao diagnóstico, não respondeu bem ao tratamento quimioterápico, a neoplasia progrediu e o paciente foi a óbito após 31 meses do diagnóstico. Além disso, observou-se que dois pacientes portadores de MM com diagnóstico realizado pelo painel de oito cores apresentaram expressão de CD117, a qual foi previamente associada a um bom prognóstico (MATEO et al., 2008). Os dois pacientes do presente estudo apresentaram resposta ao tratamento completa/parcial, um deles permanece em bom estado geral, porém o outro foi a óbito após oito meses do diagnóstico. Todos os casos de MM avaliados apresentavam células plasmocitárias com expressão aberrante CD56. Esse marcador é uma molécula de adesão envolvida no ancoramento das células plasmocitárias no estroma da MO. Assim, a ausência de expressão tem sido relacionada à disseminação extramedular e a uma neoplasia mais agressiva (SAHARA et al., 2002). Vale destacar que as células neoplásicas do caso de LCP do presente estudo não expressavam CD56 (dado não mostrado). De fato, a LCP é uma neoplasia altamente agressiva caracterizada pela presença de células plasmocitárias circulantes (FERNÁNDEZ DE LARREA et al., 2013).

De acordo com a literatura, os marcadores CD200 e CD81 são importantes para o diagnóstico de LLC/LLP (BARRENA et al., 2005; SANDES et al., 2014), e o CD49d para definição do prognóstico (BULIAN et al., 2014). O CD200 é um membro da família das imunoglobulinas com atividades imunossupressoras (KAWASAKI & FARRAR, 2008) de grande valor no diagnóstico diferencial entre LLC/LLP e LCM, os quais são caracterizados por células pequenas CD5 positivas (PALUMBO et al., 2009; SANDES et al., 2014). Neste trabalho, os sete pacientes diagnosticados com LLC/LLP pelo painel de oito cores expressavam CD200 de forma homogênea e brilhante, enquanto que as células do paciente diagnosticado

com LCM eram negativas para esse marcador (dado não mostrado). Além disso, em comparação aos outros subtipos de LCB, observou-se que as células de LLC/LLP expressam de forma mais fraca o marcador CD81. Inclusive, esse perfil também foi observado por um estudo espanhol, que encontrou concentrações significativamente baixas desse marcador nas células de LLC/LLP quando comparadas às células de outras NCLM-B (BARRENA et al., 2005).

O CD49d corresponde à subunidade $\alpha 4$ da integrina $\alpha 4\beta 1$, a qual é uma molécula de adesão envolvida tanto com a matriz extracelular quanto com as interações entre células (ROSE et al., 2002). Recentemente, diversos estudos têm avaliado o impacto da expressão de CD49d nas células de LLC/LLP, com resultados concordantes (GATTEI et al., 2008; ROSSI et al., 2008; SHANAFELT et al., 2008; BULIAN et al., 2014). Nesses trabalhos, o CD49d foi relacionado como um fator de mau prognóstico independente, apresentando correlação significativa com a SG dos pacientes. A detecção desse marcador também tem implicações no tratamento, com os anticorpos monoclonais anti-CD49d como uma futura opção terapêutica (GATTEI et al., 2008; SHANAFELT et al., 2008; BULIAN et al., 2014). Além disso, Rossi e colaboradores observaram que, em pacientes estratificados como estágio Binet A, a expressão de CD49d está associada a maior risco de progressão da neoplasia a estágios mais avançados, identificando, assim, um subgrupo de pacientes classificados como Binet A com pior prognóstico, os quais poderiam ser candidatos a receber tratamento de primeira linha (ROSSI et al., 2008). Dos cinco pacientes com LLC/LLP do presente estudo que apresentavam expressão de CD49d, três foram estratificados como Binet A, e dessa forma, não foram, no momento do diagnóstico, candidatos a receber tratamento. Enquanto que os dois pacientes que apresentavam Binet B e C iniciaram prontamente o tratamento. Como nenhum paciente em que foi avaliada a expressão de CD49d foi a óbito durante o período do estudo, não foi possível investigar se a associação do CD49d e o prognóstico corrobora os dados da literatura.

Com relação aos subtipos LDGCB, LF e LB foram avaliados os marcadores que mostraram diferentes intensidades de expressão pela análise dos histogramas de fusão de arquivos: CD43, CD81, CD49d, CD95, CD62L e CD39.

O CD43 é uma glicoproteína de adesão celular presente na membrana da maioria dos leucócitos (BABINA et al., 1997). No entanto, seu perfil de expressão tem sido associado a um fenótipo sugestivo de malignidade e tem sido utilizado na classificação dos subtipos de LCB,

como LCM e LLC/LLP (DENEYS et al., 2001). Além desses LCB, as células neoplásicas do LB também expressam o marcador CD43 (SWERDLOW et al., 2008), o que, da mesma forma, foi observado no presente estudo. De fato, McGowan e colaboradores (2012) observaram que o CD43 é um bom marcador para diferenciar os casos de LB dos casos de LDGCB com expressão de CD10 (MCGOWAN et al., 2012).

Desde o final da década de 1990, estudiosos têm avaliado a expressão das tetraspaninas em linhagens celulares. Entre elas, a detecção do CD81 foi observada em altas concentrações em 90% das linhagens celulares de LB (FERRER et al., 1998). Apesar disso, raros estudos avaliaram a expressão de CD81 em células neoplásicas de pacientes portadores de linfomas. Um desses estudos observou a expressão de CD81 em diversos subtipos de linfomas, incluindo casos de LDGCB, LF e LB. No entanto, o foco do estudo foi os casos de LDGCB, em que a expressão do CD81 foi associada aos marcadores do CG e, assim, identificada como um possível marcador prognóstico para LDGCB (LUO et al., 2010).

No presente estudo, o LB parece expressar de forma mais intensa os marcadores CD49d e CD81 quando comparado ao LF e ao LDGCB, em especial o CD81 (ver Figura 19). Böttcher e colaboradores (2010) publicaram um estudo em que foram avaliadas as expressões dos marcadores do painel de oito cores do Euroflow de acordo com os subtipos de LCB. Corroborando os dados do presente estudo, foi observada a IFM da expressão de CD81 de 11.344 para o LB, de 4.138 para o LF e de 3.313 para o LDGCB, o que indica que de fato esse marcador pode auxiliar na realização do diagnóstico diferencial, em especial, em relação ao LDGCB (BÖTTCHER et al., 2010). No entanto, para o CD49d, não foi observado o mesmo perfil.

O CD95, ou Fas/APO-1, é uma proteína de membrana da família dos receptores de fator de necrose tumoral (TNFRSF6), a qual quando ligada no seu ligante natural (CD95L) induz a célula ao processo de apoptose (PETER et al., 2015). No presente estudo, a expressão de CD95 se mostrou heterogênea nas células de LF e negativa nos casos de LB e LDGCB, porém nas células de LB, a intensidade de expressão foi mais fraca. Com relação ao LDGCB, a expressão de CD95 está relacionada a um prognóstico favorável, o que reflete em maiores taxas de SG (ESER et al., 2006; CHATZITOLIOS et al., 2010). Estudos que relacionem células neoplásicas de LB e a expressão de CD95 são escassos e datam da década de 1990. De forma semelhante aos resultados encontrados no presente estudo, Nguyen e colaboradores observaram que os linfomas de baixo grau,

como o LF expressaram de forma mais frequente o CD95 quando comparados ao LDGCB e LB (NGUYEN et al., 1996).

De acordo com as publicações do consórcio Euroflow, os marcadores CD62L e CD39 foram adicionados ao painel de oito cores a fim de facilitar o diagnóstico diferencial entre alguns casos de LLP, LZM, LF e LDGCB (VAN DONGEN et al., 2012). O CD39 é uma ectonucleotidase de membrana que hidrolisa adenosina trifosfato (ATP) e é expressa fisiologicamente em neutrófilos, monócitos e linfócitos (PULTE et al., 2007). Enquanto isso, o CD62L (L-selectina) é uma molécula de adesão constitutivamente expressa em leucócitos com uma função primária de direcionar a migração de leucócitos para os gânglios linfáticos (CHOUDHARY et al., 2015). Recentemente, um estudo avaliou a expressão de CD62L e de CD39 nos linfócitos T regulatórios circulantes de pacientes com LDGCB (GLOWALA-KOSINSKA et al., 2013). No entanto, a expressão desses marcadores pelas células neoplásicas não tem sido muito explorada. No presente estudo, foi possível observar diferença na expressão do CD39 entre as células de LDGCB (positivas) e LB e LF (negativas) (ver Figura 19), o que corrobora os dados da literatura em que se observou a IFM de 972 para o LDGCB, de 77 para o LB e de 240 para o LF (BÖTTCHER et al., 2010). Já em relação à expressão do CD62L, não houve diferença entre os subtipos LDGCB, LF e LB, apenas observou-se uma expressão mais intensa desse marcador nos casos de LLC/LLP (Figura 15), o que corrobora os resultados da literatura (CSANAKY et al., 1997; PALS et al., 2007; BÖTTCHER et al., 2010).

As limitações do presente estudo incluem o pequeno número de pacientes em cada subtipo de NCLM-B, e, especialmente, as informações clínicas e resultados laboratoriais não localizados.

8 CONCLUSÃO

A compilação dos resultados encontrados no presente estudo permitiu concluir que:

- Dos 93 casos de NCLM-B, os subtipos mais frequentes foram MM (23,7%), LLC/LLP (15,1%), LDGCB (12,9%), LF (11,8%) e LB (7,5%);
- A idade mediana no momento do diagnóstico foi de 58 anos com um intervalo de 20 a 93 anos e houve um discreto predomínio do gênero masculino (57%);
- A exposição ocupacional a agrotóxicos parece estar relacionada a maior risco de desenvolver NCP e LLC, enquanto que o tabagismo parece estar mais associado ao linfoma folicular. Já a infecção pelo HIV parece ter associação com o linfoma de Burkitt;
- Em relação aos subtipos de LCB, foi observada diferença significativa para os parâmetros idade, dosagem de LDH e expressão de Ki-67;
- A concordância entre os exames de IMF e IHQ foi de 100%, 47,5%, 93,2%, 71,7% e 46,9%, para os subtipos MM, LLC/LLP, LDGCB, LF e LB, respectivamente;
- A maioria dos pacientes portadores de MM (54,6%) foi estratificada como ISS III e a maioria dos pacientes com LLC/LLP (64,3%) nos estágios 0A e IA. Apenas 25,0% e 14,3% dos casos de LDGCB e LB, respectivamente, foram estratificados como risco baixo, enquanto que 54,5% dos casos de LF foram estratificados nesse risco;
- Em relação à resposta ao tratamento, observou-se que os pacientes portadores de LB apresentaram maiores índices de recidiva/progressão (83,3% dos casos), enquanto que aqueles portadores de LLC/LLP apresentaram maiores índices de resposta completa/parcial (87,5% dos casos);
- A frequência de óbito de todos os pacientes durante o período de estudo foi de 31,2%;
- A média da SG foi de 27,6 meses. Em relação às curvas de SG, foi observada diferença significativa entre LB (7,9 meses) e os subtipos LLC/LLP (32,6 meses), LF (24,0 meses) e LDGCB (14,7 meses);

- Para o auxílio no diagnóstico, destaca-se a expressão dos marcadores CD200, CD81 e CD62L nas células de LLC/LLP; CD10, CD43 e CD81 (brilhante) nas células de LB; CD10 e CD95 nas células de LF; e CD39 nas células de LDGCB;
- Não foi possível relacionar a expressão dos marcadores prognósticos CD49d para LLC/LLP, CD81, CD28, CD117 e CD56 para MM e CD10 e Bcl-6 para LDGCB à SG, devido ao pequeno número de casos.

De acordo com o exposto, o presente estudo verificou que o perfil dos pacientes diagnosticados com NCLM-B no HU-UFSC em relação àquele observado na literatura nacional e internacional é semelhante em alguns aspectos e diferente em outros. Além disso, pode-se observar que a IMF, além de apresentar graus de concordância satisfatórios com a IHQ, é um método que tem se destacado na definição do diagnóstico e do prognóstico das NCLM-B pela análise de novos marcadores fenotípicos que podem auxiliar o diagnóstico.

A contribuição do presente estudo para a rotina laboratorial está relacionada principalmente à aplicação da análise dos novos marcadores incluídos no painel de oito cores. Para a clínica, os resultados referentes ao prognóstico, aos protocolos de tratamento, às respostas ao tratamento e à sobrevida dos pacientes refletem as características da população atendida na Instituição.

9 PERSPECTIVAS

O presente estudo tem como perspectiva continuar a análise dos marcadores fenotípicos do painel de oito cores do consórcio Euroflow para auxílio na definição do diagnóstico e do prognóstico de pacientes com NCLM-B.

REFERÊNCIAS

ABDEL-GHAFAR, A. A.; et al. Immunophenotyping of chronic B-cell neoplasms: flow cytometry versus immunohistochemistry. **Hematol Rep**, v. 4, n. 1, p. e3, 2012.

AIGELSREITER, A.; et al. Chlamydia psittaci Infection in nongastrointestinal extranodal MALT lymphomas and their precursor lesions. **Am J Clin Pathol**, v. 135, n. 1, p. 70-5, 2011.

ALAVANJA, M. C.; et al. Non-hodgkin lymphoma risk and insecticide, fungicide and fumigant use in the agricultural health study. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e109332, 2014.

ALIZADEH, A. A.; et al. Genomic-scale gene expression profiling of normal and malignant immune cells. **Curr Opin Immunol**, v. 12, n. 2, p. 219-25, 2000.

ALTMAN, D. G. **Practical Statistics for Medical Research** 1st. London: Chapman and Hall, 1991. 610.

ARCAINI, L.; et al. Prognostic assessment in patients with indolent B-cell lymphomas. **ScientificWorld Journal**, v. 2012, p. 107892, 2012.

ATHAR, S.; et al. Impact of the Follicular Lymphoma International Prognostic Index risk categorization on survival of patients with follicular lymphoma in Pakistani population: a single centre experience. **J Pak Med Assoc**, v. 64, n. 5, p. 563-6, 2014.

BABINA, M.; et al. CD43 (leukosialin, sialophorin) expression is differentially regulated by retinoic acids. **Eur J Immunol**, v. 27, n. 5, p. 1147-51, 1997.

BARRANS, S. L.; et al. Germinal center phenotype and bcl-2 expression combined with the International Prognostic Index

improves patient risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma. **Blood**, v. 99, n. 4, p. 1136-43, 2002.

BARRENA, S.; et al. Aberrant expression of tetraspanin molecules in B-cell chronic lymphoproliferative disorders and its correlation with normal B-cell maturation. **Leukemia**, v. 19, n. 8, p. 1376-83, 2005.

BASSIG, B. A.; et al. Current understanding of lifestyle and environmental factors and risk of non-hodgkin lymphoma: an epidemiological update. **J Cancer Epidemiol**, v. 2012, p. 978930, 2012.

BAUMANN, T.; et al. Chronic lymphocytic leukemia in the elderly: clinico-biological features, outcomes, and proposal of a prognostic model. **Haematologica**, v. 99, n. 10, p. 1599-604, 2014.

BINET, J. L.; et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. **Cancer**, v. 48, n. 1, p. 198-206, 1981.

BOCCOLINI, P. E. M.; et al. Pesticide use and non-Hodgkin's lymphoma mortality in Brazil. **Int J Hyg Environ Health**, v. 216, n. 4, p. 461-6, 2013.

BÖTTCHER, S.; et al. Diagnosis and classification of mature B-cell malignancies. In: VAN DONGEN JJM, D. W. A. L. A. W. V. D. V. V. H. J. H. H. (Ed.). **Nieuwe ontwikkelingen in de Medische Immunologie 2010**. Rotterdam: Afdeling Immunologie, Erasmus MC, Universitair Medisch Centrum, 2010.

BRACHTL, G.; et al. The pathogenic relevance of the prognostic markers CD38 and CD49d in chronic lymphocytic leukemia. **Ann Hematol**, v. 93, n. 3, p. 361-74, 2014.

BRASIL. Boletim Epidemiológico HIV AIDS. Brasília, 2014.

Disponível em: <

http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2014/56677/boletim_2014_1_pdf_60254.pdf >. Acesso em: março de 2014.

BRAYLAN, R. C. Impact of flow cytometry on the diagnosis and characterization of lymphomas, chronic lymphoproliferative disorders and plasma cell neoplasias. **Cytometry A**, v. 58, n. 1, p. 57-61, 2004.

BROYDE, A.; et al. Role and prognostic significance of the Ki-67 index in non-Hodgkin's lymphoma. **Am J Hematol**, v. 84, n. 6, p. 338-43, 2009.

BULIAN, P.; et al. CD49d is the strongest flow cytometry-based predictor of overall survival in chronic lymphocytic leukemia. **J Clin Oncol**, v. 32, n. 9, p. 897-904, 2014.

CAMACHO, F. I.; et al. Improved demonstration of immunohistochemical prognostic markers for survival in follicular lymphoma cells. **Mod Pathol**, v. 24, n. 5, p. 698-707, 2011.

CAMPO, E.; et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. **Blood**, v. 117, n. 19, p. 5019-32, 2011.

CARBONE, A.; et al. Diagnosis and management of lymphomas and other cancers in HIV-infected patients. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 11, n. 4, p. 223-38, 2014.

CASTILLO, J. J.; et al. Population-based prognostic factors for survival in patients with Burkitt lymphoma: an analysis from the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. **Cancer**, v. 119, n. 20, p. 3672-9, 2013.

CHATZITOLIOS, A.; et al. Prognostic significance of CD95, P53, and BCL2 expression in extranodal non-Hodgkin's lymphoma. **Ann Hematol**, v. 89, n. 9, p. 889-96, 2010.

CHESON, B. D.; et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. **J Clin Oncol**, v. 17, n. 4, p. 1244, 1999.

CHIORAZZI, N. Implications of new prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2012, p. 76-87, 2012.

CHOU, T. Multiple myeloma : recent progress in diagnosis and treatment. **J Clin Exp Hematop**, v. 52, n. 3, p. 149-59, 2012.

CHOUDHARY, D.; et al. Increased expression of L-selectin (CD62L) in high-grade urothelial carcinoma: A potential marker for metastatic disease. **Urol Oncol**, ahead of print, 2015.

CIOBANU, A.; et al. Indolent lymphoma: diagnosis and prognosis in medical practice. **Maedica (Buchar)**, v. 8, n. 4, p. 338-42, 2013.

COLOMO, L.; et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. **Blood**, v. 101, n. 1, p. 78-84, 2003.

COOK, J. R.; et al. bcl-2 expression by multicolor flow cytometric analysis assists in the diagnosis of follicular lymphoma in lymph node and bone marrow. **Am J Clin Pathol**, v. 119, n. 1, p. 145-51, 2003.

COSTA, L. J.; et al. Trends in survival of patients with Burkitt lymphoma/leukemia in the USA: an analysis of 3691 cases. **Blood**, v. 121, n. 24, p. 4861-6, 2013.

CRAIG, F. E.; et al. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. **Blood**, v. 111, n. 8, p. 3941-67, 2008.

CSANAKY, G.; et al. Adhesion receptors on peripheral blood leukemic B cells. A comparative study on B cell chronic lymphocytic leukemia and related lymphoma/leukemias. **Leukemia**, v. 11, n. 3, p. 408-15, 1997.

CULTRERA, J. L.; et al. Diffuse large B-cell lymphoma: current strategies and future directions. **Cancer Control**, v. 19, n. 3, p. 204-13, 2012.

DE TUTE, R. M. Flow cytometry and its use in the diagnosis and management of mature lymphoid malignancies. **Histopathology**, v. 58, p. 16, 2011.

DELFA, S. B. **Nuevas estrategias inmunofenotípicas aplicadas al diagnóstico y clasificación de síndromes linfoproliferativos crónicos**. 2011. 180 (Tesis doctoral). Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca.

DENEYS, V.; et al. Reference values for peripheral blood B-lymphocyte subpopulations: a basis for multiparametric immunophenotyping of abnormal lymphocytes. **J Immunol Methods**, v. 253, n. 1-2, p. 23-36, 2001.

DEZUBE, B. J.; et al. Plasma cell disorders in HIV-infected patients: from benign gammopathy to multiple myeloma. **AIDS Read**, v. 14, n. 7, p. 372-4, 377-9, 2004.

DUNPHY, C. H. Contribution of flow cytometric immunophenotyping to the evaluation of tissues with suspected lymphoma? **Cytometry**, v. 42, n. 5, p. 296-306, 2000.

DURIE, B. G.; et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. **Leukemia**, v. 20, n. 9, p. 1467-73, 2006.

EL-SAYED, A. M.; et al. Flow cytometric immunophenotyping (FCI) of lymphoma: correlation with histopathology and immunohistochemistry. **Diagn Pathol**, v. 3, p. 43, 2008.

ESER, B.; et al. Prognostic significance of Fas (CD95/APO-1) positivity in patients with primary nodal diffuse large B-cell lymphoma. **Am J Hematol**, v. 81, n. 5, p. 307-14, 2006.

EUROFLOW. Euroflow - ESLHO. Rotterdam, NL, 2015.
Disponível em: < <http://www.euroflow.org/usr/pub/pub.php> >.

FERNÁNDEZ DE LARREA, C.; et al. Plasma cell leukemia: consensus statement on diagnostic requirements, response criteria and treatment recommendations by the International Myeloma Working Group. **Leukemia**, v. 27, n. 4, p. 780-91, 2013.

FERNBERG, P.; et al. Tobacco use, body mass index and the risk of malignant lymphomas--a nationwide cohort study in Sweden. **Int J Cancer**, v. 118, n. 9, p. 2298-302, 2006.

FERRARIS, A. M.; et al. Serum lactic dehydrogenase as a prognostic tool for non-Hodgkin lymphomas. **Blood**, v. 54, n. 4, p. 928-32, 1979.

FERREIRA, J. M.; et al. Lymphoma subtype incidence rates in children and adolescents: first report from Brazil. **Cancer Epidemiol**, v. 36, n. 4, p. e221-6, 2012.

FERRER, M.; et al. Pattern of expression of tetraspanin antigen genes in Burkitt lymphoma cell lines. **Clin Exp Immunol**, v. 113, n. 3, p. 346-52, 1998.

FERRERI, A. J.; et al. Evidence for an association between *Chlamydia psittaci* and ocular adnexal lymphomas. **J Natl Cancer Inst**, v. 96, n. 8, p. 586-94, 2004.

FIORINO, A. S.; et al. Paraproteinemia, plasmacytoma, myeloma and HIV infection. **Leukemia**, v. 11, n. 12, p. 2150-6, 1997.

FREEDMAN, A. Follicular lymphoma: 2012 update on diagnosis and management. **Am J Hematol**, v. 87, n. 10, p. 988-95, 2012.

FREEDMAN, A. Follicular lymphoma: 2014 update on diagnosis and management. **Am J Hematol**, v. 89, n. 4, p. 429-36, 2014.

FURMAN, R. R. Prognostic markers and stratification of chronic lymphocytic leukemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2010, p. 77-81, 2010.

GATTEI, V.; et al. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 111, n. 2, p. 865-73, 2008.

GENG, C.; et al. Retrospective analysis of 264 multiple myeloma patients. **Oncol Lett**, v. 5, n. 2, p. 707-713, 2013.

GIBSON, T. M.; et al. Smoking, variation in N-acetyltransferase 1 (NAT1) and 2 (NAT2), and risk of non-Hodgkin lymphoma: a pooled analysis within the InterLymph consortium. **Cancer Causes Control**, v. 24, n. 1, p. 125-34, 2013.

GLOBOCAN. Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2012. 2012. Disponível em: < globocan.iarc.fr >. Acesso em: 18/10/2014.

GLOWALA-KOSINSKA, M.; et al. **Association of circulating regulatory T cell number with the incidence and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma**: European Journal of Haematology. 91: 122-128 p. 2013.

GOBBI, P. G.; et al. Hodgkin lymphoma. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 85, n. 2, p. 216-37, 2013.

GORCZYCA, W. Prognostic and predictive markers in hematologic neoplasms. A review. **Pol J Pathol**, v. 62, n. 4, p. 189-205, 2011.

GOUVEIA, G. R.; et al. Prevalence of non-Hodgkin lymphomas in São Paulo, Brazil. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 33, n. 4, p. 317, 2011.

GREIPP, P. R.; et al. International staging system for multiple myeloma. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 15, p. 3412-20, 2005.

GROGG, K. L.; et al. HIV infection and lymphoma. **J Clin Pathol**, v. 60, n. 12, p. 1365-72, 2007.

GÜSSOW, D.; et al. The human beta 2-microglobulin gene. Primary structure and definition of the transcriptional unit. **J Immunol**, v. 139, n. 9, p. 3132-8, 1987.

HAMBLIN, T. J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukaemia. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 20, n. 3, p. 455-68, 2007.

HAMEED, A.; et al. Bone disease in multiple myeloma: pathophysiology and management. **Cancer Growth Metastasis**, v. 7, p. 33-42, 2014.

HANS, C. P.; et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. **Blood**, v. 103, n. 1, p. 275-82, 2004.

HARADA, S.; et al. Molecular and immunological dissection of diffuse large B cell lymphoma: CD5+, and CD5- with CD10+ groups may constitute clinically relevant subtypes. **Leukemia**, v. 13, n. 9, p. 1441-7, 1999.

HIGGINS, R. A.; et al. Application of immunohistochemistry in the diagnosis of non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma. **Arch Pathol Lab Med**, v. 132, n. 3, p. 441-61, 2008.

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

HODGKIN. On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. **Med Chir Trans**, v. 17, p. 68-114, 1832.

HOFFBRAND, A. V.; et al. **Fundamentos em Hematologia**. 4th. Porto Alegre: Artmed 2004. 358.

HOSTER, E.; et al. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. **Blood**, v. 111, n. 2, p. 558-65, 2008.

HUNGRIA, V. T.; et al. Confirmation of the utility of the International Staging System and identification of a unique pattern of disease in Brazilian patients with multiple myeloma. **Haematologica**, v. 93, n. 5, p. 791-2, 2008.

INCA. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. 2014. Disponível em: < www.inca.gov.br >. Acesso em: 19/10/2014.

JAFFE, E. S.; et al. Introduction and overview of the classification of the lymphoid neoplasms. In: PRESS, I. (Ed.). **WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. 4th Edition. Lyon: IARC Press, 2008. cap. 36, p.157 - 166.

JEMAL, A.; et al. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011.

JENNINGS, C. D.; et al. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. **Blood**, v. 90, n. 8, p. 2863-92, 1997.

JUNLÉN, H. R.; et al. Follicular lymphoma in Sweden: nationwide improved survival in the rituximab era, particularly in elderly women: a Swedish Lymphoma Registry Study. **Leukemia**, v. 29, n. 3, p. 668-76, 2015.

KAWASAKI, B. T.; et al. Cancer stem cells, CD200 and immunoevasion. **Trends Immunol**, v. 29, n. 10, p. 464-8, 2008.

KIESEWETTER, B.; et al. Antibiotic therapy in nongastrointestinal MALT lymphoma: a review of the literature. **Blood**, v. 122, n. 8, p. 1350-7, 2013.

KOCJAN, G. Best Practice No 185. Cytological and molecular diagnosis of lymphoma. **J Clin Pathol**, v. 58, n. 6, p. 561-7, 2005.

KOISO, H.; et al. Follicular lymphoma presenting with marked splenomegaly: report of three cases. **Acta Haematol**, v. 128, n. 1, p. 47-52, 2012.

KUPPERS, R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 4, p. 251-62, 2005.

KÜPPERS, R.; et al. Hodgkin lymphoma. **J Clin Invest**, v. 122, n. 10, p. 3439-47, 2012.

KUPPERS, R.; et al. Cellular origin of human B-cell lymphomas. **N Engl J Med**, v. 341, n. 20, p. 1520-9, 1999.

KYLE, R. A.; et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. **Mayo Clin Proc**, v. 78, n. 1, p. 21-33, 2003.

LADYZYNSKI, P.; et al. A network meta-analysis of progression free survival and overall survival in first-line treatment of chronic lymphocytic leukemia. **Cancer Treat Rev**, v. 41, n. 2, p. 77-93, 2015.

LIM, S. Y.; et al. The Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index: Does it work in routine practice? **Oncol Lett**, v. 1, n. 1, p. 187-188, 2010.

LIN, F.; et al. Standardization of diagnostic immunohistochemistry: literature review and geisinger experience. **Arch Pathol Lab Med**, v. 138, n. 12, p. 1564-77, 2014.

LUDWIG, H.; et al. International Myeloma Working Group recommendations for global myeloma care. **Leukemia**, v. 28, n. 5, p. 981-92, 2014.

LUDWIG, H.; et al. Immunoglobulin heavy/light chain ratios improve paraprotein detection and monitoring, identify residual disease and correlate with survival in multiple myeloma patients. **Leukemia**, v. 27, n. 1, p. 213-9, 2013.

LUO, R. F.; et al. CD81 protein is expressed at high levels in normal germinal center B cells and in subtypes of human lymphomas. **Hum Pathol**, v. 41, n. 2, p. 271-80, 2010.

LUZ, L. L.; et al. Trends in mortality rates from non-Hodgkin lymphoma in Southeast Brazil, 1980-2007. **Cad Saude Publica**, v. 27, n. 7, p. 1340-8, 2011.

MAROTTA, G.; et al. Low-dose fludarabine and cyclophosphamide in elderly patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia refractory to conventional therapy. **Haematologica**, v. 85, n. 12, p. 1268-70, 2000.

MARTÍNEZ, A.; et al. Routine use of immunophenotype by flow cytometry in tissues with suspected hematological malignancies. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 56, n. 1, p. 8-15, 2003.

MATEO, G.; et al. Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: a study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 16, p. 2737-44, 2008.

MCGOWAN, P.; et al. Differentiating between Burkitt lymphoma and CD10+ diffuse large B-cell lymphoma: the role of commonly used flow cytometry cell markers and the application of a multiparameter scoring system. **Am J Clin Pathol**, v. 137, n. 4, p. 665-70, 2012.

MERHI, M.; et al. Occupational exposure to pesticides and risk of hematopoietic cancers: meta-analysis of case-control studies. **Cancer Causes Control**, v. 18, n. 10, p. 1209-26, 2007.

MOLYNEUX, E. M.; et al. Burkitt's lymphoma. **Lancet**, v. 379, n. 9822, p. 1234-44, 2012.

MONDAL, S. K.; et al. Malignant lymphoma in Eastern India: a retrospective analysis of 455 cases according to World Health Organisation classification. **J Cancer Res Ther**, v. 10, n. 2, p. 354-8, 2014.

MORTON, L. M.; et al. Cigarette smoking and risk of non-Hodgkin lymphoma: a pooled analysis from the International Lymphoma Epidemiology Consortium (interlymph). **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 14, n. 4, p. 925-33, 2005.

MOUNIER, N.; et al. Ten-year relative survival and causes of death in elderly patients treated with R-CHOP or CHOP in the

GELA LNH-985 trial. **Clin Lymphoma Myeloma Leuk**, v. 12, n. 3, p. 151-4, 2012.

MÜLLER, A. M.; et al. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): trends, geographic distribution, and etiology. **Ann Hematol**, v. 84, n. 1, p. 1-12, 2005.

NAVARRO, W. H.; et al. AIDS-related lymphoproliferative disease. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 13-20, 2006.

NGUYEN, P. L.; et al. Expression of CD95 antigen and Bcl-2 protein in non-Hodgkin's lymphomas and Hodgkin's disease. **Am J Pathol**, v. 148, n. 3, p. 847-53, 1996.

NOGAI, H.; et al. Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 14, p. 1803-11, 2011.

OKEN, M. M.; et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. **Am J Clin Oncol**, v. 5, n. 6, p. 649-55, 1982.

OLUWASOLA, A. O.; et al. A fifteen-year review of lymphomas in a Nigerian tertiary healthcare centre. **J Health Popul Nutr**, v. 29, n. 4, p. 310-6, 2011.

PAIVA, B.; et al. Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 78, n. 4, p. 239-52, 2010.

PAIVA, B.; et al. Clinical significance of CD81 expression by clonal plasma cells in high-risk smoldering and symptomatic multiple myeloma patients. **Leukemia**, v. 26, n. 8, p. 1862-9, 2012.

PALS, S. T.; et al. Lymphoma dissemination: the other face of lymphocyte homing. **Blood**, v. 110, n. 9, p. 3102-11, 2007.

PALUMBO, G. A.; et al. CD200 expression may help in differential diagnosis between mantle cell lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Leuk Res**, v. 33, n. 9, p. 1212-6, 2009.

PEDREIRA, C. E.; et al. Generation of flow cytometry data files with a potentially infinite number of dimensions. **Cytometry A**, v. 73, n. 9, p. 834-46, 2008.

PEDREIRA, C. E.; et al. Overview of clinical flow cytometry data analysis: recent advances and future challenges. **Trends Biotechnol**, v. 31, n. 7, p. 415-25, 2013.

PEDROSA, M. F.; et al. Non-Hodgkin's lymphoma in childhood: clinical and epidemiological characteristics and survival analysis at a single center in Northeast Brazil. **J Pediatr (Rio J)**, v. 83, n. 6, p. 547-54, 2007.

PEREZ-ANDRES, M.; et al. Soluble and membrane levels of molecules involved in the interaction between clonal plasma cells and the immunological microenvironment in multiple myeloma and their association with the characteristics of the disease. **Int J Cancer**, v. 124, n. 2, p. 367-75, 2009.

PERKINS, A. S.; et al. Burkitt lymphoma in adults. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 341-8, 2008.

PETER, M. E.; et al. The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. **Cell Death Differ**, v. 22, n. 4, p. 549-559, 2015.

PFREUNDSCHUH, M.; et al. CHOP-like chemotherapy with or without rituximab in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: 6-year results of an open-label randomised study of the MabThera International Trial (MInT) Group. **Lancet Oncol**, v. 12, n. 11, p. 1013-22, 2011.

PULTE, E. D.; et al. CD39/NTPDase-1 activity and expression in normal leukocytes. **Thromb Res**, v. 121, n. 3, p. 309-17, 2007.

QUEIROGA, E. M.; et al. Burkitt lymphoma in Brazil is characterized by geographically distinct clinicopathologic features. **Am J Clin Pathol**, v. 130, n. 6, p. 946-56, 2008.

RAI, K. R.; et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 46, n. 2, p. 219-34, 1975.

REGO, E. M.; et al. Papel da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das pancitopenias e das linfocitoses. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 31, n. 5, p. 8, 2009.

RIA, R.; et al. Novel agents and new therapeutic approaches for treatment of multiple myeloma. **World J Methodol**, v. 4, n. 2, p. 73-90, 2014.

ROMAN, E.; et al. Epidemiology of lymphomas. **Histopathology**, v. 58, n. 1, p. 4-14, 2011.

ROSE, D. M.; et al. Alpha4 integrins and the immune response. **Immunol Rev**, v. 186, p. 118-24, 2002.

ROSENQUIST, R.; et al. Prognostic markers and their clinical applicability in chronic lymphocytic leukemia: where do we stand? **Leuk Lymphoma**, v. 54, n. 11, p. 2351-64, 2013.

ROSSI, D.; et al. CD49d expression is an independent risk factor of progressive disease in early stage chronic lymphocytic leukemia. **Haematologica**, v. 93, n. 10, p. 1575-9, 2008.

SAGAERT, X.; et al. The pathogenesis of MALT lymphomas: where do we stand? **Leukemia**, v. 21, n. 3, p. 389-96, 2007.

SAHARA, N.; et al. Clinicopathological and prognostic characteristics of CD56-negative multiple myeloma. **Br J Haematol**, v. 117, n. 4, p. 882-5, 2002.

SANDES, A. F.; et al. CD200 has an important role in the differential diagnosis of mature B-cell neoplasms by multiparameter flow cytometry. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 86, n. 2, p. 98-105, 2014.

SANT, M.; et al. Influence of morphology on survival for non-Hodgkin lymphoma in Europe and the United States. **Eur J Cancer**, v. 44, n. 4, p. 579-87, 2008.

SCHINASI, L.; et al. Non-Hodgkin lymphoma and occupational exposure to agricultural pesticide chemical groups and active ingredients: a systematic review and meta-analysis. **Int J Environ Res Public Health**, v. 11, n. 4, p. 4449-527, 2014.

SCHÖLLKOPF, C.; et al. Cigarette smoking and risk of non-Hodgkin's lymphoma--a population-based case-control study. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 14, n. 7, p. 1791-6, 2005.

SEGAL, G. H.; et al. Concomitant delineation of surface Ig, B-cell differentiation antigens, and HLADR on lymphoid proliferations using three-color immunocytometry. **Cytometry**, v. 12, n. 4, p. 350-9, 1991.

SEHN, L. H. Optimal use of prognostic factors in non-Hodgkin lymphoma. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program.**, p. 295 - 302, 2006.

SHANAFELT, T. D.; et al. CD49d expression is an independent predictor of overall survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a prognostic parameter with therapeutic potential. **Br J Haematol**, v. 140, n. 5, p. 537-46, 2008.

SHANKLAND, K. R.; et al. Non-Hodgkin lymphoma. **Lancet**, v. 380, n. 9844, p. 848-57, 2012.

SHIELS, M. S.; et al. The epidemic of non-Hodgkin lymphoma in the United States: disentangling the effect of HIV, 1992-2009. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 22, n. 6, p. 1069-78, 2013.

SMITH, A.; et al. The Haematological Malignancy Research Network (HMRN): a new information strategy for population based epidemiology and health service research. **Br J Haematol**, v. 148, n. 5, p. 739-53, 2010.

SMOLEJ, L. Why R-CHOP for first line treatment of chronic lymphocytic leukemia? **Int J Lab Hematol**, v. 29, n. 6, p. 478-9; author reply 479, 2007.

STEIN, H. Hodgkin Lymphoma. In: PRESS, I. (Ed.). **Who classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. 4th Edition. Lyon: IARC Press, 2008. cap. 12, p.321 - 334.

SWERDLOW, S. H.; et al. **WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. 4th Edition. Lyon: IARC Press, 2008.

TAKATA, K.; et al. Duodenal and nodal follicular lymphomas are distinct: the former lacks activation-induced cytidine deaminase and follicular dendritic cells despite ongoing somatic hypermutations. **Mod Pathol**, v. 22, n. 7, p. 940-9, 2009.

TAKVORIAN, T.; et al. Staging of non-Hodgkin's lymphoma. In: (Ed.). **Malignant Lymphomas (Atlas of Clinical Oncology)**. 1st edition. Ontario: Pmph USA, 2002. cap. 4, p.67 - 83.

TALAUlikAR, D.; et al. Clinical role of flow cytometry in redefining bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) - a new perspective. **Histopathology**, v. 52, n. 3, p. 340-7, 2008.

TAO, J.; et al. Epstein-Barr virus associated polymorphic lymphoproliferative disorders occurring in nontransplant settings. **Lab Invest**, v. 81, n. 4, p. 429-37, 2001.

TEMMIM, L.; et al. Clinical characteristics and pathological classification of non-Hodgkin's lymphoma in Kuwait. Results of a collaborative study with the International Lymphoma Study Group (ILSG). **Leuk Lymphoma**, v. 45, n. 9, p. 1865-71, 2004.

THE INTERNATIONAL NON-HODGKIN'S LYMPHOMA PROGNOSTIC FACTORS PROJECT. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. **N Engl J Med**, v. 329, n. 14, p. 987-94, 1993.

THE NON-HODGKIN'S LYMPHOMA CLASSIFICATION PROJECT. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. **Blood**, v. 89, n. 11, p. 3909-18, 1997.

VAN DONGEN, J. J.; et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. **Leukemia**, v. 26, n. 9, p. 1908-75, 2012.

VAN DONGEN, J. J.; et al. EuroFlow: Resetting leukemia and lymphoma immunophenotyping. Basis for companion diagnostics and personalized medicine. **Leukemia**, v. 26, n. 9, p. 1899-907, 2012.

WILDES, T. M.; et al. Rituximab is associated with improved survival in Burkitt lymphoma: a retrospective analysis from two

US academic medical centers. **Ther Adv Hematol**, v. 5, n. 1, p. 3-12, 2014.

WILLETT, E. V.; et al. Tobacco and alcohol consumption and the risk of non-Hodgkin lymphoma. **Cancer Causes Control**, v. 15, n. 8, p. 771-80, 2004.

WITZIG, T. E.; et al. Rapid immunotyping of B-cell non-Hodgkin's lymphomas by flow cytometry. A comparison with the standard frozen-section method. **Am J Clin Pathol**, v. 94, n. 3, p. 280-6, 1990.

YAMAGUCHI, M.; et al. De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: results of a detailed clinicopathological review in 120 patients. **Haematologica**, v. 93, n. 8, p. 1195-202, 2008.

ZENZ, T.; et al. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 1, p. 37-50, 2010.

ZHANG, X. M.; et al. New immunohistochemistry for B-cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. **Arch Pathol Lab Med**, v. 138, n. 12, p. 1666-72, 2014.

ZU, Y.; et al. Basic Principles of Flow Cytometry. In: CAGLE, P. T. e ALLEN, T. C. (Ed.). **Basic Concepts of Molecular Pathology**: Springer, v.2, 2009. cap. 15, p.139 - 146.

ZUCCA, E.; et al. Emerging role of infectious etiologies in the pathogenesis of marginal zone B-cell lymphomas. **Clin Cancer Res**, v. 20, n. 20, p. 5207-16, 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “Neoplasias de Células Linfoides Maduras: Avaliação dos Casos Diagnosticados e Tratados no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina”. Neste estudo pretendemos avaliar os casos de neoplasias linfoides maduras (NCLM) diagnosticados e tratados pelo Serviço de Hematologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC).

O objetivo do estudo é avaliar o perfil dos pacientes diagnosticados com neoplasias de células linfoides maduras (NCLM) e tratados pelo Serviço de Hematologia do HU-UFSC a fim de aperfeiçoar o atendimento a esses pacientes.

Para esse estudo adotaremos os seguintes procedimentos: análise do prontuário e dos resultados dos exames laboratoriais.

Não é necessária a coleta de uma nova amostra biológica e não há riscos para nenhuma das partes.

O benefício desse trabalho é que fará um retrato da realidade das NCLM no HU-UFSC e discutirá as dificuldades encontradas no diagnóstico e tratamento a fim de propor soluções, visando ao melhor atendimento dos pacientes.

Para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar o seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento.

O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada.

O Sr (a) não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável e a outra será fornecida a você.

Eu, _____, portador do documento de identidade _____ fui informado (a) dos objetivos do estudo “Neoplasias de Células Linfoides Maduras: Avaliação dos Casos Diagnosticados e Tratados no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina” de maneira clara e detalhada e esclareci as minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar a minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar deste estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de esclarecer as minhas dúvidas.

Florianópolis, ____ de _____ de 20__.

Nome e assinatura do participante

Chandra Chiappin Cardoso, assinatura do pesquisador

Prof Maria Claudia Santos da Silva, assinatura do orientador do estudo

Nome e assinatura da testemunha

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP HU).

APÊNDICE B – Formulário de coleta de dados do prontuário

Paciente:				
Prontuário/registro:		Data de nascimento:		Gênero:
Naturalidade:			Residência:	
Estado civil:			Etnia:	
Escolaridade:			Profissão:	
Diagnóstico:			Data diagnóstico:	
Estadiamento:			Idade no diagnóstico:	
Fatores de risco:				
Comorbidades:				
Observação:				
Motivo da internação:				
Dados clínicos:				
Resposta ao tratamento:				
Óbito:				

APÊNDICE C - Estadiamento, protocolos de tratamento, resposta ao tratamento e óbito dos 22 pacientes com mieloma múltiplo.

Gênero	Idade	Estadiamento (ISS)	Protocolo de tratamento 1	Protocolo de tratamento 2	Resposta ao tratamento	Óbito
F	66	II	Expectante		Tratamento comorbidades	Sim
F	79	NA	Dexametasona		Diagnóstico seguido de óbito	Sim
M	43	NA	Expectante		Tratamento comorbidades	Sim
F	64	III	Dexametasona + talidomida + pamidronato		Completa/parcial	Não
M	73	II	Expectante		Expectante	Não
M	41	I	Dexametasona + talidomida + pamidronato		Recidiva/progressão	Sim
M	47	I	Dexametasona + talidomida	Ciclofosfamida	Completa/parcial	Não
M	58	II	Dexametasona + talidomida + melfalano		Recidiva/progressão	Sim
F	64	III	Dexametasona + talidomida	Vincristina + doxorubicina + dexametasona	Completa/parcial	Não
F	71	I	Dexametasona + talidomida + pamidronato		Completa/parcial	Não
F	76	III	Tratamento comorbidades		Tratamento comorbidades	Sim
F	93	NA	Dexametasona + talidomida + pamidronato	Dexametasona	Recidiva/progressão	Sim

(continuação)

Gênero	Idade	Estadiamento (ISS)	Protocolo de tratamento 1	Protocolo de tratamento 2	Resposta ao tratamento	Óbito
F	63	II	Expectante	Dexametasona + talidomida	Recidiva/progressão	Não
F	70	III	Dexametasona + talidomida + pamidronato	Bortezomibe	Completa/parcial	Não
F	51	III	Dexametasona	Bortezomibe	Completa/parcial	Não
M	68	III	Dexametasona	Bortezomibe	Completa/parcial	Não
M	58	III	Dexametasona + talidomida + pamidronato + ciclofosfamida		Completa/parcial	Sim
M	69	III	Dexametasona + talidomida + -pamidronato		Recidiva/progressão	Sim
F	62	III	Dexametasona + talidomida		Completa/parcial	Não
F	62	III	Dexametasona + ciclofosfamida + Fbortezomibe	Bortezomibe	Completa/parcial	Não
F	74	III	Prednisona + melfalano + pamidronato		Completa/parcial	Não
F	63	III	Prednisona + melfalano + pamidronato + talidomida		Recidiva/progressão	Sim

Nota: NA: não avaliado por falta de informações; ISS: International Staging System.

APÊNDICE D- Estadiamento, protocolos de tratamento, resposta ao tratamento e óbito dos 14 pacientes com leucemia linfocítica crônica de células B.

Gênero	Idade	Estadiamento (Rai e Binet)	Protocolo de tratamento 1	Protocolo de tratamento 2	Resposta ao tratamento	Óbito
M	63	0A	Expectante	Clorambucil	Completa/parcial	Não
F	75	0A	Expectante	Clorambucil	Completa/parcial	Não
M	64	IA	Clorambucil	Fludarabina	Recidiva/progressão	Sim
F	65	0A	Expectante		Expectante	Não
F	60	0A	Expectante		Expectante	Não
F	45	IA	Expectante		Tratamento comorbidades	Não
M	60	0A	Expectante		Tratamento comorbidades	Não
M	51	IIA	Expectante	Fludarabina	Completa/parcial	Não
M	51	IA	Expectante		Expectante	Não
F	80	IVC	Clorambucil		Completa/parcial	Não
M	57	IVB	Clorambucil		Completa/parcial	Não
M	69	IVB	R-CHOP		Completa/parcial	Não
F	78	IIIC	Clorambucil		Completa/parcial	Não
M	74	IA	Expectante		Expectante	Não

Nota: NA: não avaliado por falta de informações; R-CHOP: rituximabe, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona.

APÊNDICE E - Estadiamento, protocolos de tratamento, resposta ao tratamento e óbito dos 12 pacientes com linfoma difuso de grandes células B.

Gênero	Idade	Estadiamento	Estratificação pelo risco (IPI)	Protocolo de tratamento 1	Protocolo de tratamento 2	Resposta ao tratamento	Óbito
F	20	IIA	Baixo	R-CHOP	HyperCVAD	Completa/parcial	Não
F	71	IIIA	Alto	R-CHOP		Recidiva/progressão	Sim
F	54	IVB	Alto	CVP	R-CHOP	Completa/parcial	Não
M	72	IIC	Intermediário - alto	R-CHOP	R-GCD	Recidiva/progressão	Sim
M	52	IIC	Intermediário	R-CHOP	R-DHAP	Recidiva/progressão	Sim
M	49	IIIB	Intermediário	R-CHOP	R-DHAP	Recidiva/progressão	Sim
F	69	IVD	Alto	R-CHOP		Recidiva/progressão	Sim
M	50	IVB	Intermediário - alto	R-CHOP		Completa/parcial	Não
M	50	IA	Baixo	R-CHOP		Completa/parcial	Não
M	25	IIA	Intermediário	R-CHOP		Recidiva/progressão	Não
M	53	IIA	Intermediário	R-CHOP		Completa/parcial	Não
F	55	IIIA	Baixo	R-CHOP		Completa/parcial	Não

Nota: IPI: International Prognostic Index; R-CHOP: rituximabe, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona; CVP: ciclofosfamida, vincristina e prednisona; HyperCVAD: ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina e dexametasona, alternados com ciclos de metotrexato e citarabina; R-DHAP: rituximabe, dexametasona, altas doses de citarabina e cisplatina; GCD: gencitabina, carboplatina e dexametasona.

APÊNDICE F - Estadiamento, protocolos de tratamento, resposta ao tratamento e óbito dos 11 pacientes com linfoma folicular.

Gênero	Idade	Estadiamento	Estratificação pelo risco (FLIPI)	Protocolo de tratamento 1	Protocolo de tratamento 2	Resposta ao tratamento	Óbito
M	68	IVA	Alto	CVP		Recidiva/progressão	Sim
M	67	IIA	Baixo	Expectante/ radioterapia		Expectante	Não
F	34	IIIA	Baixo	R-CHOP		Completa/parcial	Não
M	45	IIA	Baixo	Expectante		Expectante	Não
M	67	IIIA	Alto	R-CHOP		Completa/parcial	Não
F	46	IVE	Alto	R-CHOP		Completa/parcial	Não
M	57	IVC	Alto	R-CHOP		Recidiva/progressão	Sim
M	39	IIA	Baixo	R-CHOP	DHAP	Recidiva/progressão	Não
M	54	IVA	Baixo	Expectante		Expectante	Não
F	53	IVB	Baixo	Expectante		Expectante	Não
M	70	IVB	Alto	R-CVP	R-CHOP	Completa/parcial	Não

Nota: FLIPI: Follicular Lymphoma International Prognostic Index; R-CHOP: rituximabe, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona; CVP: ciclofosfamida, vincristina e prednisona; R-CVP: rituximabe, ciclofosfamida, vincristina e prednisona DHAP: dexametasona, altas doses de citarabina e cisplatina.

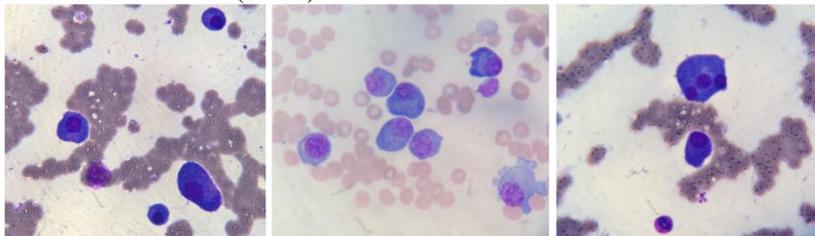
APÊNDICE G - Estadiamento, protocolos de tratamento, resposta ao tratamento e óbito dos sete pacientes com linfoma de Burkitt.

Gênero	Idade	Estadiamento	Estratificação pelo risco	Protocolo de tratamento	Resposta ao tratamento	Óbito
M	32	IVB	Alto	HyperCVAD	Recidiva/progressão	Sim
M	36	IVB	Intermediário - alto	Dexametasona	Diagnóstico seguido de óbito	Sim
F	61	IVB	Intermediário - alto	EPOCH	Recidiva/progressão	Sim
M	25	IIB	Baixo	R-CHOP/HyperCVAD	Completa/parcial	Não
M	38	IVB	Intermediário - alto	HyperCVAD	Recidiva/progressão	Sim
M	23	IVB	Intermediário - alto	HyperCVAD	Recidiva/progressão	Sim
F	33	IVB	Intermediário - alto	R-DA-EPOCH	Recidiva/progressão	Não

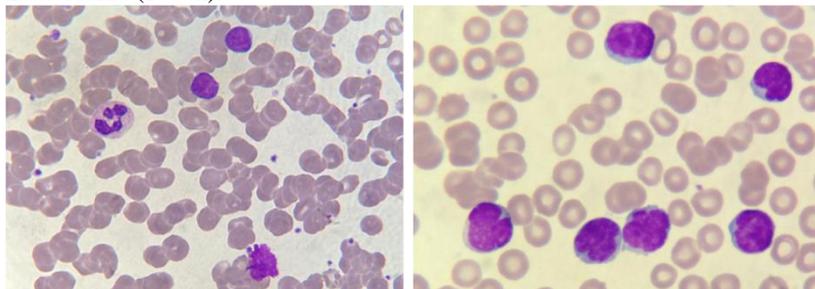
Nota: R-CHOP: rituximabe, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona; HyperCVAD: ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina e dexametasona, alternados com ciclos de metotrexato e citarabina; EPOCH: etoposide, prednisona, vincristina, ciclofosfamida e doxorubicina; R-DA-EPOCH: dose ajustada, com a inserção do rituximabe.

APÊNDICE H - Imagens das células neoplásicas de pacientes diagnosticados com NCLM-B do presente estudo.

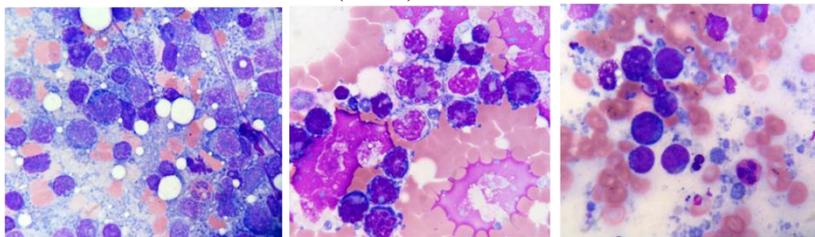
Imagens ilustrativas das células plasmocitárias neoplásicas na amostra de aspirado de medula óssea de três pacientes portadores de mieloma múltiplo incluídos neste estudo (1000x).



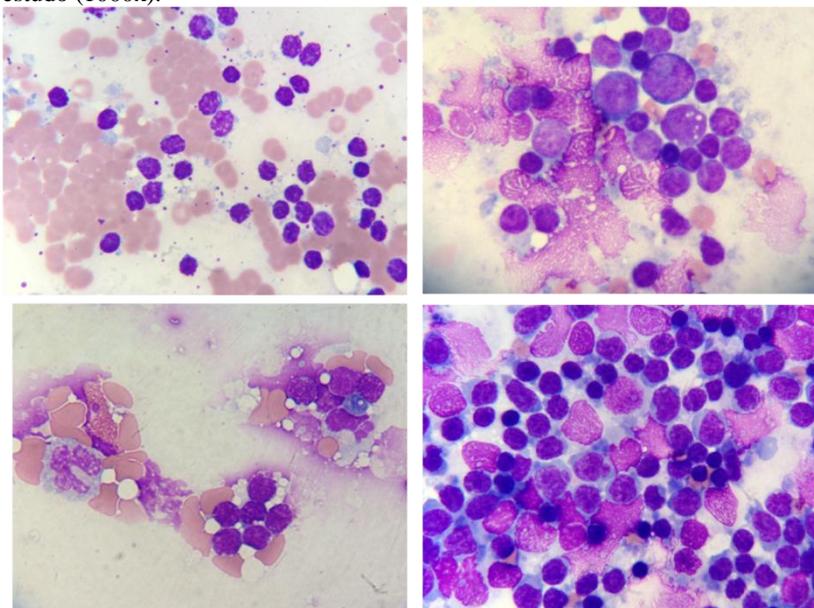
Imagens ilustrativas das células neoplásicas na amostra de sangue periférico de dois pacientes portadores de leucemia linfocítica crônica de células B incluídos neste estudo (1000x).



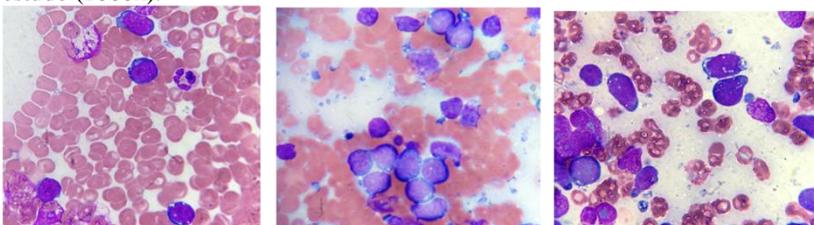
Imagens ilustrativas das células neoplásicas nas amostras de biópsia e de aspirado de linfonodo de três pacientes portadores de linfoma difuso de grandes células B incluídos neste estudo (1000x).



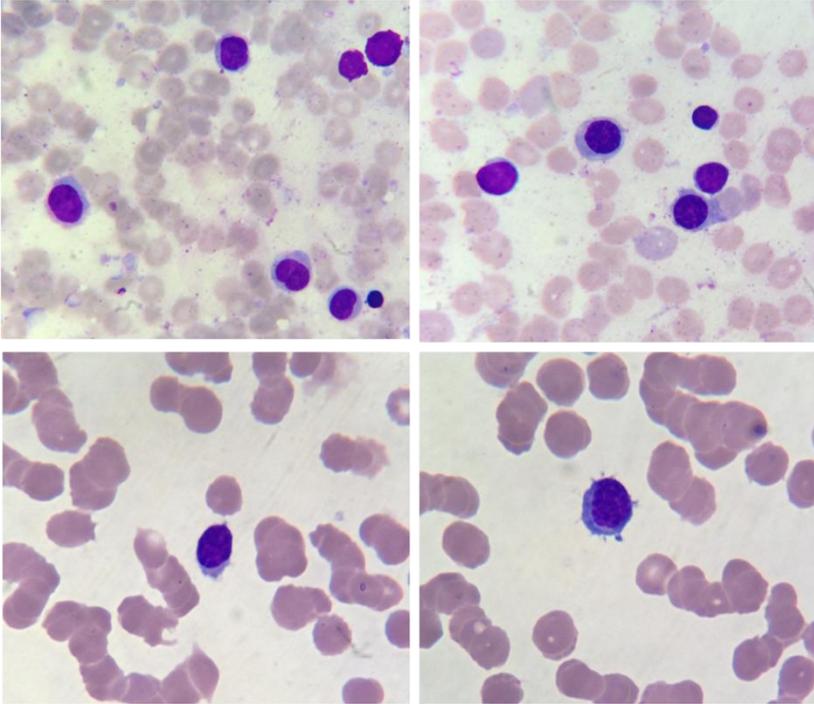
Imagens ilustrativas das células neoplásicas nas amostras de biópsia de linfonodo de quatro pacientes portadores de linfoma folicular incluídos neste estudo (1000x).



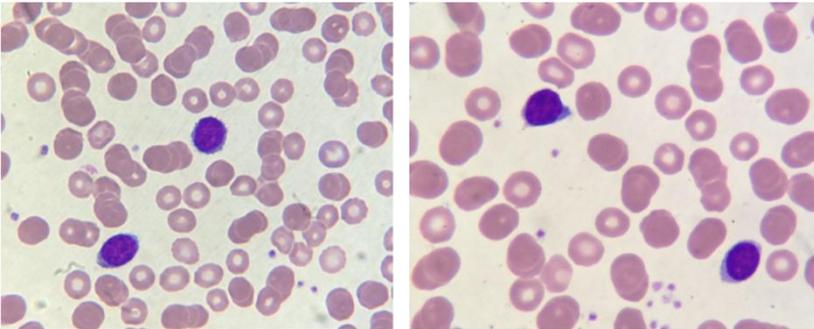
Imagens ilustrativas das células neoplásicas nas amostras de aspirado de linfonodo de três pacientes portadores de linfoma de Burkitt incluídos neste estudo (1000x).



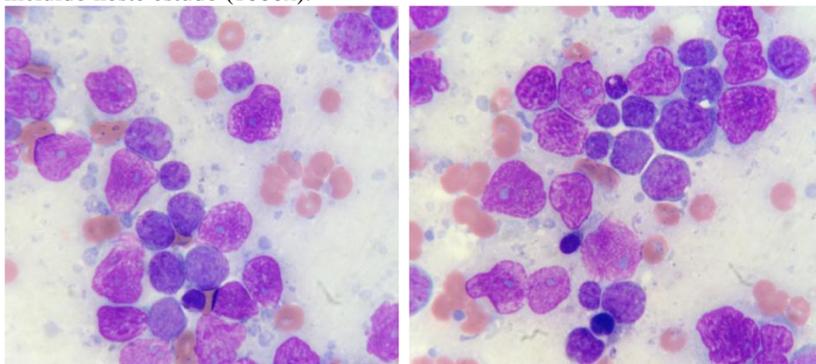
Imagens ilustrativas das células neoplásicas nas amostras de aspirado de medula óssea de dois pacientes portadores de tricoleucemia incluídos neste estudo (1000x).



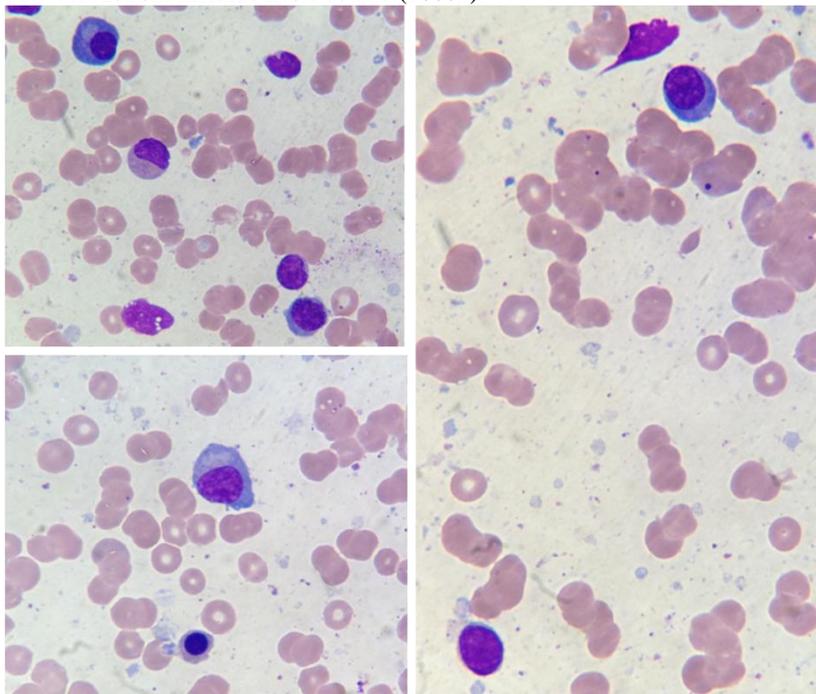
Imagens ilustrativas das células neoplásicas na amostra de sangue periférico de um paciente portador de linfoma da zona marginal incluído neste estudo (1000x).



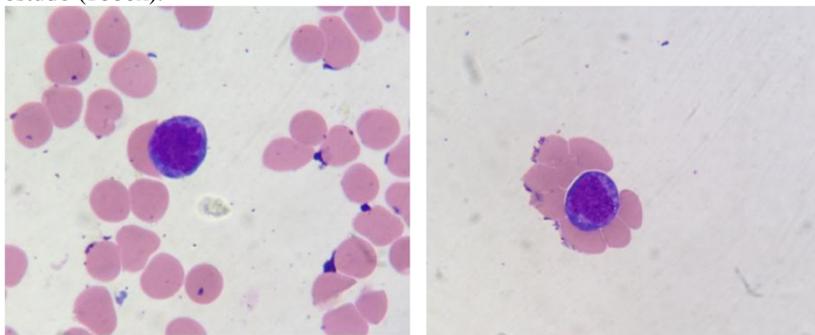
Imagens ilustrativas das células neoplásicas na amostra de biópsia de linfonodo de um paciente portador de linfoma de células do manto ciclina D1 positivo incluído neste estudo (1000x).



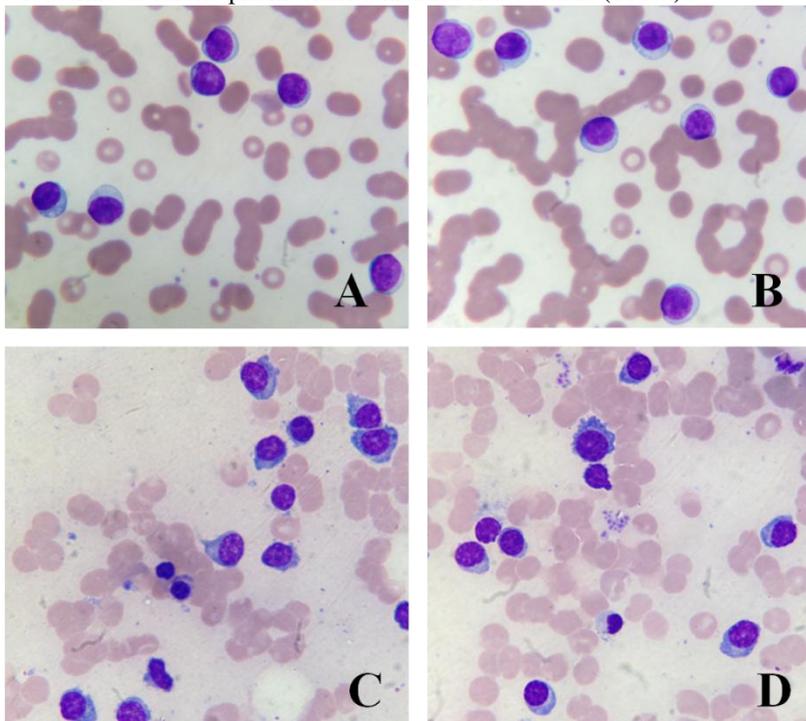
Imagens ilustrativas das células neoplásicas na amostra de aspirado de medula óssea de um paciente portador de linfoma linfoplasmacítico/macroglobulinemia de Waldenström incluído neste estudo (1000x).



Imagens ilustrativas das células neoplásicas na amostra de aspirado de lesão de mucosa oral de um paciente portador de linfoma plasmablástico incluído neste estudo (1000x).



Imagens ilustrativas das células neoplásicas na amostra de sangue periférico (A e B) e de aspirado de medula óssea (C e D) de um paciente portador de leucemia de células plasmocitárias incluído neste estudo (1000x).



ANEXOS

ANEXO A – Valores de referências dos parâmetros laboratoriais dos exames analisado no presente estudo.

Parâmetro (unidade)	Valor de referência	
	Masculino	Feminino
LDH (U/L)	85 - 227	81 - 234
Hemoglobina (g/dL)	13,0 - 18,0	12,0 - 16,0
Beta-2-microglobulina (ng/mL)	609 - 2164	609 - 2164
Cálcio (mg/dL)	8,5 - 10,1	8,5 - 10,1
Creatinina (mg/dL)	0,8 - 1,3	0,6 - 1,0
Albumina (g/dL)	3,4 - 5,0	3,4 - 5,0

ANEXO B - Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa com seres humanos (CEPSH) da UFSC

Certificado

http://www.reitoria.ufsc.br/~hpcep/projeto_cep/ce



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CERTIFICADO Nº 913

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º 0584-OR/99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o conteúdo no Regimento Interno do CEPSH, CERTIFICA que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP.

APROVADO

PROCESSO: 913 FR: 359548

TÍTULO: Estudo sobre a prevalência, características clínicas e laboratoriais, sócio-demográficas e sobrevida dos pacientes com Neoplásia Hematolípica atendidos no Hospital Universitário - UFSC.

AUTOR: Joana Angela Gonzaga Del Moral, Lúcia Haenrichen Bento, Thais Helena Otto da Silva

FLORIANÓPOLIS, 30 de Agosto de 2010

Magda Santos Koenich
Coordenadora do CEPSH/UFSC

Profª Magda Santos Koenich
Subcoordenadora
CEPSH/PRPE/UFSC