



FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE NO
ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

CLÁUDIO ALEXANDRE DE SOUSA MARTINS

LINFOMA FOLICULAR
- O ESTADO DA ARTE -

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE HEMATOLOGIA

TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:

PROFESSORA DOUTORA ANA BELA SARMENTO RIBEIRO

MESTRE EMÍLIA CORTESÃO

MARÇO 2012

ÍNDICE

I - Lista de abreviaturas	v
II - Resumo	viii
III - Abstract	x
1. Introdução	1
2. Classificação, incidência e epidemiologia	3
3. Etiologia e patogênese do linfoma folicular	6
3.1 Linfomagénese	7
3.2 Alterações moleculares	10
3.3 O papel do microambiente	13
3.4 Alterações epigenéticas	17
3.5 O Papel dos MicroARN (miRs)	20
3.6 A Herança Genética do Hospedeiro	21
4. Diagnóstico do Linfoma Folicular	22
4.1 Apresentação Clínica	22
4.1.1 Linfoma folicular do Adulto	22
4.1.2 Linfoma folicular da Criança/Adolescentes (variante pediátrica)	24
4.2 A histologia do linfoma folicular	25
4.3 Diagnóstico diferencial	29
5. Estadiamento	31
5.1 A Classificação de Ann-Harbor	32
5.2 O papel da PET-FDG	33
6. Fatores de prognóstico	34
6.1 FLIPI e FLIPI-2	34

6.2 ILI – “Italian Lymphoma Intergroup”	36
6.3 IPI – “International Prognostic Index”	36
6.4 Outros marcadores de prognóstico	36
7. O tratamento do linfoma folicular	41
7.1 O Tratamento do LF em estádios iniciais (grau 1 e II)	41
7.2 O Tratamento do LF em estádios avançados (grau II X, III e IV)	43
7.2.1 O Tratamento inicial	46
A) Imunoquimioterapia	46
B) Rituximab em Monoterapia	48
7.2.2 O Tratamento de consolidação / manutenção	49
A) Rituximab	50
B) Radioimunoterapia (RIT)	51
C) Transplante de células estaminais	52
7.2.3 O tratamento das recidivas	53
7.3 Os Novos agentes	55
8. Conclusão	56
9. Bibliografia	58

I - LISTA DE ABREVIATURAS

- ADN – Ácido desoxirribonucleico
- AID – *Activation-induced cytidine deaminase*
- APAF1 - *Apoptotic protease activating factor1*
- ARN – Ácido ribonucleico
- ATP – Adenosina trifosfato
- BCL2 – *Gene B-cell lymphoma-leukemia 2*
- BCL6 – *Gene B-cell lymphoma-leukemia 6*
- BCL-2 – *Protein B-cell lymphoma-leukemia 2*
- BCL-XL – *Gene B-cell leukemia and lymphoma of long arm*
- BCR – *B-cell receptor*
- BCSH - *British Committee for Standards in Haematology*
- CD – *Cluster differentiation*
- CHOP - *Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Vincristina, Prednisolona*
- CTLA-4 - *Cytotoxic T cell associated antigen 4*
- CVP – *Ciclofosfamida, Vincristina, Prednisolona*
- DAPK - *Death-associated protein kinase*
- EUA – *Estados Unidos da América*
- EZH2 - *enhancer of zeste homolog 2*
- FISH - *Multi-color fluorescence in-situ hybridization*
- FLIPI – *Follicular Lymphoma International Prognosis Index*
- FOXP3 – *Forkhead box protein 3*
- FR – *Fator de risco*
- GITR - *Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*
- GSTP1 - *Glutathione S-transferase P 1*

Hb – Hemoglobina

HFR – Hiperplasia folicular reativa

hpf – *high power field*

ICOS – *Inducible T cell co-stimulator*

Ig – Imunoglobulina

Ig_H - Cadeia pesada da imunoglobulina

IL – Interleucina

ILI – *Italian Lymphoma Intergroup*

IPI - *International Prognostic Index*

IR 1 –Resposta imune 1

IR 2 –Resposta imune 2

IRF-8 - *Interferon regulatory factor 8;*

LDGC - Linfoma Difuso de Grandes Células

LDH – Lactato Desidrogenase

LF – Linfoma Folicular

LH- Linfoma de Hodgkin

LNH – Linfoma Não Hodgkin

MALT – *Mucosa-associated lymphoid tissue*

miR – micro Ácido Ribonucleico

MO – Medula óssea

NCCN – *National Comprehensive Cancer Network*

NK – Células *Natural Killer*

OMS – Organização Mundial de Saúde

OS – *Overall survival*

p16 – Gene da proteína supressora tumoral de que codifica a proteína de 16 Kdal

p53 – Proteína supressora tumoral de 53 Kdal

PCR – *Polimerase chain reaction*

PD1 - *Programmed cell death 1*

PET – Tomografia de emissão de positrões

PET-FDG - Tomografia de emissão de positrões com fluordesoxiglucose

PFS – *Progression free survival*

R- CHOP – Rituximab, Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Vincristina, Prednisolona

R-CVP – Rituximab, Ciclofosfamida, Vincristina, Prednisolona

RR – Risco relativo

RT – Radioterapia

SNPs – *Single nucleotide polymorphisms*

t – Translocação

TC – Tomografia computadorizada

Th – Células T helper

TP53 – Gene suppressor tumoral *TP53*

YY1 – Ying-Yang 1

β 2m – β 2-microglobulina

II - RESUMO

Os linfomas são um grupo heterogéneo de doenças em que ocorre acumulação característica de linfócitos malignos nos gânglios linfáticos, podendo também invadir o sangue e outros órgãos não linfóides. São divididos em dois grandes grupos: linfomas de Hodgkin e linfomas não-Hodgkin.

Os Linfomas não-Hodgkin englobam um extenso conjunto de subtipos de neoplasias, 85% das quais derivam de células B malignas, com apresentação clínica e história natural muito variáveis. Constituem a quinta neoplasia mais comum nos países desenvolvidos, devido ao aumento progressivo nos últimos 50 anos.

A classificação dos linfomas mais aceite é da Organização Mundial de Saúde e baseia-se na origem celular, na fisiopatologia e nas características genéticas e imunofenotípicas. Na prática clínica tem utilidade outra classificação, baseada na sua evolução clínica, dividindo-os em linfomas indolentes (evolução lenta, mas incuráveis), agressivos e muito agressivos (evolução rápida, mas com possibilidade de cura).

Os linfomas indolentes representam aproximadamente 35% a 40% dos linfomas malignos. São um grupo de doenças linfoproliferativas heterogéneas, que incluem o linfoma folicular, a leucemia linfocítica crónica de células B/linfoma linfocítico de células pequenas, o linfoma da zona marginal e o linfoma linfoplasmocítico.

O Linfoma Folicular é um linfoma indolente de células B do centro germinativo folicular e o segundo mais comum dos Linfomas não-Hodgkin (22% dos novos casos diagnosticados). Descrito em 1925 como patologia benigna, “doença de Brill-Symmers”, só algumas décadas mais tarde foi considerado uma doença maligna, com evolução clínica indolente e imprevisível, afetando sobretudo indivíduos de meia-idade e idosos, com maior frequência no sexo feminino.

A alteração molecular mais característica deste linfoma é a resistência das células tumorais à apoptose, relacionada com a t(14;18)(q32;q21) e hiperexpressão de BCL-2 (protein *B-cell lymphoma-leukemia 2*), uma proteína com funções anti-apoptóticas.

O Linfoma Folicular tem sido visto como doença incurável, com sobrevivência média inferior a 10 anos, remissões 2 a 3 anos após os tratamentos e cada vez mais precoces.

No entanto, nestes últimos anos, devido ao aumento do número de estudos e ao desenvolvimento de novos instrumentos terapêuticos, têm-se obtido resultados notáveis, com melhoria da sobrevivência e do tempo livre de doença, alterando o panorama da doença.

Este trabalho pretende fazer uma revisão sobre os conhecimentos atuais relativos ao Linfoma Folicular, englobando a sua caracterização biológica/molecular, evolução clínica, métodos de diagnóstico e terapêuticas a usar na abordagem mais correta a estes doentes.

Para tal, será recolhida informação proveniente de artigos recentes publicados em revistas indexadas na área da Hematologia/Oncologia e outras referências bibliográficas atualizadas.

Palavras-chave: LNH, linfoma folicular, linfoma indolente, resistência à apoptose, BCL2.

III - ABSTRACT

Lymphomas are a heterogeneous group of diseases with a characteristic accumulation of malignant lymphocytes in the lymph nodes, which can also invade blood and other non-lymphoid organs. They are divided into two main groups: Hodgkin's and non-Hodgkin lymphomas.

The non-Hodgkin lymphomas include an extensive set of subtypes of cancer, 85% of which are derived from malignant B cells, with a widely variable clinical presentation and natural history. They are the fifth most common cancer in developed countries, due to the progressive increase in the last 50 years.

The most widely accepted classification of lymphomas is the World Health Organization and it is based on the cellular origin, on the pathophysiology and on the genetic and the immunological features. Another classification very useful in clinical practice is based on clinical outcome, dividing them into indolent lymphomas (slow evolution, but incurable), aggressive and highly aggressive (fast evolution, but with the possibility of cure).

The indolent lymphomas represent approximately 35% to 40% of malignant lymphomas. They are a heterogeneous group of lymphoproliferative disorders, which include follicular lymphoma, chronic lymphocytic leukemia B-cell / small lymphocytic lymphoma cells, lymphoma and marginal zone lymphoma lymphoplasmacytic.

The follicular lymphoma is an indolent B-cell lymphoma of germinal center and the second most common non-Hodgkin lymphomas (22% of newly diagnosed cases). Described in 1925 as a benign "Brill-Symmers disease," only a few decades later was considered a malignant disease with an indolent and unpredictable clinical course, affecting mainly people of middle-aged and elderly, more often in females.

The most characteristic alteration in this lymphoma is the resistance of tumor cells to apoptosis related to the t(14, 18) (q32, q21) translocation and the overexpression of BCL-2 protein with an anti-apoptotic function.

The Follicular Lymphoma has been regarded as incurable, with median survival less than 10 years, remission 2 to 3 years after treatment and increasingly earlier. However, in recent years, due to the increase in research and development of new therapeutic instruments, remarkable results have been obtained, with improved survival and progression free from disease, leading to a changing on the outlook of the disease.

This paper aims to review the actual knowledge concerning Follicular Lymphoma, their characterization encompassing biological / molecular features, clinical, diagnostic and therapeutic methods for a correct approach to these patients.

Information will be collected from recent articles published on indexed journals on the field of Hematology / Oncology and other updated references.

Keywords: NHL, follicular lymphoma, Indolent lymphoma, apoptosis resistance, BCL2.

1. INTRODUÇÃO

Os linfomas são um grupo heterogéneo de doenças em que ocorre acumulação característica de linfócitos malignos nos gânglios linfáticos, podendo também invadir o sangue (fase leucémica) e outros órgãos não linfóides. São divididos em dois grandes grupos: Linfomas de Hodgkin (LH) e linfomas não-Hodgkin (LNH).

Os LNH englobam um extenso conjunto de subtipos de neoplasias, 85% das quais derivam de células B malignas (células B em diferentes estádios de desenvolvimento), com apresentação clínica e história natural muito variáveis. Nos países desenvolvidos, constituem a quinta neoplasia mais comum e a mais frequente das neoplasias hematológicas, devido ao aumento progressivo em todos os grupos etários (exceto em crianças) nos últimos 50 anos (Chiu e Weisenburger, 2003).

Thomas Hodgkin, em 1932, foi o primeiro a reconhecer os linfomas como entidades clinicopatológicas, ao constatar que as adenopatias não eram apenas secundárias a processos infecciosos ou neoplásicos, podendo também ocorrer como doença primária.

Após a descrição inicial de Hodgkin existiram quatro fases históricas no estudo dos LNH. A primeira, de 1832 a 1900, baseava-se essencialmente nas características clínicas. A segunda decorreu entre 1900 e 1972, após Sternberg e Reed identificarem células gigantes características dos LH, tornando a histopatologia num importante método de diagnóstico e de classificação de linfomas. Em 1972, a origem imunológica das neoplasias linfóides foi confirmada pela presença de imunoglobulinas monotípicas na superfície das células B, originando a 3ª fase (a imunológica) que se estende até ao presente. A última fase, a da genética molecular, iniciou-se em 1982, ao confirmar-se a origem linfóide dos LNH a nível molecular, com a identificação de rearranjos nos genes que codificam as imunoglobulinas e dos recetores das células T em Linfomas B e T, respetivamente (Lee G.R. *et al.*, 1999).

A classificação histológica dos LNH tem constituído uma das questões mais controversas da oncologia. Nas últimas duas décadas, o desenvolvimento das técnicas de citometria de fluxo e biologia molecular forneceram novos conhecimentos imunológicos, citogenéticos e moleculares, resultando numa melhor definição e classificação dos LNH.

A classificação dos linfomas mais aceite é da Organização Mundial de Saúde (OMS) e baseia-se na origem celular, na fisiopatologia e nas características genéticas e imunofenotípicas. Na prática clínica tem utilidade uma outra classificação, baseada na evolução clínica, dividindo-os em linfomas indolentes (evolução lenta, mas incuráveis), agressivos e muito agressivos (evolução rápida, mas com possibilidade de cura).

Os linfomas indolentes representam aproximadamente 35% a 40% dos linfomas malignos. São um grupo de doenças linfoproliferativas heterogéneas, que incluem o linfoma folicular, a leucemia linfocítica crónica de células B/linfoma linfocítico de células pequenas, o linfoma da zona marginal e o linfoma linfoplasmocítico.

O Linfoma Folicular (LF) é um linfoma indolente de células B do centro germinativo folicular e o segundo mais comum (cerca de 22% dos novos casos diagnosticados) dos Linfomas não-Hodgkin. Descrito pela primeira vez na década de 1920 como uma patologia benigna, “doença de Brill-Symmers”, só algumas décadas mais tarde foi considerado uma doença maligna, com evolução clínica indolente e imprevisível, afetando sobretudo indivíduos de meia-idade e idosos, com maior frequência no sexo feminino (Bendandi, 2008).

A alteração molecular mais característica deste linfoma é a resistência das células tumorais à apoptose, relacionada com a t(14;18)(q32;q21) e hiperexpressão de BCL-2, uma proteína com funções anti-apoptóticas.

2. CLASSIFICAÇÃO, INCIDÊNCIA E EPIDEMIOLOGIA

Em 2008 a OMS fez uma revisão da classificação das neoplasias linfóides, com inclusão de vários novos subtipos. A classificação atual possui 64 subtipos, sendo 42 de células B e 22 de células T, como representado nas Tabelas 1 e 2. Nesta classificação, o LF aparece como um dos subtipos de linfomas de células B maduras, apresentando uma variante pediátrica (Tabela 1).

No entanto, a classificação baseada na evolução clínica, tem grande utilidade na prática clínica. Segundo esta classificação os LNH dividem-se em linfomas indolentes (35% a 40% dos casos), com evolução lenta, mas incuráveis com as terapêuticas convencionais, e agressivos e muito agressivos, com evolução rápida, mas com possibilidade de cura.

O LF representa mais de 70% dos linfomas indolentes e corresponde a cerca de 22% de todos os LNH (Hayashi et al., 2010), sendo o segundo mais comum, a seguir ao Linfoma Difuso de Grandes Células, LDGC, (cerca de 30%). A incidência do LNH varia geograficamente, de acordo com a raça e com o género.

O LF é mais comum nos países desenvolvidos (representa até 30% dos LNH nos EUA, Reino Unido e África do Sul) e nos países subdesenvolvidos e na Ásia a sua incidência é baixa, correspondendo a apenas 10% dos LNH. Estes linfomas são mais frequentes em indivíduos de raça branca, verificando-se uma diminuição progressiva da frequência em hispânicos, negros, habitantes das ilhas do Pacífico/Ásia e nativos americanos do Alasca/Índios (Anderson *et al.*, 1998). As diferenças na frequência do LF sugerem a possibilidade de fatores epidemiológicos, genéticos ou ambos influenciarem essa incidência.

O LF atinge predominantemente indivíduos adultos com uma idade média de 59 anos. Em casos raros pode atingir crianças ou adolescentes, correspondendo à variante pediátrica da nova classificação da OMS. É mais frequente no sexo feminino, com um *ratio* homem:mulher de 1:1,7 (Relander *et al.*, 2010).

Tabela 1 Classificação das neoplasias linfóides segundo a OMS, 2008

Neoplasias de Células B Maduras

- Leucemia Linfocítica Crónica / Linfoma Linfocítico de Células Pequenas
- Linfoma Esplénico da Zona Marginal
- Leucemia de *Hairy cells*
- Leucemia / Linfoma Esplénico, Inclassificável
 - *Linfoma Esplénico Difuso de Células B Pequenas de Polpa Vermelha**
 - *Variante Leucémica de Hairy cells**
- Linfoma Linfoplasmocítico
 - Macroglobulinémia de Waldenström
- Doenças das Cadeias Pesadas
 - Doença da Cadeia Pesada Alfa
 - Doença da Cadeia Pesada Gama
 - Doença da Cadeia Pesada Mu
- Mieloma Múltiplo
- Plasmocitoma Solitário do Osso
- Plasmocitoma Extra-Ósseo
- Linfoma MALT (Linfoma de Células B da Zona - Marginal Extraganglionar do Tecido Linfóide Associado à Mucosa)
- Linfoma de Células B da Zona Marginal Ganglionar
 - *Variante Pediátrica*
- Linfoma Folicular
 - *Variante Pediátrica*
- Linfoma Cutâneo Primário do Centro Folicular
- Linfoma de Células do Manto
- Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGC), sem outras especificações
 - Linfoma de Grandes Células B rico em Células T / Histiócitos
 - *LDGC Associado a Inflamação Crónica*
 - *LDGC Epstein-Barr⁺ do Idoso*
- Granulomatose Linfomatóide
- Linfoma Mediastínico (Tímico) Primário de Grandes Células B
- Linfoma de Grandes Células B Intravascular
- LDGC Cutâneo Primário
- Linfoma de Grandes Células B ALK⁺
- Linfoma Plasmablástico
- Linfoma de Efunção Primário
- *Linfoma de Grandes Células B associado a HHV8, Multicêntrico*
 - *Doença De Castleman*
- Linfoma de Burkitt
 - *Linfoma de Células B, inclassificável, com características intermédias entre LDGC e Linfoma de Burkitt*
- Linfoma de Células B, inclassificável, com características intermédias entre LDGC e Linfoma de Hodgkin clássico

(Adaptado de Jaffe E. S., 2009)

Tabela 2 Classificação das neoplasias linfóides segundo a OMS, 2008 (continuação).

Linfoma de Hodgkin (LH)
<ul style="list-style-type: none">- Linfoma de Hodgkin nodular de predomínio linfocítico- Linfoma de Hodgkin clássico<ul style="list-style-type: none">- LH clássico com esclerose nodular- LH clássico rico em linfócitos- LH clássico de celularidade mista- LH clássico com depleção linfocitária
Neoplasias de Células T e Células NK Maduras
<ul style="list-style-type: none">- Leucemia Pró-linfocítica de Células T- Leucemia Linfocítica Granulosa de Grandes Células T- Distúrbio Crónico Linfoproliferativo de Células NK *- <i>Doença Infantil Linfoproliferativa de Células T, com Infecção Sistémica EBV⁺ (associada a infecção crónica ativa por EBV)</i>- <i>Linfoma Hidroa vaciniiforme-like</i>- Leucemia / Linfoma de Células T do Adulto- Linfoma Extraganglionar de Células T / NK, do Tipo Nasal- Linfoma de Células T Tipo Enteropatia- Linfoma de Células T Hepatoesplénico- Linfoma de Células T Subcutâneo Tipo Paniculite- Mícose Fungóide- Síndrome de Sézary- Distúrbio Linfoproliferativo Cutâneo Primário de Células T CD30⁺<ul style="list-style-type: none">- <i>Papulomatose Linfomatóide</i>- <i>Linfoma Anaplásico de Grandes Células Cutâneo Primário</i>- Linfoma Cutâneo Primário Agressivo de Células T Citotóxicas CD8⁺ Epidermotrópicas *- Linfoma Cutâneo Primário de Células T gama-delta- Linfoma Cutâneo Primário Pequeno/Médio de Células T CD4⁺ *- Linfoma de Células T Periférico, sem outras especificações- Linfoma de Células T Angioimunoblástico- Linfoma Anaplásico de Grandes Células, ALK⁺- Linfoma Anaplásico de Grandes Células, ALK⁻ * <p>* Representam entidades provisórias ou subtipos provisórios de outras neoplasias. Doenças em <i>itálico</i> são as incluídas pela primeira vez na nova classificação da OMS.</p>

(Adaptado de Jaffe E. S., 2009)

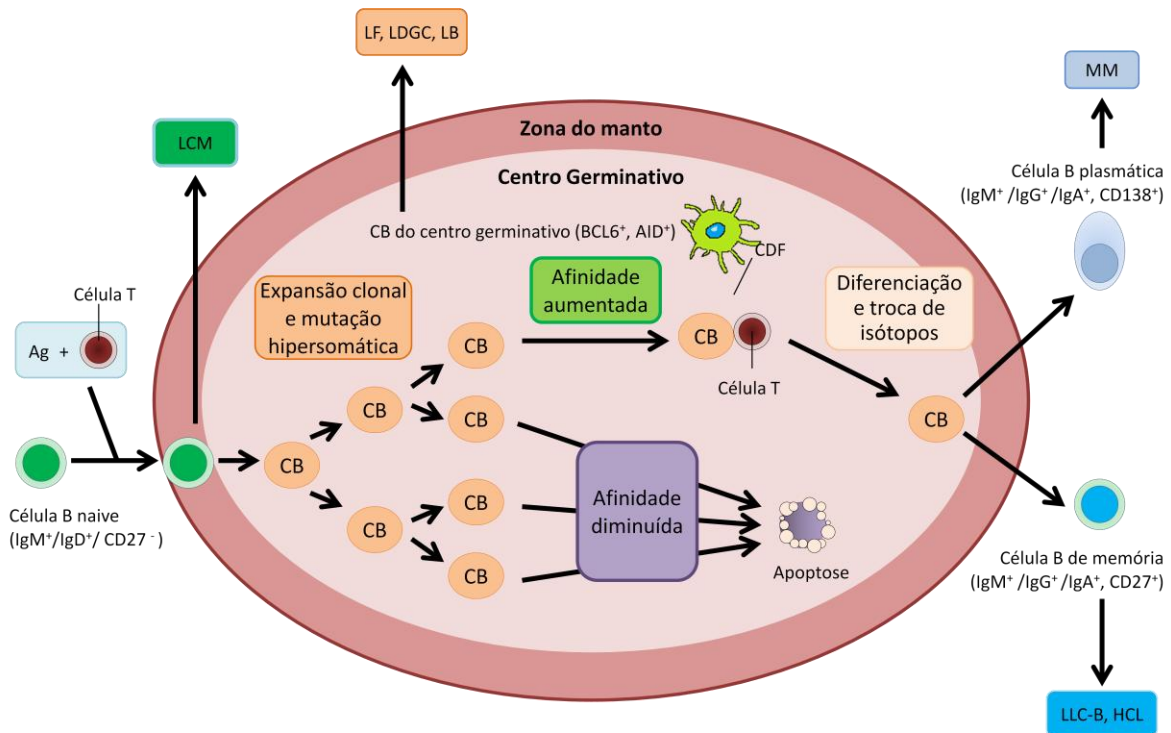
3. ETIOLOGIA E PATOGÊNESE DO LINFOMA FOLICULAR

O Linfoma Folicular (LF) é uma neoplasia de células B do centro germinativo (CG) folicular (Figura 1), que se apresenta com, pelo menos, um padrão folicular parcial (Otto G, 2008; Lopes A, 2009).

O centro germinativo (CG) folicular normal é um compartimento linfóide específico que determina a sobrevivência das células B através de mecanismos de seleção antigénica (Martinez *et al.*, 2008). Neste microambiente dinâmico, as células B são sujeitas a repetidas séries de mutação hipersomática e seleção, de forma a aumentar a sua afinidade pelo antígeno estimulante (Natkunam, 2007). As células normais (BCL2-negativas) sofrem apoptose, a não ser que sejam positivamente selecionadas por interações com antígenos específicos apresentados pelas células dendríticas foliculares (CDF) e haja co-estimulação das células T helper (T_H) foliculares. Estes sinais de sobrevivência promovem a proliferação, diferenciação e expansão clonal dessas células estimuladas, originando células plasmáticas ou células B de memória (Leich *et al.*, 2011). Durante este processo as células selecionadas sofrem um profundo rearranjo genético dos genes dos seus recetores (BCR), o que aumenta a sua afinidade pelos antígenos e promove a sua sobrevivência (Figura 1).

A maturação da afinidade do BCR ocorre pela ativação de dois processos fundamentais mediados pela activação-indução da citidina desaminase (AID) – a hipermutação somática e a troca recombinante de genes da classe da imunoglobulina (Ig) (Martinez *et al.*, 2008).

As células tumorais do LF têm uma hiperexpressão de *BCL2* (ou outros genes anti-apoptóticos), o que lhes confere uma certa independência deste processo de seleção, evitando a apoptose. Estas células acumulam alterações cromossómicas secundárias na presença de instabilidade genómica mediada pela AID.



Legenda:

Ag – antígeno; CB – célula B; CDF – célula dendrítica folicular; HCL – Leucemia de *Hairy Cells*; LB – linfoma de Burkitt; LCM - Linfoma de células do manto; LDGC – linfoma difuso de grandes células; LF – Linfoma folicular; LLC-B – Leucemia linfocítica crônica de células B; MM – mieloma múltiplo.

Figura 1. Diferenciação da célula B no gânglio linfático e formação do centro germinativo. Quando as células B virgens encontram um antígeno movem-se para a zona de células T dos tecidos linfóides (paracórtex dos gânglios linfáticos) onde se transformam em blastos, que migram para o centro de um folículo primário, onde proliferam e se diferenciam em centroblastos, formando o centro germinativo. A partir dos centroblastos originam-se linfomas mais agressivos, com maior capacidade proliferativa, como o LDGC e o linfoma de Burkitt (LB). Os centroblastos com alta afinidade diferenciam-se em centrócitos e acumulam-se num extremo do folículo. Os centrócitos que são portadores de mutações somáticas têm menor afinidade antigénica e sofrem apoptose, enquanto aqueles cujas mutações originam maior afinidade resistem à apoptose re-expressando BCL-2. Os linfomas foliculares originam-se a partir das células B do centro germinativo, centrócitos e centroblastos, com predomínio de centrócitos, células estas resistentes à apoptose. Os centrócitos proliferam e diferenciam-se em plasmócitos produtores de anticorpos IgG (tempo de vida curto), a partir das quais se origina o Mieloma Múltiplo (MM) ou em células B de memória, que podem originar alguns subtipos de Leucemia Linfocítica Crônica B (LLC-B) ou a Leucemia de *Hairy Cells* (HCL). (Adaptado de Tiacci *et al.*, 2006).

3.1 LINFOMAGÊNESE

O desenvolvimento dos linfomas ocorre quando há uma desregulação das vias de sinalização celulares envolvidas na proliferação, diferenciação e apoptose das células linfóides do sistema hematopoiético, em resultado de alterações genéticas e/ou epigenéticas (Lopes, 2009).

A maioria dos LNH tem origem em células B maduras, que englobam três formas celulares diferentes: células B virgens maduras (circulam no sangue), células B do centro germinativo (centroblastos e centrócitos) e células B pós-centro germinativo (células de memória e plasmócitos). Estes linfomas geralmente representam proliferações clonais de células B que mimetizam os diferentes estádios do desenvolvimento normal destas células, distinguindo-se clinicamente e biologicamente entre si pelas características inerentes às células que se encontram na sua origem e pelos eventos de transformação neoplásica (Figuras 1 e 2) (Lopes, 2009).

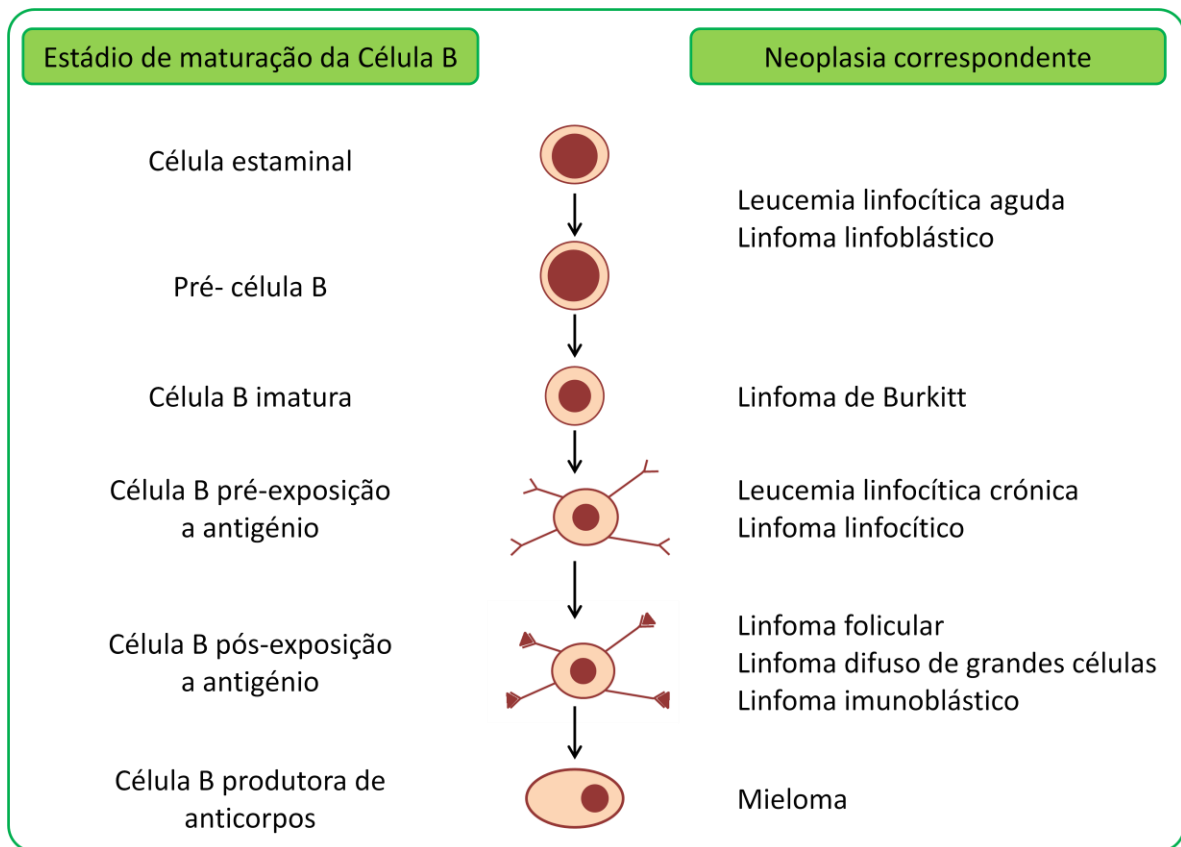


Figura 2. Diferenciação das células B e neoplasias linfóides correspondentes.

(Adaptado de Tiacci *et al.*, 2006)

A patogênese do LF é bastante complexa e, em certos aspetos, ainda não totalmente esclarecida. A alteração molecular mais característica é a t(14;18) associada a hiperexpressão

do gene *BCL2*, que codifica uma proteína com funções anti-apoptóticas, a proteína BCL2. No entanto, esta alteração molecular não é específica nem suficiente para o completo desenvolvimento e progressão tumoral. Diferentes estudos publicados nos últimos anos demonstraram que neste processo estão implicadas várias alterações genéticas secundárias, alterações moleculares, diferentes padrões de metilação do ADN e de expressão de microARN, o microambiente do tumor e até mesmo a herança genética do hospedeiro (Leich *et al.*, 2011). Assim, fruto desta complexa rede de alterações e interações, se compreende a grande variabilidade no comportamento biológico e evolutivo que estes tumores apresentam (Figura 3).

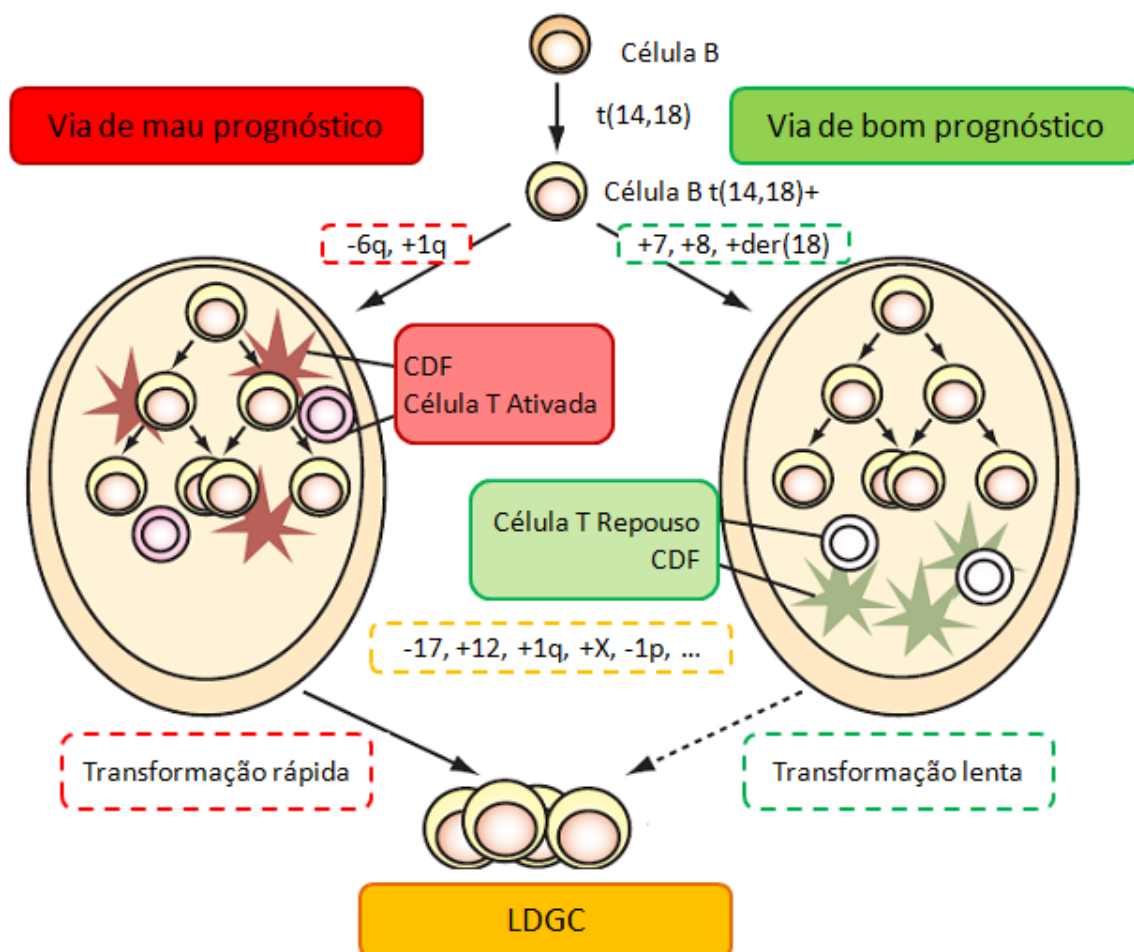


Figura 3. Modelo explicativo da gênese do linfoma folicular com diferentes prognósticos. (Adaptado de Jong D, 2005; Lopes A, 2009).

3.2 ALTERAÇÕES MOLECULARES

A alteração molecular característica da maioria dos LF é a $t(14;18)(q32.3;q21.3)$, que se encontra presente em 90% dos LF no estágio 1 e 2 e parece constituir a alteração genética inicial da linfomagenese, como mencionado. Esta translocação envolve a região promotora do gene da cadeia pesada da imunoglobulina (Ig_H) localizada no cromossoma 14 e o proto-oncogene $BCL2$ do cromossoma 18 (Figura 4), tendo como resultado uma hiperexpressão genética com aumento da produção da proteína anti-apoptótica BCL-2 (Leich et al., 2011). As proteínas da família BCL controlam a permeabilidade da membrana mitocondrial externa e a libertação de citocromo c para o citoplasma, podendo ser pró- (proteínas BAX, BAD, BID, entre outras) ou anti-apoptóticas (proteínas BCL-2, BCL-X_L). A proteína BCL-2 é uma molécula anti-apoptótica e também tem sido descrita como um regulador do ciclo celular que inibe a transição da fase G0/G1 para a fase S, através da sobre-expressão da p27, uma proteína inibidora das cinases dependentes de ciclina (CDKI).

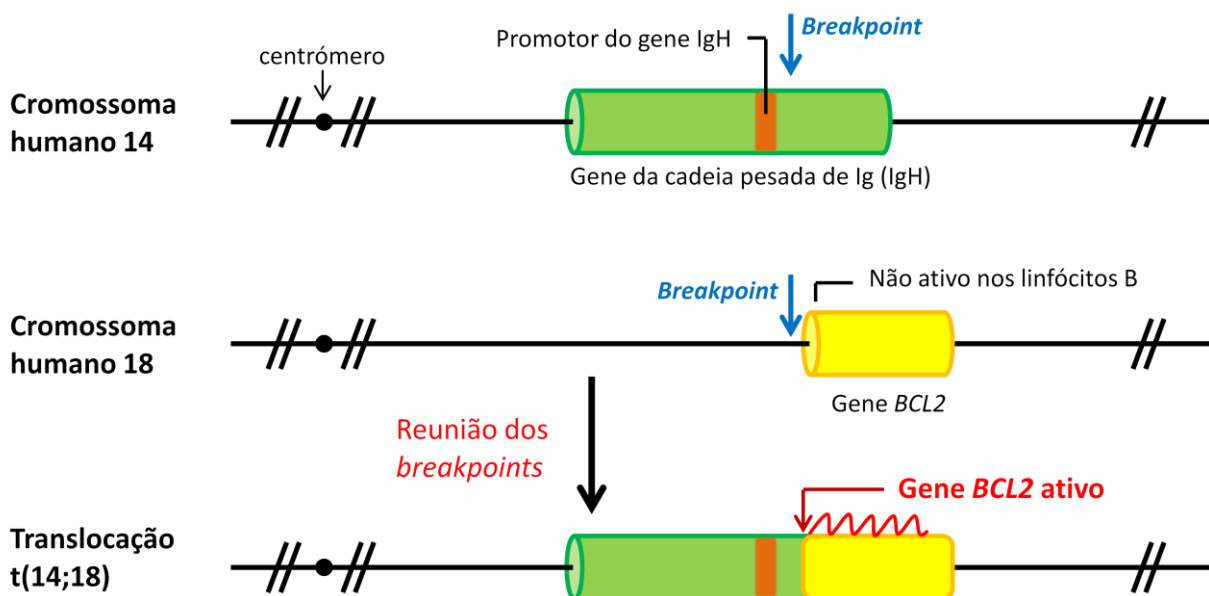


Figura 4. Representação da translocação 14;18. Com a reunião dos *breakpoints*, o gene $BCL2$ fica justaposto ao promotor do gene IgH , o que resulta na sua ativação. (Adaptado de Nadel et al., 2001)

Em casos muito raros, podem ocorrer translocações alternativas envolvendo o *locus* do gene *BCL2* com o do genes das cadeias leves (kapa e lambda) das Igs resultando em translocações t(2;18) ou t(18;22) que também provocam hiperexpressão de BCL2. Pode ainda haver hiperexpressão desta proteína sem ocorrência de translocações, por exemplo, por amplificação do *locus* do gene *BCL2* em 18q21 (Ott e Rosenwald, 2008).

Os LF sem a t(14;18) e, portanto, sem aumento da expressão de BCL2, têm origem noutros estímulos anti-apoptóticos, como o BCL6 e o BCL-X_L, e podem ser erradamente diagnosticados como hiperplasia folicular (Ott e Rosenwald, 2008). Além disso uma proporção de casos expressam BCL-2, mas a proteína não é detetada com alguns dos anticorpos comercializados devido a mutações no gene *BCL2* a nível de epítomos que os anticorpos reconheceriam.

No entanto, esta translocação *BCL2* não é suficiente nem específica para o LF. Por um lado, indivíduos saudáveis podem apresentar células portadoras da t(14;18) sem alguma vez desenvolverem doença. Por outro, alguns estudos demonstraram que ratos transgênicos com a translocação envolvendo o gene *BCL2* desenvolvem hiperplasia folicular e que apenas surgem linfomas difusos tardiamente, em associação com a desregulação de outros oncogenes (Martinez *et al.*, 2008).

Algumas das alterações cromossômicas secundárias típicas no LF incluem: deleções em 6q, alterações do cromossoma 18 e inserções nos cromossomas 7 e 8 (alterações precoces); deleções no braço curto e/ou no braço longo do cromossoma 17, deleções em 1p (a perda da heterozigotia em 1p é a alteração mais frequente a seguir à t(14;18) no LF) e inserções nos cromossomas 12, 1q, X (eventos tardios) (Figura 3) (Leich *et al.*, 2011). Parece assim haver uma sequência temporal no aparecimento destas alterações. Além disso, algumas parecem ser mutuamente exclusivas, enquanto outras frequentemente surgem associadas. Exemplos: uma das vias propostas frequentemente começa com +18q, seguida de aquisição

de trissomias +7 e +8; outra envolve deleções em 6q seguidas de deleções em 1p (Ott e Rosenwald, 2008).

Numa investigação efetuada por Husson e colegas (2002) constataram que nos LF se verifica uma sobre-expressão de genes reguladores do ciclo celular, de genes reguladores da apoptose e também de vários fatores de transcrição (de Jong e Fest, 2011).

Vários estudos compararam características dos LF t(14;18)-negativos, concluindo que estes apresentam rearranjos 3q27/BCL6 (com uma t(3;14)(q27;q32), por exemplo) mais frequentes. É importante referir que a t(14;18) está ausente em 30-40% dos LF de grau 3A, em 70-85% do grau 3B e também frequentemente nos LF com origem extraganglionar. Esta evolução para linfomas de alto grau está associada a três alterações genéticas secundárias distintas que têm um profundo impacto na biologia e clínica do LF: introdução de um rearranjo t(8;14)/MYC nas células tumorais, a inativação *TP53* por mutação e deleção, e a inativação do p16 por deleção bialélica (Ott e Rosenwald, 2008).

Recentemente foi identificada uma deleção cromossômica na região 1p36.33-p36.32, que inclui o gene supressor tumoral *TP73*, mas o papel destas alterações do *TP73* na patogénese do LF ainda permanece incerto (Leich *et al.*, 2011).

Apesar das recentes descobertas neste campo, o envolvimento de vários genes que codificam mais de uma classe de moléculas e a complexidade das vias de sinalização envolvidas, dificultam que a análise do perfil da expressão genética seja um método de eleição para identificar detalhadamente as populações celulares de maior relevo. Por isso, atualmente ainda se recorre, por exemplo, a uma análise imunohistoquímica de tecidos, a qual além de fornecer informação sobre populações celulares específicas e a sua distribuição espacial, pode ainda identificar a presença de algumas das proteínas envolvidas na etiopatogenia dos LF. No entanto, os estudos genéticos e moleculares envolvendo alguns genes específicos começam a ser uma realidade na prática clínica.

3.3 O PAPEL DO MICROAMBIENTE

As células tumorais do LF interagem com várias células imunes, tais como linfócitos T helper (Th) foliculares, linfócitos T reguladores (Treg) supressores, células dendríticas e histiócitos, que no seu conjunto definem o microambiente do tumor (Figura 5) (Martinez *et al.*, 2008).

A patogénese do LF parece ser o resultado de um cruzamento funcional entre os efeitos das alterações genéticas e/ou epigenéticas nas células tumorais e a influência de uma rede de interações imunológicas modificadas entre as células tumorais e as do microambiente. Esta dependência é suportada pelo facto de, *in vitro*, ser difícil observar o crescimento das células B do LF na ausência de células do estroma (de Jong e Fest, 2011). Além disso, sabe-se, por exemplo, que a inflamação crónica e alguns subgrupos de células inflamatórias que infiltram os tumores podem facilitar a iniciação e progressão tumoral (como é o caso da relação *helicobacter pylori* e os tumores MALT).

É também sabido que a natureza do microambiente é um fator preditivo da sobrevivência em doentes com LF (por exemplo, a infiltração de macrófagos está associada a pior prognóstico em alguns tumores, por promover a disseminação tumoral) e que esta pode influenciar não só a resposta à imunoterapia, como o próprio risco de transformação do tumor.

No caso do LF, durante uma quantidade de tempo variável, as células neoplásicas estão dependentes de sinais de crescimento e sobrevivência das células envolventes, traduzindo-se numa doença indolente. Mais tarde, alterações genómicas secundárias permitirão que estas células sobrevivam fora dos CG, com crescimento autónomo, levando a uma doença com comportamento muito agressivo. No LDGC transformado (secundário a um LF) verifica-se redução marcada de linfócitos reativos infiltrantes e perda das redes dendríticas foliculares presentes no LF. Esta informação sugere que os componentes do microambiente são dispensáveis quando o tumor adquire eventos genéticos adicionais promotores de um crescimento autónomo das células (Martinez *et al.*, 2008).

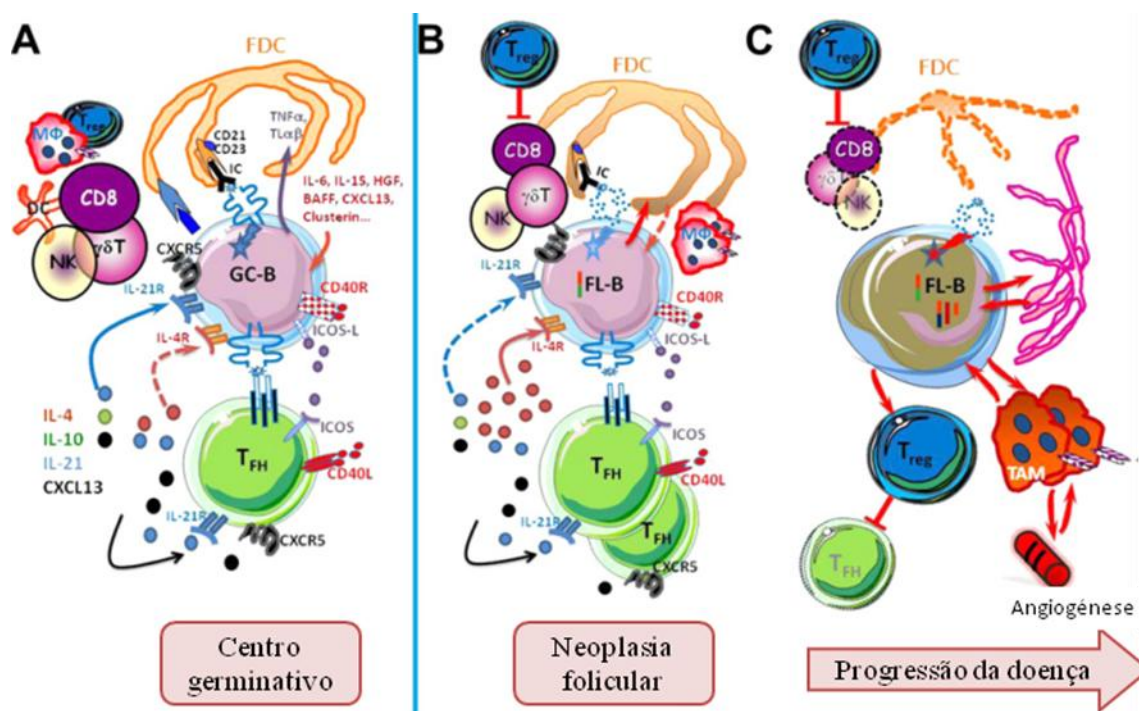


Figura 5. Ilustração esquemática das interações entre as células B e o seu microambiente, num centro germinativo folicular normal e no linfoma folicular. A) As células T helper (T_{FH}) foliculares são fundamentais para impedirem as células B (GC-B) de sofrerem apoptose, promovendo o seu processo de maturação e ativação, com produção de células plasmáticas e de células B de memória. Estes T_{FH} produzem uma variedade de citocinas (CD40L, IL-21 e IL-4) que intervêm na troca de classe de antígenos e também altos níveis da quimiocina CXCL13 que, juntamente com as células dendríticas foliculares (FDC), permite a migração das células B no centro germinativo para o local onde estas sofrem a sua maturação final. Por sua vez, as células B produzem ICOS-L, o que estimula a produção de citocinas pelos T_{FH}. As FDC produzem também uma grande variedade de fatores necessários para o recrutamento e sobrevivência das células B, além de apresentarem à sua superfície antígenos e complexos imunes, levando a uma ativação específica de células B. Outras células hematopoiéticas (macrófagos, células NK) participam também neste processo. **B)** Quando surge um LF, ocorrem alterações precoces e específicas no microambiente induzidas diretamente pelas células B BCL2 positivas ou indiretamente por subtipos celulares como as células Treg, que atenuam a função das células T CD8+. As T_{FH} encontram-se altamente representadas no LF e aumentam a sua produção de IL-4 para promover a sobrevivência das células B. As células B BCL2 positivas do LF apresentam modificações específicas, incluindo o complexo membranar do seu recetor (BCR) e as vias de sinalização. **C)** Com a progressão do LF surgem significativas alterações. As células B apresentam instabilidade genética, com alteração das funções celulares; as células do centro germinativo normal (Th, CDF, células T CD8+) desaparecem e surgem macrófagos associados ao tumor (TAM), que promovem a angiogênese e levam a um microambiente específico da agressividade tumoral (Adaptado de Jong e Fest, 2011).

Células-T Reguladoras (Tregs)

As funções imunológicas das células Treg englobam a supressão da produção de citocinas e da proliferação de células T efectoras (de Jong e Fest, 2011).

Em tumores sólidos desempenham um papel importante ao permitirem às células tumorais a evasão às respostas imunes. Nas neoplasias linfóides a sua ação ainda não está bem esclarecida. Pensa-se que as Tregs intrafoliculares suprimam as células Th do CG e a sobrevivência e as respostas das células B induzidas por células T do CG (como a produção de Igs) e a expressão da citidina desaminase. Parecem ainda ter um efeito direto nas células B, induzindo a sua morte por uma via citotóxica.

Fenotipicamente, as células Tregs caracterizam-se pela expressão de CD4, CD25, GITR (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*), CTLA-4 (*cytotoxic T cell associated antigen 4*) e FOXP3 (*forkhead box protein 3*). Este último é um fator de transcrição altamente específico para diferenciar as Tregs, pelo que a utilização de anticorpos específicos para o FOXP3 permite avaliar e estudar estas células.

No LF existe um recrutamento de células Tregs, em número mais elevado do que nos tecidos linfóides reativos, e estas tendem a concentrar-se dentro e à periferia das áreas foliculares de CG neoplásicos. No entanto, tanto o número como a distribuição topográfica das Tregs são muito variáveis.

Um aumento do número de Tregs parece associar-se a sobrevivência prolongada (ao contrário do que se verifica nos tumores sólidos), já que os doentes com grandes quantidades de células perifoliculares FOXP3-positivas apresentam aumento da sobrevivência. Por outro lado, em tumores que se transformaram em LDGC, observa-se diminuição marcada do número de Tregs. Importa salientar, no entanto, que o número inicial de Tregs não constitui um fator preditivo de transformação tumoral (Martinez *et al.*, 2008).

Células T helper foliculares

A ação das células T helper foliculares diminui a proliferação de células T e a produção de citocinas pelas mesmas. Esta população celular expressa PD1 (*programmed cell death 1*), o que permite a sua fácil detecção por técnicas de imunohistoquímica. Um número elevado de células T PD1-positivas está relacionado com uma maior sobrevivência dos doentes, sendo este um fator prognóstico independente do FLIPI.

Vários estudos publicados revelam assim que um “microambiente inativo” parece estar associado a melhor resposta à imunoterapia e a menor progressão para LDGC (Martinez *et al.*, 2008).

Macrófagos e células dendríticas

O sistema mononuclear fagocitário no tecido linfóide humano engloba os macrófagos (CD68) e as células dendríticas foliculares (CD21, CD23 e CD35), ambos envolvidos na apresentação antigénica e importantes para o desenvolvimento de CG normais.

As células dendríticas são células apresentadoras de antígenos presentes nos tecidos de barreira, como a pele e os gânglios linfáticos. Desempenham um papel fundamental no início das respostas imunes específicas do tumor. Alguns estudos utilizando *microarrays* demonstram que uma alta expressão de genes destas populações se associa a menor sobrevivência. Isto acontece porque as células dendríticas previnem a apoptose no LF. Por sua vez, os macrófagos promovem o crescimento do LF por estimulação de citocinas ou produção de quimocinas específicas, além de poderem promover a disseminação tumoral (Martinez *et al.*, 2008).

Citocinas

As citocinas são moléculas produzidas pelas células do sistema imune cuja atividade

biológica está relacionada com a regulação da proliferação, sobrevivência e diferenciação de células imunes e do estroma.

A interleucina IL-21 foi identificada recentemente como um dos fatores mais importantes na formação do CG normal e constatou-se também que no LF as células neoplásicas exibem altos níveis do recetor para IL-21 (Martinez *et al.*, 2008).

A IL-21 pode induzir dois efeitos antagónicos nas células B: proliferação celular ou apoptose. Além disso, estimula as células *natural-killer* (NK) e as respostas citotóxicas e aumenta a sinergia entre o rituximab e a citotoxicidade mediada por células. A expressão de IL-21 diminui os níveis da proteína anti-apoptótica BCL-2, aumentando os níveis da pró-apoptótica BAX (Martinez *et al.*, 2008).

Os **Interferões** são citocinas que apresentam efeitos pleotrópicos nas células imunes. Recentemente descobriu-se o IRF8 (*interferon regulatory factor 8*), um novo marcador altamente expresso em linfomas derivados do CG, como é o caso do LF. Este marcador está também expresso, mas em menor extensão, em linfomas pré-centro germinativo (como o linfoma de células do manto) e totalmente ausente em linfomas pós-centro germinativo (Martinez *et al.*, 2008). Assim, a maioria dos LF expressa IRF-8, com IRF-4 negativo, embora alguns LF agressivos apresentem um padrão inverso, com menor expressão de IRF-8 e maior de IRF-4.

3.4 ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS

A avaliação sistemática e global de modificações epigenéticas tornou-se recentemente uma área de pesquisa em vários tumores malignos, uma vez que estas alterações (como a metilação de ADN em sequências ricas de CpG) representam modificações reversíveis de ADN, que se associam ao silenciamento de genes patologicamente relevantes em células neoplásicas.

O termo epigenética refere-se a um número de modificações bioquímicas da cromatina que, não alterando a sequência primária do ADN, têm um importante papel na regulação e controlo da expressão génica. As modificações epigenéticas podem ocorrer a nível do ADN, (ex. metilação e desmetilação nos dinucleótidos CpG), e/ou afectar a estrutura das proteínas da cromatina (como a acetilação e desacetilação das histonas) (Yoo C. B., 2006; Esteller, 2008). Assim, numa célula normal ocorre normalmente hipermetilação global do genoma e hipometilação localizada, sendo que a metilação e desacetilação das histonas está associada à inactivação da transcrição do gene correspondente (Figura 6). Este perfil de metilação altera-se em vários tipos de neoplasias, como representado na figura 6, levando ao silenciamento de genes supressores tumorais (Herman J.G., 2003; Yoo C.B. e. Jones P.A., 2006).

O estudo do perfil de metilação no LF é considerado uma tentativa útil para identificar biomarcadores que podem contribuir para a sua patogénese e constituir potenciais alvos para estratégias terapêuticas mais especializadas usando agentes hipometilantes, tendo como potenciais alvos alguns genes supressores tumorais hipermetilados ou oncogenes não-metilados.

Alguns estudos demonstraram que o LF apresenta um padrão de hipermetilação predominante, com 199 *loci* CpG hipermetilados e 6 hipometilados em comparação com o grupo de controlo (O'Riain *et al.*, 2009). Além disso, mais de 50% dos genes hipermetilados em qualquer subgrupo de neoplasias de células B estarão hipermetilados no LF (Martin-Subero *et al.*, 2009).

Entre os genes hipermetilados, encontram-se os genes supressores tumorais e reguladores de ciclo celular *p16* e *p15*, o gene supressor tumoral *p57* e o *DAPK* (codifica uma serina/treonina cinase dependente de cálcio-calmodulina que participa na via apoptótica extrínseca).

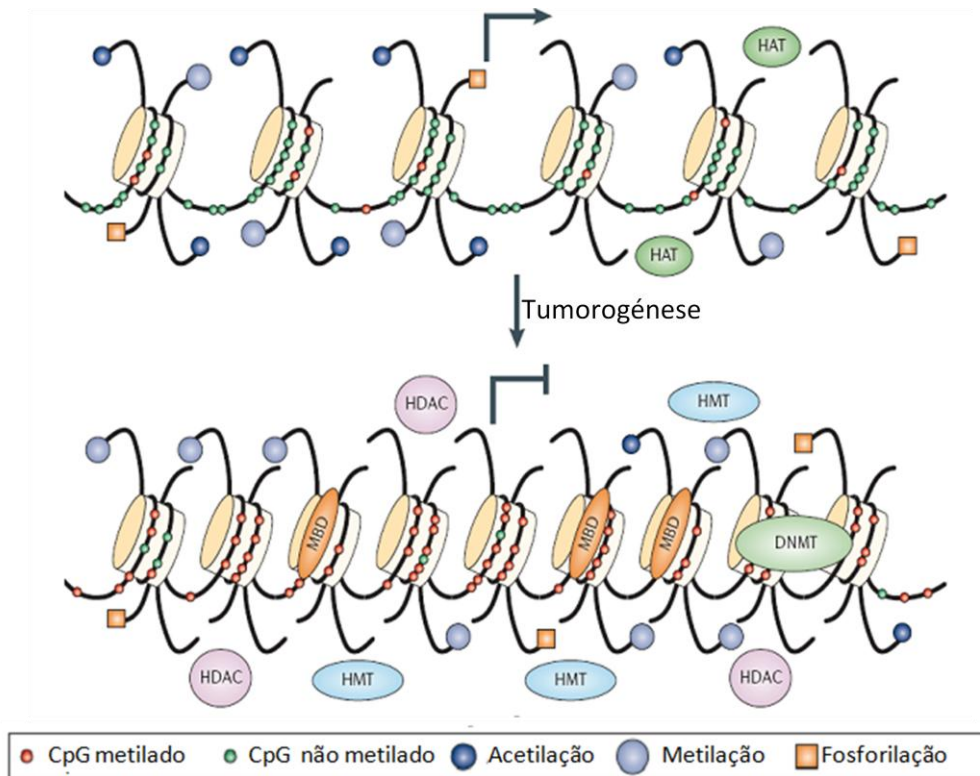


Figura 6. Perfil de metilação dos dinucleótidos CpG e de acetilação das histonas no genoma humano. A figura representa as diferenças entre o padrão de metilação e acetilação de uma célula normal e cancerígena. Os círculos a verde representam as ilhas CpG não metiladas e a vermelho as ilhas CpG metiladas. (Adaptado de Yoo C.B. e. Jones P.A., 2006).

Vários estudos identificaram ainda hipermetilação de alvos repressores da família polycomb. O grupo de proteínas polycomb e a metil transferase EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*) estão hiperexpressas nos centroblastos em proliferação no CG, não se observando expressão destas proteínas nos centrócitos não-proliferantes e/ou nas células B naïve). Uma hipótese explicativa para este achado é o facto de os linfomas derivados do CG (como o LF) demonstrarem expressão aumentada de EZH2 e, conseqüentemente, serem afetados grandemente por hipermetilação aberrante do ADN (Leich *et al.*, 2011).

No entanto, este tipo de técnicas apresenta algumas limitações, nomeadamente a impossibilidade de distinguir LF transformado de não transformado de acordo com o seu perfil de metilação e também o facto de não se ter encontrado uma associação entre o perfil de

metilação e os parâmetros clínicos, em especial o tempo de sobrevivência (Leich *et al.*, 2011).

Ainda assim, é expectável que no futuro a melhor caracterização do padrão global de metilação no LF permita identificar alterações genéticas e vias de sinalização que possam ter relevância na patogénese deste tipo de linfoma.

3.5 O Papel dos MicroARN (miRs)

Os miRs são pequenas moléculas de ácido ribonucleico (ARN) não codificante que desempenham um papel em vários processos biológicos. São processados a partir de ARNs de dupla cadeia por complexos proteicos, formando miRs maduros (constituídos por 19 a 24 nucleótidos) (Leich *et al.*, 2011).

A curiosidade em torno destes pequenos ARNs tem aumentado porque recentemente a expressão anómala de miRs tem sido associada a vários tipos de doenças infecciosas, genéticas e neoplásicas.

Em 2008, Roehle e colegas, propuseram uma árvore classificativa baseada em 4 miRs (miR330, miR17-5p, miR106a e miR210) que permite diferenciar o LF do LDGC e de outras amostras não neoplásicas, com uma precisão de 98% (Roehle *et al.*, 2008). Isto é possível porque o LF parece ter um perfil característico de expressão de miR que difere dos outros LNH de células B e de lesões reativas, como representado na Figura 7.

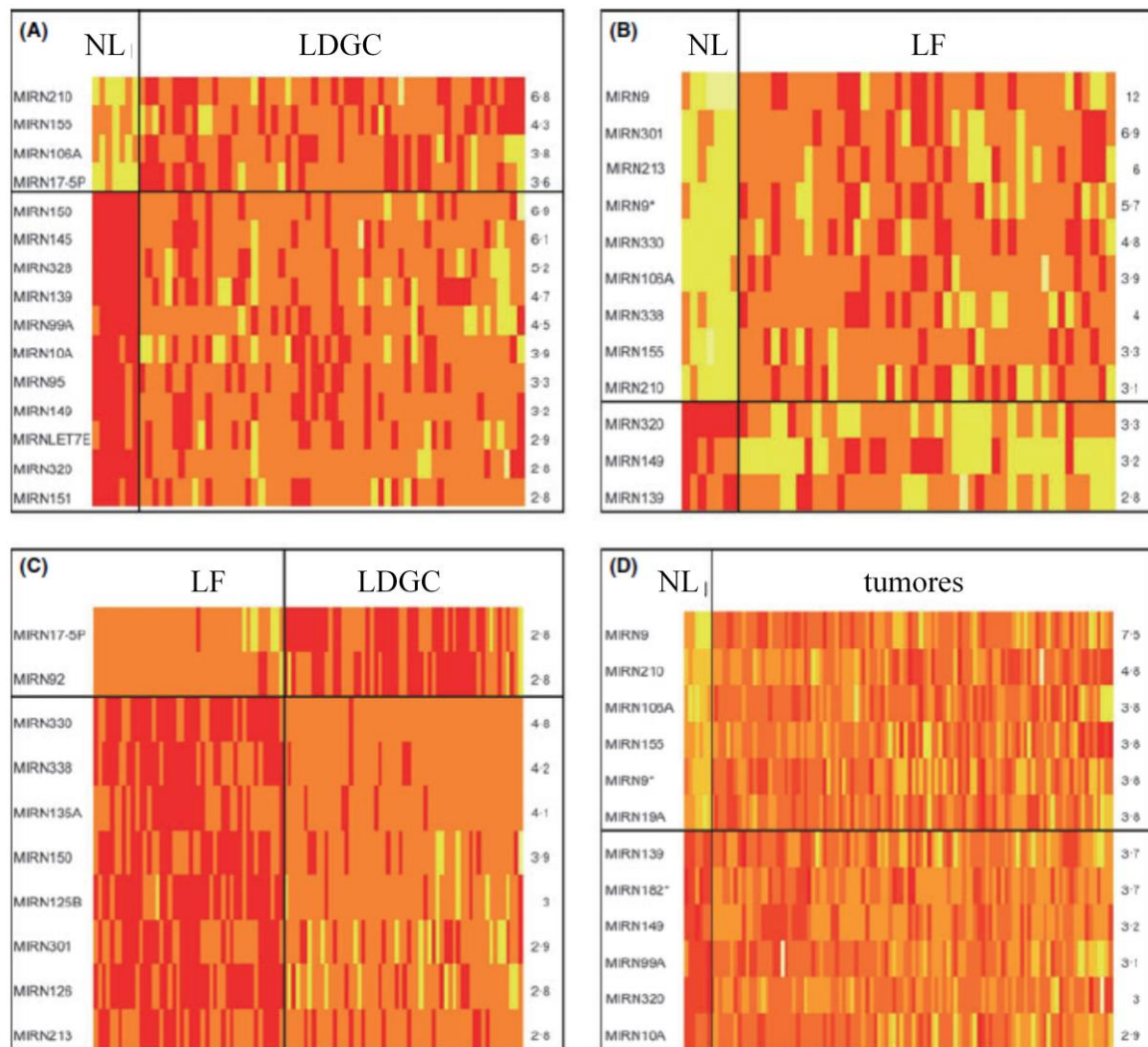


Figura 7. Expressão de miRNAs no LF e no LDGC. Os quatro mapas exibem as patologias nas colunas e os tipos miRNA nas linhas. Uma alta expressão de miRNA é indicada a vermelho; uma baixa expressão a amarelo. Nesta representação os perfis de miRNA estão numa escala de variação unitária. No entanto, os números à direita dos painéis demonstram a verdadeira diferença na expressão (hiperexpressão na parte superior, hipoexpressão na parte inferior). (A) Comparação nódulos linfáticos (NL) *versus* LDGC e (B) NL *versus* LF. (C) Comparação entre LF e LDGC. (D) Comparação entre NL e tumores (Adaptado de Roehle *et al.*, 2008).

3.6 A HERANÇA GENÉTICA DO HOSPEDEIRO

As respostas imunes variam entre indivíduos. Muita desta variabilidade deve-se a diferentes e cumulativas exposições a antígenos, mas também reside em variações genéticas herdadas que podem influenciar os níveis de expressão e os efeitos funcionais dos genes imunorreguladores.

Alguns estudos recentes demonstram que variantes de polimorfismos de nucleótidos em vários genes, como os que codificam a IL8, IL2, IL12B e IL1RN, individualmente e sobretudo em combinação, parecem estar associados à sobrevivência dos doentes com LF (Cerhan, 2011). Um polimorfismo específico no recetor Toll-like 2 (TLR2), variante TLR2-16933T>A, está associado a um risco 2,8 vezes aumentado de desenvolver LF (Martinez *et al.*, 2008).

4. DIAGNÓSTICO DO LINFOMA FOLICULAR

4.1 APRESENTAÇÃO CLÍNICA

O LF caracteriza-se por ser uma neoplasia indolente, com progressão lenta ao longo de vários anos, e uma evolução clínica muito variável. Tipicamente envolve estruturas do sistema linfóide, sobretudo os gânglios linfáticos, o baço, a medula óssea, podendo também invadir o sangue periférico e o anel de Waldeyer. Em casos menos frequentes, a doença pode ser extraganglionar, envolvendo a pele, anexos oculares, trato gastrointestinal ou trato genital feminino, apresentando diferentes características e evolução clínica (Bende *et al.*, 2007).

A idade média de diagnóstico é aos 59 anos, com um *ratio* homens/mulheres de 1: 1,7. Na população pediátrica, esta doença é bastante mais rara e apresenta um predomínio no sexo masculino. A maioria dos LF na altura do diagnóstico encontra-se nos estádios III/IV.

A sobrevivência média na era pré-rituximab era de 8 a 10 anos, sendo atualmente bastante superior. No entanto, cerca de 25 a 30% dos casos de LF sofrem transformação para um linfoma agressivo, normalmente o LDGC (Leich *et al.*, 2011).

4.1.1 Linfoma folicular do Adulto

Os doentes com LF normalmente apresentam adenopatias periféricas indolores nas regiões cervical, axilar, inguinal e femoral (Figura 8), com flutuações de tamanho dos

gânglios linfáticos a preceder vários meses a anos o diagnóstico de LF. É frequente encontrar-se envolvimento de gânglios hilares e mediastínicos, mas massas mediastínicas de grandes dimensões são raras. Alguns doentes apresentam grandes massas abdominais assintomáticas, com ou sem evidência de obstrução do trato urinário ou gastrointestinal (Freedman, 2011).

O envolvimento do sistema nervoso central é incomum, mas pode haver compressão de nervos periféricos ou desenvolvimento de massas tumorais epidurais com compressão medular.

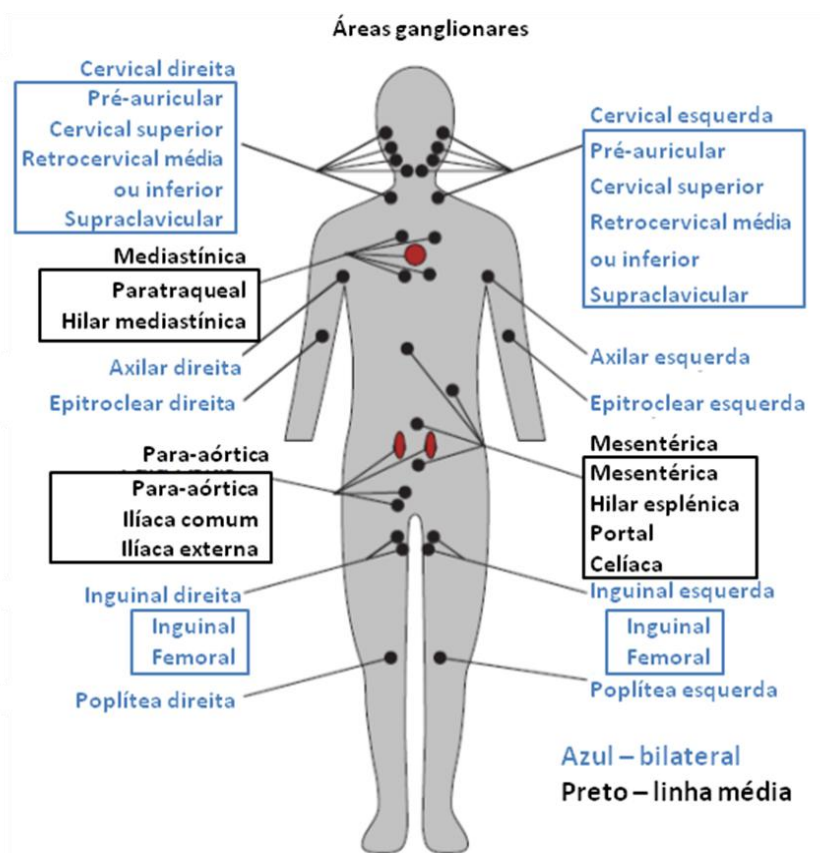


Figura 8. Representação esquemática das áreas ganglionares potencialmente envolvidas no LF (mapa usado na contagem do número de áreas envolvidas no FLIPI-1) (adaptado de Zelenetz *et al.*, 2011).

Alguns doentes podem ter doença localizada ao intestino, mais comumente na 2ª porção do duodeno (incidentaloma ao realizar endoscopia por outros motivos). A morfologia, o imunofenótipo e as características genéticas destes LF intestinais primitivos são similares aos

dos LF ganglionares, o que permite distingui-los de outro tipo de linfoma gastrointestinal, nomeadamente os linfomas MALT e os linfomas de células do manto. Muitos destes doentes no estágio IE ou IIE podem ter um prognóstico excelente, mesmo na ausência de tratamento.

Até recentemente, era considerada a existência de uma variante cutânea de LF, que atualmente se reconheceu tratar de uma entidade distinta, sendo agora designada de “linfoma cutâneo primário de células do centro folicular”. Estes casos partilham uma morfologia celular e um padrão de crescimento semelhantes, mas a sua biologia é bastante diferente, não existindo hiperexpressão de BCL2. Esta entidade possui bom prognóstico, com recorrências infrequentes e normalmente limitadas à pele (Salles, 2007).

Atualmente foi adotado o conceito de Linfoma Folicular *in situ*, que corresponde à presença focal de centros germinativos com centrócitos que expressam fortemente a proteína BCL2, num gânglio linfático sem outras características de LF (Salles, 2007). É possível que estas células representem um clone hiperplásico que tenha adquirido a t(14;18) sem apresentar outras lesões genéticas ou epigenéticas necessárias para o desenvolvimento de LF.

Na maioria dos doentes, o estadiamento no momento do diagnóstico normalmente demonstra doença disseminada, com envolvimento do baço (40% dos casos), fígado (50%) e medula óssea (60-70%). Apesar da doença disseminada, muitos doentes não apresentam outras queixas além das adenopatias. Apenas 20% apresentam sintomas B (febre inexplicada superior a 38°C, sudorese noturna, perda ponderal não intencional superior a 10% nos 6 meses prévios ao diagnóstico). Menos de 20% dos doentes têm aumento dos níveis séricos da lactato desidrogenase, LDH, (Freedman, 2011).

4.1.2 Linfoma folicular da Criança/Adolescentes (variante pediátrica)

O LF na criança e adolescentes é raro. Uma proporção substancial destes casos parece ser diferente do LF típico do adulto, resultando daí a denominação de variante pediátrica do LF na classificação mais recente da OMS (Freedman, 2011).

A variante pediátrica do LF possui como principais características ser uma doença de baixo grau (estádio I ou II), com envolvimento frequente da cabeça e pescoço, histologia com predominância do grau III, menor frequência da expressão BCL2 (apenas cerca de 30%) ou de rearranjos *BCL2* (os 10% que têm rearranjos parecem ter uma evolução mais semelhante à do LF no adulto) e, por fim, uma alta taxa de aparente cura (Freedman, 2011).

4.2 A HISTOLOGIA DO LINFOMA FOLICULAR

Como o LF é uma neoplasia indolente e com uma clínica inespecífica e bastante variável, o diagnóstico obviamente exige a realização de exames complementares.

Segundo as *guidelines* da *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) (Zelenetz *et al.*, 2011), a primeira coisa a fazer é uma biópsia excisional ou incisional, para estudo histológico por um anatomopatologista experiente. A aparência histológica é tão característica a ponto de ser uma das poucas formas de LNH que os anatomopatologistas conseguem diagnosticar baseando-se apenas na morfologia.

O Linfoma Folicular tem esta designação devido à sua morfologia característica, uma vez que os infiltrados tumorais substituem a arquitetura fisiológica dos gânglios linfáticos por folículos neoplásicos com CG atípicos e frequentes zonas desprovidas de manto. Estes folículos neoplásicos são compostos por centrócitos e centroblastos aleatoriamente distribuídos, apresentando frequentemente um aspeto monomórfico devido à falta do característico aspeto de “céu estrelado” e da inexistência de padrões de CG reativos (que são divididos em zona escura, de alta proliferação, e zona clara, de baixa proliferação). Mitoses e células apoptóticas são comuns nos folículos reativos, mas raras no LF.

Como referido anteriormente, o LF deriva das células B do centro germinativo, os centroblastos e os centrócitos. Os centrócitos são células clivadas do CG, de tamanho pequeno a médio, com núcleo alongado ou clivado, nucléolo impercetível e citoplasma pálido e escasso (Figura 9 e 10). Os centroblastos são células não clivadas, grandes, com núcleo

redondo ou oval, cromatina vesicular, um a três nucléolos periféricos e citoplasma basófilo com um bordo estreito (Lopes, 2009).

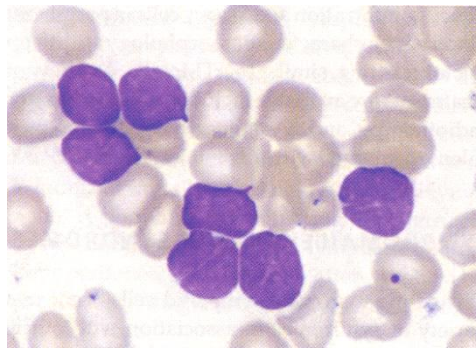


Figura 9. Células de Linfoma Folicular no sangue periférico.

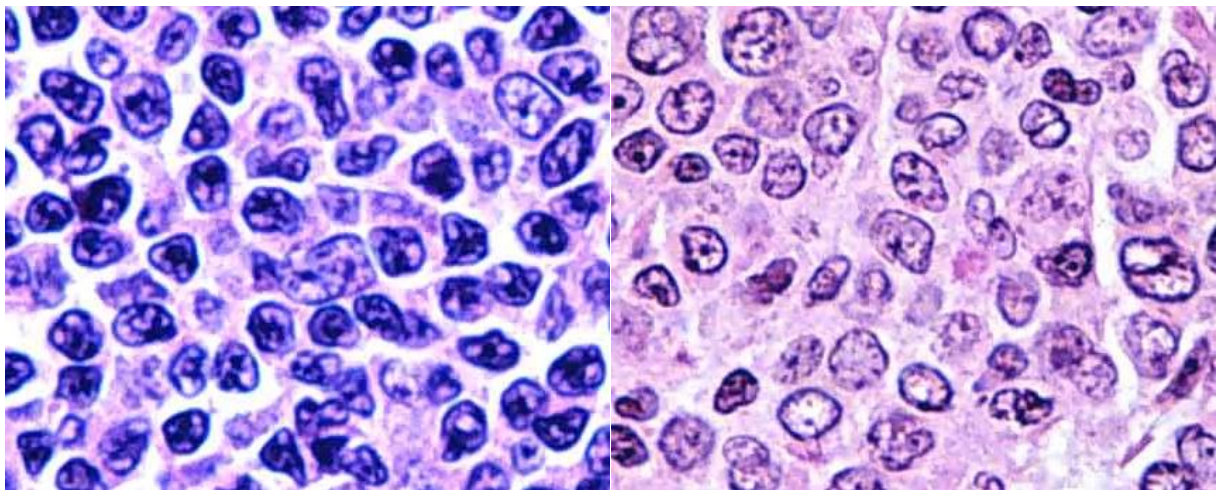


Figura 10. Células de Linfoma Folicular no centro germinativo. À esquerda: imagem de grande ampliação, onde se observa predominância de centrócitos (núcleo grande, citoplasma escasso), num LF de grau 1. À direita: imagem de grande ampliação onde se observa predomínio de centroblastos (células grandes, com vários nucléolos e citoplasma basófilo), num LF de grau 3.

A maioria dos LF apresenta um padrão de crescimento predominantemente folicular (mais de 75% do infiltrado cresce sob a forma de estruturas foliculares atípicas); alguns têm um padrão folicular e difuso, e uma minoria cresce de uma forma predominantemente difusa (infiltrado com padrão folicular inferior a 25%) (Figura 11). As áreas difusas podem ser identificadas pela ausência dos marcadores CD21 e CD23 de células dendríticas foliculares (ausentes nas áreas difusas e presentes nos folículos neoplásicos remanescentes).

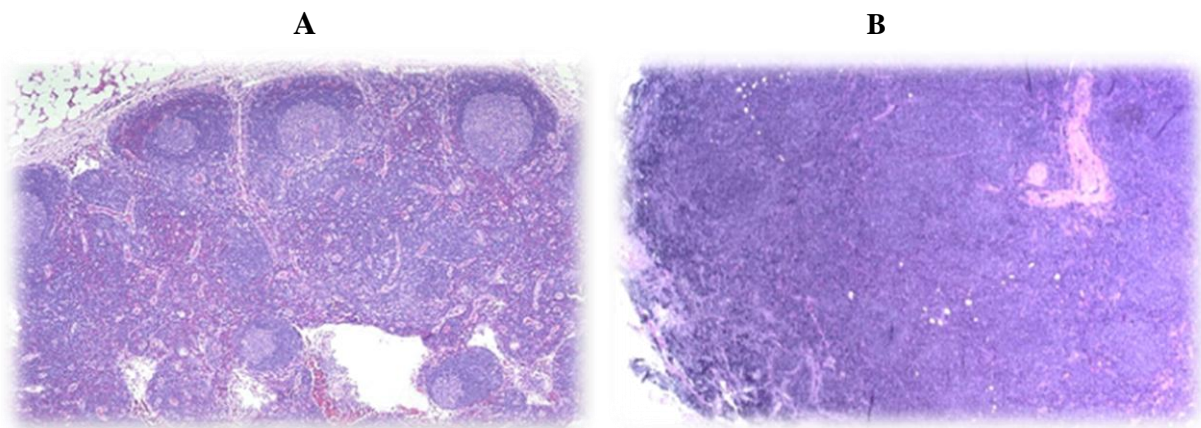


Figura 11. Aspectos histológicos do Linfoma Folicular. A) Padrão folicular; B) padrão difuso.

Pela análise da morfologia dos CG é possível dividir os LF em quatro graus (1, 2, 3A e 3B), de acordo com o número de centroblastos e com a presença ou ausência de centrócitos, e classificá-los de acordo com o seu padrão histológico (Tabelas 3 e 4). Dada a baixa reprodutibilidade desta classificação, esta não é muito relevante como fator prognóstico (Relander *et al.*, 2010).

Tabela 3. Classificação histológica do Linfoma folicular e relação com a t(14;18).

Grau	n° centroblastos por campo de alta resolução	t(14;18)
1	0-5	presente em 90%
2	6-15	presente em 90%
3A	> 15 centroblastos; centrócitos presentes	presente em 60-70%
3B	> 15 centroblastos; centrócitos ausentes	presente em 15-30%

(adaptado de Hitz *et al.*, 2011).

Tabela 4. Padrão histológico do Linfoma folicular.

Padrão	Proporção folicular
Folicular	> 75 %
Folicular e difuso	25-75 %
Focalmente folicular	< 25 %
Difuso	0 % *

* Em biópsias pequenas a ausência de folículos pode refletir um erro de amostragem.

(adaptado de Hitz *et al.*, 2011).

Para efeitos clínicos, considera-se a divisão entre LF de baixo grau (graus 1 e 2) e de alto grau (3A e 3B), tendo este último uma abordagem semelhante à recomendada para o LDGC.

Além disso, se num LF se encontram áreas com padrão difuso e mais de 15 centroblastos por campo de alta resolução (grau 3), estas são consideradas LDGC, fazendo-se o diagnóstico de ambos os tipos de Linfoma. A distinção entre grau 3a e 3b não tem relevância clínica (Zelenetz *et al.*, 2011).

Nas situações raras em que o LF apresenta um padrão de crescimento difuso, para o diagnóstico é necessária a combinação de achados morfológicos e imunofenotípicos.

Em certos casos, quando os gânglios são de difícil acesso, uma combinação de aspiração por agulha fina e biópsia *core*, seguidas de imunohistoquímica, citometria de fluxo, PCR e FISH podem ser suficientes para o diagnóstico. No entanto, é importante referir que o grau histológico não pode ser obtido com recurso a aspiração por agulha fina (Zelenetz *et al.*, 2011).

Para a avaliação imunofenotípica, recomenda-se o estudo imunohistoquímico recorrendo a marcação para CD20, CD3, CD5, CD10, BCL2, BCL6, ciclina D1, CD21 e CD23, ou a citometria de fluxo para analisar a monoclonalidade kapa/lambda, e os marcadores de superfície celular CD19, CD20, CD5, CD23 e CD10. Em algumas circunstâncias deve fazer-se uma análise genética molecular para detetar rearranjos dos genes do recetor de antígeno de célula B (BCR) ou rearranjos BCL2, citogenética ou FISH para detetar t(14;18), t(8;14) ou variantes e imunohistoquímica para avaliar o Ki67.

O LF possui um imunofenótipo típico, que o permite diferenciar de outras neoplasias de células B maduras, sendo habitualmente CD10+, BCL2+, CD23+/-, CD43-, CD5-, CD20+, ciclina D1-, BCL6+ (Tabela 5). Casos raros de LF podem ser CD10- ou BCL2- (Zelenetz *et al.*, 2011).

Tabela 5. Diagnóstico diferencial das doenças linfoproliferativas baseado no imunofenótipo.

Antígeno	LLC-B	LCM	LEZM	LF	LHC	LPL
sIg	Fraca	++	++	++	+++	+++
CD5	++	++	-/+	-	-	-/+
CD20	Fraca	++	++	++	+++	+++
CD23	++	-	+/-	-	-	-/+
FMC7	-/+	+	++	++	++	++
BCL-2	++	-/+	-/+	+++	-	-/+
CD10	-	-	-/+	+/>++	-	-/+
CD25	-/+	-	+/-	-	+++	+/-
CD103	-	-	+/-	-	+++	-
CD11c	-/+	-	+/-	-	++	-/+

Legenda: sIg – imunoglobulina de superfície; LCM – Linfoma de Células do Manto; LEZM – Linfoma Esplênico da Zona Marginal; LF – Linfoma Folicular; LHC – Leucemia de *Hairy Cells*; LPL – Leucemia pró-linfocítica. (adaptado de Herishanu Y. *et al*, 2005)

4.3 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Com os procedimentos acima descritos, será possível estabelecer um diagnóstico de certeza de um LF, excluindo-se assim outras possíveis entidades. Os principais diagnósticos diferenciais que previamente se devem equacionar incluem a Hiperplasia folicular reativa (HFR), o Linfoma cutâneo primário, o Linfoma de células do manto, o Linfoma de grandes células B rico em células T, o Linfoma da zona marginal e a transformação para LDGC.

1) Hiperplasia folicular reativa (HFR): A histologia demonstra folículos discretos, de variadas formas e tamanhos, separados entre si por regiões interfoliculares ricas em células T, no interior do córtex do gânglio linfático. Pelo contrário, os folículos neoplásicos do LF tendem a apresentar variações pequenas na forma e tamanho das células e têm pouco tecido interfolicular, espalhando-se por todo o gânglio. Em ambos se podem encontrar células T e

células dendríticas foliculares, mas apenas na HFR se encontram macrófagos proeminentes. A fração Ki-67⁺ é maior nos folículos reativos do que no LF. Além destas diferenças, há ainda o facto de o BCL2 ser fortemente positivo em quase todos os LF grau I/II (Figura 12), mas universalmente negativo na HFR. Importa realçar que uma grande percentagem de LF cutâneo, pediátrico e sistémico grau III/IV são também BCL2 negativos.

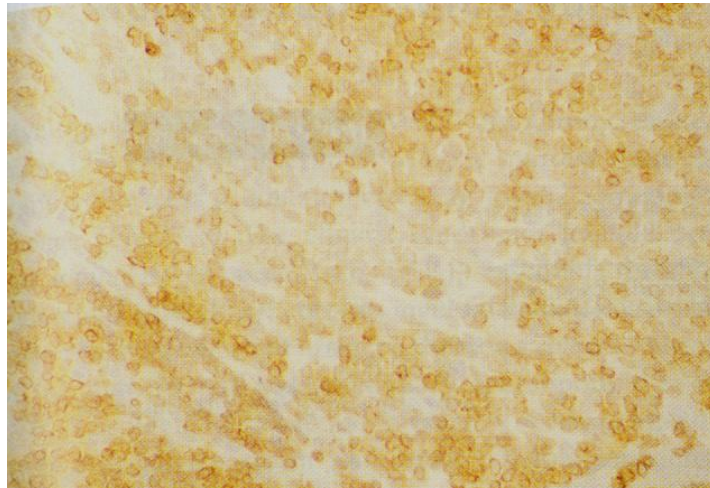


Figura 12. Marcação positiva para BCL-2.

2) Linfoma cutâneo primário: Estes casos partilham uma morfologia celular e um padrão de crescimento semelhantes, mas nos linfomas cutâneos não existe hiperexpressão BCL2.

3) Linfoma de células do manto: é positivo para ciclina D1 e CD5 e negativo para BCL6 e CD10, ao contrário do LF (Tabela 5).

4) Linfoma de grandes células B rico em células T: corresponde a uma variante do LDGC.

5) Linfoma da zona marginal: Tanto o esplénico como o extraganglionar podem apresentar um padrão de crescimento parcialmente folicular, distinguindo-se este do LF por ser habitualmente negativo para CD10 e BCL6 e não apresentar rearranjos IgH/BCL2 (ao contrário do LF).

6) Transformação histológica para LDGC: A histologia pode variar imenso em diferentes secções do mesmo gânglio linfático. É importante tentar detetar áreas de LDGC, traduzidas pela expansão de grandes células tumorais fora do centro germinativo, redução marcada de linfócitos reativos infiltrantes e perdas das redes dendríticas foliculares presentes no LF (o que sugere que estes componentes do microambiente são dispensáveis quando o tumor adquire eventos genéticos adicionais promotores de um crescimento autónomo das células) (Martinez *et al.*, 2008). Esta transformação para uma fase agressiva da doença está associada à aquisição de eventos genéticos adicionais como mutações *TP53*, perda de *p16* e ativação de *c-MYC*, entre outros (Ott e Rosenwald, 2008), e traduz-se por rápida progressão das adenopatias, infiltração extraganglionar, desenvolvimento de sintomas sistémicos e elevação da LDH sérica, acarretando um pior prognóstico.

Importa ainda referir que está descrito na literatura alguns casos raros de sarcoma de células dendríticas histiocíticas em doentes com LF, que podem estar presentes na altura do diagnóstico do linfoma, embora frequentemente sejam posteriores a este (Freedman, 2011).

5. ESTADIAMENTO

Após o diagnóstico, o médico deve realizar um conjunto de procedimentos para estadiar corretamente o tumor e para avaliar o estado geral do doente, de forma a poder instituir a terapêutica mais adequada ao caso em questão.

Neste sentido deve-se proceder a um exame físico cuidado, aferir o estado global do doente, pesquisar a presença de sintomas B, solicitar hemograma completo com fórmula leucocitária e contagem de plaquetas, desidrogenase láctica sérica, serologia para a Hepatite B (risco de reativação com a imunoquimioterapia), teste de gravidez se mulher em idade fértil (se a quimioterapia for equacionada), TC cervico-toraco-abdomino-pélvica, biópsia e aspirado da medula óssea. Além disso, deve-se pedir um ecocardiograma ou FEVe (fração de ejeção

ventricular esquerda) (se tratamento com antraciclina), β 2-microglobulinemia, ácido úrico, serologia da hepatite C, discussão sobre fertilidade e conservação de gametas e eventualmente PET-TC (Zelenetz *et al.*, 2011).

5.1 A CLASSIFICAÇÃO DE ANN-HARBOR

O sistema de estadiamento usado no LF, tal como nos outros LNH, é a classificação proposta inicialmente para os LH. A Classificação de Ann-Harbor (ver Tabela 6) tem em conta o número de locais envolvidos e a sua localização acima ou abaixo do diafragma, definindo 4 estádios de doença. Os doentes são ainda divididos de acordo com a ausência (A) ou a presença (B) de sinais sistémicos como febre inexplicada superior a 38°C, sudorese noturna, perda ponderal não intencional superior a 10% em 6 meses. A presença de doença volumosa (maior diâmetro superior ou igual a 10 cm) é assinalada com “X”, o envolvimento extraganglionar é identificado com a letra “E” e a letra “S” é utilizada quando há envolvimento do baço (Hayashi *et al.*, 2010).

Tabela 6. Classificação de Ann-Harbor.

Estádio	Descrição
I	Envolvimento de 1 única zona ganglionar (I) ou 1 local extraganglionar único (IE).
II	Envolvimento de 2 ou mais regiões ganglionares no mesmo lado do diafragma (II) ou envolvimento localizado de algum local extraganglionar (IIE).
III	Envolvimento de regiões ganglionares de ambos os lados do diafragma (III) ou envolvimento localizado de um local extraganglionar (IIIE) ou do baço (IIIs) ou ambos (IIIEs).
IV	Envolvimento difuso ou disseminado de um ou mais órgãos extralinfáticos, com ou sem envolvimento ganglionar. Envolvimento do fígado e da medula óssea.

(adaptado de Vitolo *et al.*, 2008).

5.2 O PAPEL DA PET-FDG

A PET-FDG (tomografia de emissão de positrões com ^{18}F -fluorodesoxiglucose) é uma técnica relativamente recente. A sua importância ao nível do estadiamento do LF prende-se com a possibilidade de permitir classificar a intensidade da atividade metabólica em baixa / moderada / alta e identificar áreas de atividade metabólica discordante, sugerindo áreas de diferentes fenótipos. Uma atividade substancialmente maior num grupo ganglionar comparativamente a outros poderá indiciar um local de transformação para alto grau (Hofman e Hicks, 2011).

A PET/CT é a combinação entre um exame de avaliação funcional e um exame de avaliação morfológica, com uma grande complementaridade entre ambos, resultando numa avaliação global bastante superior do doente e da sua doença.

A PET pode ser útil para direcionar a biópsia para os locais de maior atividade metabólica ou proliferativa, de forma a obter a melhor amostra da doença, o que pode otimizar a classificação do grau do tumor. Em doentes com LF de baixo grau (estádio I/II) a PET/CT é importante para evitar a realização fútil de radioterapia em casos de doença disseminada não diagnosticada previamente e para otimizar o campo de tratamento em casos de doença localizada confirmada (Hofman e Hicks, 2011).

Se usada inicialmente antes dos tratamentos, é possível e aconselhável a repetição da PET/CT para re-estadiamentos, permitindo discriminar tecido cicatrizante de tumor viável nas massas residuais, o que pode orientar a estratégia terapêutica ou de vigilância a implementar (Hofman e Hicks, 2011).

No entanto, a PET-FDG possui ainda algumas limitações que importa mencionar. Em primeiro lugar podem surgir falsos negativos, sobretudo ao nível da medula óssea (é difícil distinguir porque na medula óssea normal há variabilidade na intensidade de captação, o que pode mascarar um LF de baixo grau). Este exame é assim mais útil em doentes com LDGC,

onde o envolvimento medular é mais comum. Os falsos negativos podem também ocorrer em doença de reduzido volume, em gânglios inferiores a 1 a 1,2cm. Além disso, há gânglios que não possuem avidéz para a FDG, mas podem eventualmente ser detetados na PET/CT, se as suas dimensões o permitirem. Por outro lado podem ocorrer falsos positivos em doentes com doenças granulomatosas como a sarcoidose ou a tuberculose, pelo que uma anomalia única neste exame que implique uma diferença no grau do LF deve ser confirmada com biópsia dirigida. Outros falsos positivos podem ser causados por variantes fisiológicas, inflamatórias, infecciosas e outras condições benignas como a displasia fibrosa óssea (Hofman e Hicks, 2011).

6. FATORES DE PROGNÓSTICO

Para fazer uma escolha racional é importante discriminar entre doentes com diferentes riscos e diferentes probabilidades de sobrevivência, o que se pode conseguir com recurso a marcadores prognósticos, como os descritos seguidamente.

6.1 FLIPI e FLIPI-2

O FLIPI (*Follicular Lymphoma International Prognostic Index*), resultante de uma análise retrospectiva da era pré-rituximab, foi o índice de prognóstico mais utilizado após a sua publicação, em 2004 (Relander *et al.*, 2010). Este inclui 5 fatores de risco (idade, estágio Ann-Arbor, nível de hemoglobina, LDH sérica e número de lesões extraganglionares), que dividem os doentes em grupos de baixo, intermédio e alto risco, com diferentes taxas de sobrevivência global (OS) e de sobrevivência livre de doença (PFS) (Tabela 7). As suas principais características são a simplicidade, ser válido para doentes tratados com R / R-CVP / R-CHOP e ser um fator de prognóstico de sobrevivência também para a primeira recidiva de

LF. No entanto, possui algumas limitações, nomeadamente: ser baseado numa análise retrospectiva de doentes cujo tipo de tratamento (bastante heterogéneo entre estudos) não foi incluído na análise do prognóstico, não ser um fator preditivo para a necessidade de tratamento, não permitir prever a resposta a diferentes regimes terapêuticos, não contemplar características biológicas do tumor e /ou do doente (van Oers e Kersten, 2011).

Recentemente foi publicado o FLIPI-2, baseado em séries prospetivas de doentes a necessitar de tratamento, usando parâmetros que antes não eram contemplados, representando uma ferramenta promissora para identificar doentes com LF com diferentes perfis de risco, na atual era da imunoquimioterapia potente (Hitz et al., 2011). O FLIPI-2 mantém dois fatores de risco, idade e hemoglobina, e apresenta três novidades, o envolvimento da medula óssea, o diâmetro do maior gânglio envolvido e a β 2-microglobulina sérica (que substitui a LDH, uma vez que esta se encontra aumentada apenas em 20% dos LF) (Tabela 7). Devido a ser um índice relativamente recente, não é para já possível fazer uma previsão prognóstica além dos 5 anos.

Tabela 7. Descrição do FLIPI e FLIPI-2 e respetiva estratificação dos grupos de risco.

FLIPI (análise retrospectiva; era pré-rituximab)					FLIPI-2 (análise prospetiva; era do rituximab)				
Idade		≥ 60 anos			Idade		≥ 60 anos		
Hemoglobina		< 12 g/dl			Hemoglobina		< 12 g/dl		
LDH sérica		$>$ limite superior do normal			β 2m sérica		$>$ limite superior do normal		
Ann-Harbor		III / IV			Envolvimento MO		Presente		
Nº de gânglios		> 4			Diâmetro do $>$ gânglio		> 6 cm		
Risco	Nº fatores	OS 5A	OS 10A	RR	Risco	Nº fatores	PFS 3A	OS 3A	PFS 5A
Baixo	0-1	91%	71%	1	Baixo	0	91%	99%	79%
Intermédio	2	78%	51%	2,3	Intermédio	1-2	69%	96%	51%
Alto	3-5	53%	36%	4,3	Alto	3-5	51%	84%	20%

Legenda: LDH – Lactatodesidrogenase, MO – medula óssea, β 2m – β 2microglobulina, A – Anos, OS – sobrevivência global, PFS – sobrevivência livre de doença, RR – risco relativo.

(adaptado de Relander *et al.*, 2010).

6.2 ILI – “ITALIAN LYMPHOMA INTERGROUP”

Este *score* de prognóstico, tal como o FLIPI, foi definido retrospectivamente na era pré-rituximab e baseia-se em 6 parâmetros clínicos: idade superior a 60 anos, sexo masculino, número de locais de doença extraganglionar superior ou igual a 2, sintomas B, velocidade de sedimentação eritrocitária superior ou igual a 30 e LDH sérica aumentada. Com esta ferramenta é possível identificar três grupos de risco: baixo (0-1 fatores de risco, FR), intermédio (2 FR) e alto (3 ou mais FR), com taxas de sobrevivência aos 10 anos de 65%, 54% e 11%, respetivamente (Bendandi, 2008).

6.3 IPI – “INTERNATIONAL PROGNOSTIC INDEX”

Este sistema foi inicialmente desenvolvido para linfomas agressivos, identificando quatro grupos de risco de acordo com a idade, estágio do tumor, LDH, estado geral do doente e número de locais de doença extraganglionar. O IPI também é fiável para identificar grupos de risco no LF, no entanto apenas classifica uma pequena proporção de doentes na categoria de maior risco. É aqui referido apenas numa perspetiva histórica, uma vez que atualmente existem outras ferramentas mais adequadas.

6.4 OUTROS MARCADORES DE PROGNÓSTICO

Vários estudos têm sido feitos recentemente, na tentativa de encontrar marcadores que possam prever a evolução clínica do LF e que permitam estabelecer um prognóstico individualizado.

Uma das principais abordagens tem sido procurar estabelecer uma correlação entre a genética e as características clínicas do LF (sobretudo a nível da sobrevivência), mas existe uma grande variação nos resultados publicados na literatura (Leich *et al.*, 2011). Esta variação pode ser devida ao tipo de tratamento instituído durante a investigação, que pode ter um impacto significativo nas características moleculares ou genéticas e, conseqüentemente,

influenciar os resultados obtidos (de Jong et al., 2009).

A nível de alterações genéticas, a maioria dos estudos conclui que quanto maior o seu número, mais agressivo o tumor e menor a sobrevivência, embora um estudo recente realizado em 210 doentes com LF não tenha encontrado associação entre o número de alterações citogenéticas e a tradução clínica do tumor (Leich *et al.*, 2011). Deleções nos cromossomas 1p, 6q, 10q e 17p, trissomia 21, inserções em 1q e dissomia uniparental em 16p foram encontradas mais frequentemente em LF com progressão adversa. Os rearranjos dos genes *c-MYC* e *BCL6*, bem como a inativação do gene supressor tumoral *TP53*, parecem fundamentais na progressão e transformação do LF num linfoma mais agressivo.

Como referido anteriormente, sabe-se que o microambiente desempenha um papel fundamental na patogénese do LF, pelo que vários estudos têm sido feitos também nesta área. Dave e colaboradores (2004), num estudo de *arrays* de genoma inteiro de 191 LF não tratados, encontraram 2 “assinaturas” genéticas proeminentes associadas à sobrevivência, que designaram de resposta imune 1 (IR1) e 2 (IR2), cuja maioria dos genes são expressos pelas células do microambiente. A IR1 engloba genes expressos por células T e histiócitos e está associada a um prognóstico mais favorável, com sobrevivência aumentada. Por outro lado, a IR2 engloba genes predominantemente expressos por macrófagos e células dendríticas e tem um pior prognóstico. Estas assinaturas podem identificar não só diferentes subpopulações celulares mas também diferentes graus de ativação celular. A ativação celular do microambiente é importante pois uma má resposta ao rituximab e a rápida progressão para LDGC associam-se a expressões genéticas que se assemelham às da hiperplasia folicular reativa. Pelo contrário, tumores com boa resposta à imunoquimioterapia e baixa tendência para progressão têm perfis de expressão mais semelhantes aos tecidos linfóides inativos (Martinez *et al.*, 2008).

Em 2009, de Jong e colaboradores, alertaram para o impacto de diferentes abordagens terapêuticas no valor prognóstico do microambiente, comparando um subgrupo tratado com

fludarabina e outro com CVP. Em ambos se demonstrou que a presença de um grande número de células CD4⁺ se associa a bom prognóstico e a expressão de CD69 a mau prognóstico. No entanto, enquanto nos doentes tratados com fludarabina, o aumento de CD68 e de FOXP3 representa um pior prognóstico, nos doentes tratados com CVP, este é um dado favorável (de Jong *et al.*, 2009).

Ainda em relação ao microambiente, o número total de células T não parece ter impacto na evolução dos tumores, mas um elevado número de subpopulação de células T PD1-positivas pode constituir um fator preditivo de maior sobrevivência dos doentes, sendo este um fator prognóstico independente do FLIPI (de Jong e Fest, 2011). Além disso, se por um lado o número de células CD8⁺ não tem influência na progressão para LDGC e parece estar relacionado com bom prognóstico, um grande número de células CD4⁺ no compartimento intrafolicular já se associa a rápida progressão para LDGC. O aumento deste número na área perifolicular dos gânglios tumorais é mais comum nos doentes com longa sobrevivência, embora o seu número não se correlacione com a sobrevivência na maioria dos estudos (Martinez *et al.*, 2008).

Outro fator prognóstico negativo independente do FLIPI é a presença superior a 40 % de uma subpopulação de células B tumorais com ausência de sinalização ativável pelo BCR, associada a diminuição da expressão de CD20 (Irish *et al.*, 2010).

Um maior número de macrófagos associados ao linfoma (superior ou igual a 10 por campo de alta resolução) também se associa a menor sobrevivência, sendo este outro fator prognóstico independente do FLIPI (Andjelic *et al.*, 2012).

O grau histológico do tumor e o índice de proliferação das células tumorais (avaliado pelo Ki67) também podem ser úteis, mas não devem ser interpretados de uma forma isolada.

Na literatura encontram-se ainda diversos outros achados que podem condicionar o prognóstico da doença, enunciados, de seguida, de uma forma sumária (Tabelas 8 e 9).

A densidade vascular encontra-se morfológicamente correlacionada com potenciais eventos angiogénicos no microambiente do tumor, pelo que um aumento de densidade de microvasos leva a pior prognóstico. Num estudo com utilização de microarrays e imunohistoquímica para estudar as vias da apoptose encontrou-se um *ratio* BCL2/BAX aumentado no LF, que se associa a pior prognóstico e que o permite distinguir da hiperplasia folicular reativa. O aumento da expressão do gene antiapoptótico YY1 também se associa a pior prognóstico, bem como o aumento da expressão MCL1 em centroblastos. Em relação à expressão de BCL-X_L, num estudo parece associada a menor sobrevivência, enquanto o CCNB1 (envolvido na desregulação do ciclo celular) seria um marcador prognóstico independente, traduzindo-se num aumento na sobrevivência. No entanto, ambos foram contrariados por estudos posteriores que não encontraram as associações sugeridas (Leich *et al.*, 2011). O aumento da expressão PU1 (uma proteína essencial para o desenvolvimento das células mielóides e linfóides B) constitui outro fator prognóstico independente do FLIPI (Relander *et al.*, 2010).

Tabela 8. Marcadores prognósticos no Linfoma Folicular.

Mau prognóstico / progressão histológica	Bom prognóstico
Deleções 1p, 6q, 10q, 17p	Resposta imune tipo 1
Inserções / duplicações +1q, +2, +3q, +5	Elevado número de células T CD8 ⁺
Trissomia 21	Expressão PU1
Inativação TP53	Elevada expressão CCNB1
Rearranjos MYC e BCL6	Infiltrado denso interfolicular de FOXP3 ⁺ após CVP
Resposta imune tipo 2	Elevado número de macrófagos CD68 ⁺ após CVP
Infiltrado denso FOXP3 ⁺ após fludarabina	Elevado número de células T CD4 ⁺ interfoliculares
Elevado número de macrófagos CD68 ⁺ após fludarabina	
Expressão CD69	
Elevado número de células T CD4 ⁺ foliculares	
Elevado número de centroblastos MCL-1 ⁺	
Elevada densidade de microvasos	
Expressão BCL-X _L	
Expressão YY1	
Aumento dos <i>ratios</i> BCL2/BAK e BCL2/BAX	

(adaptado de Leich *et al.*, 2011).

Tabela 9. Marcadores de prognóstico molecular no Linfoma Folicular

Marcadores de Prognóstico	Valor Prognóstico	Mecanismo
Ganhos cromossômicos (+7, +12q13-14, +18q)	Desfavorável	Oncogenes dominantes
Perdas cromossômicas (Del6q, -9p21, -17p13)	Desfavorável	Perda do gene supressor tumoral
Translocação BCL6	Desfavorável	Instabilidade genética
Expressão da proteína Bcl-2	Desfavorável	Anti-apoptose
Expressão da proteína Bcl-6	Favorável	Fenótipo do centro germinativo
Expressão de CD10	Favorável	Fenótipo do centro germinativo
PU.1	Favorável	Fenótipo do centro germinativo
Conteúdo em macrófagos	Desfavorável	Modulação do microambiente
Expressão de MDM2	Desfavorável	Perda do p53 funcional
BCL-X_L	Desfavorável	Anti-apoptose
Ciclina B1	Favorável	Progressão no ciclo celular
Resposta Imune (IR-1 vs IR-2)	Variável	Modulação do microambiente
Gene preditivo – 81	Variável	Reflete o comportamento tumoral

(adaptado de Sehn L H, 2006).

Estudos publicados têm resultados muito variáveis e contraditórios, podendo as várias modalidades de tratamento explicar em parte algumas diferenças. Assim, qualquer marcador de prognóstico, presente e futuro, deve ser avaliado no contexto de abordagens terapêuticas específicas (de Jong et al., 2009).

7. O TRATAMENTO DO LINFOMA FOLICULAR

As *guidelines* para o tratamento do LF aplicam-se aos graus histológicos 1 e 2, enquanto os graus 3A e 3B são normalmente abordados de acordo com as orientações para o LDGC.

Os LF que se apresentam de forma localizada (grau I/II) correspondem a menos de 10% do total dos LF, já que a grande maioria se apresenta com adenopatia generalizada (grau III) ou com invasão medular (grau IV) (Horner et al., 2009).

Em muitos casos, o estágio que é estabelecido com base na clínica e exames imagiológicos é subestimado. É fundamental realizar uma biópsia para excluir invasão medular, o que implicaria uma abordagem totalmente diferente. Mesmo assim pode haver erros, tal como Wirth demonstrou recentemente com o recurso a PET-FDG, aumentando o estágio de cerca de 1/3 dos linfomas previamente estadiados com recurso a TAC e biópsia de medula óssea (Wirth et al., 2008).

7.1 O TRATAMENTO DO LF EM ESTÁDIOS INICIAIS (grau I/II)

O tratamento de eleição para o LF localizado (estádios iniciais da doença, grau I/II) é a radioterapia, dada a notável radiosensibilidade deste tipo de tumor (McNamara C. *et al.*, 2011, Zelenetz A. D. *et al.*, 2011). Na literatura estão descritas várias séries de casos de LF que confirmam elevadas taxas de resposta em cerca de 80% dos doentes tratados com este tipo de abordagem terapêutica (McNamara C *et al.*, 2011). Segundo as *guidelines* da ESMO (Sociedade Europeia de Oncologia Médica), da NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) e da BCSH (*British Committee for Standards in Haematology*), o tratamento recomendado é a radioterapia com irradiação de “campos limitados” (*Involved field* ou *Involved site radiotherapy*), na dose de 30 Gy (ou 36 Gy se o gânglio for volumoso), com doses diárias de 1,5 a 2 Gy. Os campos de irradiação devem basear-se na PET-CT e incluir os

gânglios envolvidos, com margens de 5 cm proximal e distalmente e margens de 1 a 1,5 cm noutras direções (Hoppe, 2011).

A radioterapia *involved field* tem demonstrado excelentes resultados, com um intervalo livre de doença aos 10 anos entre 40 e 50% e sobrevivência aos 10 anos de 60-65%, representando uma possível cura numa fração dos doentes. Existe uma diminuição progressiva no risco de recidiva, sendo esta bastante rara após os 10 anos e, quando ocorre, é normalmente em gânglios não tratados e que se conseguem detetar ao exame objetivo. Em 70% dos casos corresponde igualmente a um estágio I/II, existindo invasão medular em menos de 10% das recidivas. Nos casos de recidiva, 20 a 30% demonstram evidência de transformação histológica no momento da descoberta ou pouco tempo depois. O prognóstico após recidiva depende do estágio e da transformação histológica, variando a sobrevivência média entre 5,3 e 12,8 anos (Hoppe, 2011).

Alguns estudos demonstram que a irradiação de campos mais extensos não deve ser considerada pois, apesar de poder apresentar um tempo livre de recidivas mais alargado, não tem benefícios na sobrevivência, além de se associar a maior risco de complicações devido à maior irradiação (Hoppe, 2011).

Em certos casos pode conseguir-se uma palição bastante eficaz com radioterapia local de baixa dose (2 Gy x 2), um conceito interessante que, nos estudos publicados, demonstrou respostas (mesmo em gânglios volumosos com tamanho superior a 5 cm) na ordem dos 90%, com 42 meses livres de doença local após resposta completa (Ganem *et al.*, 1994; Haas *et al.*, 2003).

Em casos raros de LF com apresentação extraganglionar, como a conjuntiva e a pele, usam-se eletrões de baixa energia (cerca de 6 MeV), em campos de irradiação mais restritos (Hoppe, 2011).

Não existem contra-indicações absolutas à radioterapia, mas podem haver algumas relativas. Por exemplo, um doente com Síndrome de Sjogren pode sofrer agravamento da xerostomia e da xeroftalmia (Hoppe, 2011).

Após completar-se a radioterapia, é apropriado repetir a TC para confirmar a resposta ao tratamento. O doente deve ainda permanecer em vigilância clínica regular, com exame físico cada 4 a 6 meses e análises sanguíneas pelo menos uma vez por ano (incluir estudo da função tiroideia se houve irradiação do pescoço). A maioria dos clínicos pede ainda uma TC anualmente nos primeiros 5 anos. A identificação de recidiva obriga a biópsia para averiguar se houve transformação histológica (Hoppe, 2011).

Vários ensaios clínicos randomizados foram insuficientes para demonstrar a utilidade de algum tratamento adicional além da radioterapia, embora alguns estudos (Seymour *et al.*, 2003) sugiram um benefício da adição de quimioterapia, sobretudo em casos de gânglios volumosos, com diminuição das recidivas e aumento da sobrevivência. Além disso, uma vez que a maior parte das recidivas ocorrem fora dos campos irradiados, em cerca de 50% dos doentes, a terapêutica combinada poderá constituir uma alternativa terapêutica. No entanto, segundo a BCSH a utilização de terapêutica combinada e a imunoterapia, estão ainda em estudo, devendo apenas ser utilizadas no âmbito de ensaio clínico (McNamara C *et al.*, 2011).

7.2. O TRATAMENTO DO LF EM ESTÁDIOS AVANÇADOS (GRAU III/IV)

No final do século passado, o panorama do LF em estádios avançados mudou radicalmente. Inicialmente observava-se uma resposta inicial à quimioterapia com agente único ou em combinação, mas frequentes recidivas. Após a primeira recidiva, tanto a resposta ao tratamento, como o intervalo livre de doença, diminuía acentuadamente, obtendo-se uma sobrevida média de 8 a 10 anos após o diagnóstico da doença (Horning, 1993).

Em 1997 houve uma revolução no tratamento do LF com a introdução do Rituximab, um anticorpo monoclonal anti-CD20. A combinação do Rituximab e da quimioterapia resultou num grande aumento das taxas de resposta, na sobrevivência livre de doença e na sobrevivência, sendo atualmente a primeira linha, tanto no tratamento inicial, como nas recidivas (van Oers e Kersten, 2011). No entanto, no momento presente ainda não há evidência de um tratamento curativo e muitas questões permanecem por responder.

As orientações internacionais recomendam que o tratamento do LF em estágio avançado deverá ser efetuado apenas caso exista sintomatologia ou se verifique progressão da doença (Ardesna et al., 2003). Esta política de “*wait and see*” nos casos assintomáticos baseia-se em dois fortes argumentos: em primeiro lugar, ainda não existe um tratamento curativo (com a possível exceção do transplante alogénico de células estaminais, uma opção viável numa minoria de doentes com recidiva de LF); em segundo, e mais importante, está demonstrado que o tratamento imediato não oferece benefícios na sobrevivência dos doentes (Ardesna et al., 2003). Ainda assim, importa referir que os estudos que analisam as duas opções ou são anteriores à descoberta do Rituximab ou ainda não contemplam esta alternativa, pelo que são necessários estudos randomizados para avaliar a situação na atual era da imunoquimioterapia (van Oers e Kersten, 2011).

Atualmente está a ser realizado um estudo para comparar os benefícios do tratamento imediato do Rituximab *versus* “*wait and see*” (Ardesna et al., 2010). Até agora não é possível demonstrar benefício em termos da sobrevivência dada a fase ainda precoce do estudo, mas os resultados iniciais demonstram que o Rituximab atrasa significativamente a necessidade de nova terapia, sendo necessária uma avaliação mais prolongada para perceber se esta abordagem permitirá alterar a história natural da doença.

Outro ponto que não tem sido contemplado e que não deve ser menosprezado é o impacto psicológico no doente e a ansiedade infligida ao comunicar-lhe que tem uma doença

maligna e que é aceitável esperar que se desenvolvam sintomas, ao invés de iniciar de imediato um tratamento. Resultados preliminares de uma análise da qualidade de vida nos doentes submetidos ao tratamento imediato com Rituximab demonstraram uma redução marcada dos níveis de ansiedade e uma melhoria do bem-estar funcional (Ardesna *et al.*, 2011).

Assim que haja indicações formais para iniciar o tratamento (qualquer um dos critérios GELF. Tabela 10), o médico depara-se com várias alternativas pelas quais pode optar. Para fazer uma escolha racional é importante discriminar entre doentes com diferentes riscos e diferentes probabilidades de sobrevivência, o que se pode conseguir com recurso a marcadores prognósticos, referidos anteriormente.

Tabela 10. Indicações para tratamento de doentes com Linfoma Folicular (critérios GELF modificados).

Critérios GELF modificados (qualquer um dos critérios)
- Grande massa tumoral definida por um dos seguintes: <ul style="list-style-type: none">- tumor > 7 cm- 3 gânglios em 3 áreas distintas, cada um > 3cm- esplenomegália sintomática- compressão de órgão- ascite ou derrame pleural
- Sintomas sistémicos
- LDH ou β 2m séricas aumentadas

(Adaptado de Zelenetz *et al.*, 2011)

A escolha do tratamento a instituir num dado doente depende de vários fatores como, as características clínicas (estádio do tumor, níveis de hemoglobina e de β 2-microglobulina, tamanho dos gânglios envolvidos), as características físicas do tumor (tamanho e taxa de

crescimento), as características do doente (idade e comorbilidades), o objetivo do tratamento (obter remissão longa ou palição) e os efeitos adversos expectáveis de cada tratamento (Tabela 10).

7.2.1 O Tratamento Inicial

A) Imunoquimioterapia

A combinação de rituximab e quimioterapia é a primeira modalidade de tratamento, que se traduz por um aumento da sobrevivência em LF avançados. Um estudo comparativo da eficácia da imunoquimioterapia *versus* quimioterapia em pacientes não tratados concluiu que esta combinação resulta ainda numa redução de 60% do risco relativo do tratamento falhar, com melhoria das taxas de resposta global e resposta completa e da sobrevivência livre de doença. Curiosamente esta melhoria é independente do tipo de quimioterapia usada (Zelenetz *et al.*, 2011).

A quimioterapia usada nestes casos engloba muitas vezes a combinação de várias classes farmacológicas de fármacos (alquilantes, antimetabolitos, alcalóides, moduladores da resposta biológica, entre outros). O principal motivo da quimioterapia combinada é utilizar medicamentos que atuem sobre diferentes etapas do processo metabólico das células, aumentando assim a citotoxicidade com diminuição dos efeitos secundários.

A adição de antraciclina (Doxorrubicina, Mitoxantrone) nos esquemas terapêuticos parece contribuir para a melhoria da qualidade das remissões obtidas. De facto, obter uma remissão completa é importante para a sobrevivência livre de doença mas também para a sobrevivência global (maior sobrevivência se resposta completa, comparando com resposta parcial, como demonstrou um estudo (Bachy *et al.*, 2010). Além disso, dados retrospectivos sugerem que o risco de transformação maligna é menor em doentes que recebam antraciclina

como parte do seu tratamento inicial (Al-Tourah *et al.*, 2008). A sua principal limitação é a grande toxicidade (especialmente cardíaca) em doentes mais idosos (van Oers, 2011).

Neste sentido, um dos esquemas de quimioterapia mais utilizados é o CVP (Ciclofosfamida, Vincristina, Prednisolona) em associação com rituximab (R-CVP), um regime sem antraciclina, muito melhor tolerado, útil em doentes com estado geral débil ou idosos que requerem tratamento. Uma alternativa para estes doentes é o uso de agentes alquilantes (Clorambucil ou Ciclofosfamida), associados ou não a Rituximab.

O outro esquema largamente utilizado é o CHOP (Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina, Prednisolona) isoladamente e/ou em associação com Rituximab (R-CHOP). Esquemas contendo Fludarabina (um antimetabolito análogo da purina) têm também sido utilizados, como por exemplo Fludarabina em associação com Rituximab (R-F), em combinação com Mitoxantrone e Dexametasona (FND) sem ou com Rituximab (R-FND) ou combinada com Ciclofosfamida e Mitoxantrone (FCM), além do Rituximab (R-FCM).

A **Bendamustina**, um agente com propriedades alquilantes e semelhante aos análogos das purinas, foi desenvolvido há cerca de 50 anos, mas só recentemente foi aprovado para recidivas de LF, dada a sua considerável atividade, em qualquer subgrupo do FLIPI e em doentes refratários ao tratamento com fludarabina ou alquilantes. Além disso, tem um bom perfil de toxicidade, com mielossupressão moderada e alopecia rara (Kahl *et al.*, 2010), sendo por isso uma boa alternativa a considerar em combinações com outros agentes.

A associação deste agente com Rituximab (BR) já demonstrou ser pelo menos tão eficaz quanto o R-CHOP no tratamento de primeira linha de LF. Um estudo que comparou as duas combinações encontrou taxas de sobrevivência global e resposta global semelhantes, mas a BR revelou maior taxa de resposta completa (40% vs 31%) e maior PFS (55 meses comparando com 35 meses nos doentes tratados com R-CHOP), além de ter melhor perfil de toxicidade (Rummel *et al.*, 2009). A Bendamustina demonstrou resultados prometedores tanto

em doentes com LF recentemente diagnosticado como em doentes com LF recidivado ou refratário previamente tratado de forma agressiva (nestes, a associação de Bendamustina com Rituximab evidenciou sobrevivências globais de 92% e sobrevivência média livre de doença de 23 meses (McNamara C *et al.*, 2011)), bem como em doentes com LNH transformado (Zelenetz *et al.*, 2011).

B) Rituximab em Monoterapia

A utilização de rituximab em monoterapia permite um tratamento sem uso de drogas citotóxicas, evitando a toxicidade aguda e a longo prazo destas. Alguns estudos de fase II demonstraram que a monoterapia com Rituximab em primeira linha (com uma dose de 375mg/m², uma vez por semana, durante um mês) apresenta bons resultados: taxas de resposta global superiores a 75%, com 50% de remissões completas e uma duração de resposta média de 18 a 24 meses (van Oers e Kersten, 2011). Além disso, alguns doentes apresentam resposta molecular (negativação de BCL-2) com uma sobrevivência livre de doença ainda maior (37 meses *versus* 12 meses em doentes BCL2 positivos). Atualmente estão a decorrer alguns estudos randomizados para avaliar a eficácia da monoterapia com rituximab em doentes com baixa carga tumoral e/ou pontuação baixa no FLIPI (van Oers e Kersten, 2011).

O Rituximab pode ainda ser usado como tratamento de manutenção, de uma forma eficaz e relativamente segura (como será referido adiante).

No entanto, é importante notar que a resistência ao Rituximab (definida como a resistência ao tratamento ou a recidiva nos primeiros seis meses após Rituximab) está atualmente a aumentar, podendo atingir valores na ordem dos 30 a 50% (van Oers e Kersten, 2011).

No LF num estágio III/IV, com baixa carga tumoral, a irradiação linfóide total com baixas doses (15-32 Gy) normalmente tem boas taxas de resposta e tempos de remissão, com relativamente baixa toxicidade (Haas *et al.*, 2003). No entanto, dada a falta de estudos de longo curso comparando a radioterapia e a imunoterapia, atualmente esta opção não é considerada, sendo reservada para doentes selecionados que não possam ser sujeitos a tratamento sistêmico.

7.2.2 O TRATAMENTO DE CONSOLIDAÇÃO / MANUTENÇÃO

O objetivo do tratamento de consolidação é melhorar rapidamente a resposta ao tratamento de primeira linha, transformando as respostas parciais em respostas completas e, se possível, obter uma resposta molecular. Desta forma, minimizando a doença residual, a expectativa é diminuir o risco de recidiva.

Os esquemas de manutenção com **quimioterapia** como agentes únicos ou em combinação não são considerados para este efeito pois, apesar de demonstrarem um significativo aumento da sobrevivência livre de doença, não apresentam benefício em termos de sobrevivência global. Além disso, a quimioterapia de manutenção também levanta o problema da toxicidade a longo prazo e possivelmente aumenta o risco de leucemias secundárias e mielodisplasia.

Uma meta-análise de 10 estudos de fase III envolvendo mais de 1900 doentes permitiu concluir que o **Interferão- α 2** apresentava melhoria na sobrevivência quando combinado com quimioterapia no tratamento inicial de um LF, mas não quando este é administrado como tratamento de manutenção após quimioterapia inicial. No entanto, a toxicidade do IFN levou à descontinuação do tratamento por uma considerável parte dos doentes (Rohatiner *et al.*, 2005).

Segundo as orientações mais recentes da NCCN, os tratamentos de primeira linha são a manutenção de Rituximab e a radioimunoterapia após a QT. Em segunda linha, está recomendado o tratamento em altas doses com resgate autólogo de células estaminais ou um transplante alogênico de células estaminais em pacientes selecionados (Zelenetz et al., 2011).

A) Rituximab

Dada a sua eficácia e baixa toxicidade, além do seu perfil farmacodinâmico favorável, considerou-se a hipótese de fazer tratamento de manutenção com **Rituximab**. Além disso, o alvo do Rituximab (CD20) encontra-se normalmente expresso à superfície de células tumorais residuais, aumentando a probabilidade de sucesso do tratamento. Uma meta-análise de 2009 demonstra que o tratamento de manutenção com rituximab aumenta a sobrevivência livre de doença e a sobrevivência em doentes com recidiva de LF (Vidal *et al.*, 2009), independentemente do primeiro regime terapêutico utilizado no tratamento inicial do LF (van Oers, 2007). Um outro estudo englobou 1000 doentes com LF inicialmente tratados com R-CHOP (75%) ou R-CVP (22%), dividindo-os em grupo de observação e grupo com tratamento de manutenção com Rituximab, 375mg/m² cada 8 semanas, durante 24 meses. Após 25 meses de estudo, os resultados preliminares demonstram que o tratamento de manutenção apresenta maior sobrevivência livre de doença nos primeiros 2 anos (82% *versus* 66%), devendo este ser considerado o novo padrão de tratamento (Salles *et al.*, 2011).

O tratamento de manutenção com Rituximab deve ser preferido ao tratamento com este agente apenas após a recidiva do LF, uma vez que a manutenção com Rituximab demonstrou um aumento de 4 vezes no tempo de sobrevivência livre de doença (31,1 meses *versus* 7,4 meses) (Hainsworth *et al.*, 2005).

O esquema e o tempo de duração ótimos ainda não estão definidos, bem como os níveis séricos desejáveis de Rituximab. O estudo SAKK35/03 avaliou um grupo de doentes

com tratamento de manutenção cada 2 meses durante 5 anos, sem surgir toxicidade inesperada (Taverna *et al.*, 2010). Em alguns estudos foram reportados casos isolados de doentes que desenvolveram neutropenia tardia, pneumonia por *Pneumocystis carinii*, carcinoma cutâneo de células escamosas e leucoencefalopatia multifocal progressiva (van Oers e Kersten, 2011).

B) Radioimunoterapia

A recomendação da Radioimunoterapia (RIT) limita-se a doentes previamente tratados com quimioterapia (não incluindo os submetidos a imuno quimioterapia).

Esta modalidade de tratamento combina a especificidade de um anticorpo monoclonal dirigido a um antígeno tumoral com um radioisótopo que assim é entregue na localização tumoral. Existem dois radioimunoconjugados, o ^{90}Y -Ibritumomab-tiuxetano e o ^{131}I -Tositumomab, que tem sido utilizados no tratamento do LF, embora a maior parte dos estudos sejam em doentes com LF em recidiva. Contudo apenas o primeiro está aprovado na Europa (McNamara C *et al.*, 2011).

A utilização de ^{90}Y -**Ibritumomab-tiuxetano**, um anticorpo monoclonal anti-CD20 radiomarcado com ^{90}Y trium, em primeira linha como consolidação após quimioterapia, resultou da observação da conversão de resposta parcial em resposta completa em 77% dos casos e num aumento da sobrevivência livre de doença aos 4 anos de 31% para 52%. Em doentes que receberam tratamento inicial com RIT não houve efeitos significativos (Morschhauser *et al.*, 2008). Este radiofármaco demonstrou maior eficácia que a monoterapia com Rituximab em pacientes não previamente tratados (Zelenetz *et al.*, 2011).

- O ^{131}I -**Tositumomab**, um anticorpo monoclonal anti-CD20 radiomarcado com ^{131}I odo, está aprovado nos EUA para o tratamento de linfomas indolentes refratários ou em recidiva. Num estudo, um tratamento inicial único durante 1 semana com este radiofármaco induziu remissões clínicas e moleculares prolongadas em doentes com LF avançado. Após um

follow-up médio de 10 anos a duração média da resposta foi 6 anos, com sobrevivência aos 10 anos de 82% e PFS de 40% (Zelenetz et al., 2011). Este radiofármaco também foi utilizado com sucesso para obter mieloablação prévia à re-infusão autóloga de células estaminais periféricas, com taxa de resposta de 90%. No entanto, o uso de anticorpos ligados a Iodo desperta alguma relutância, pelo seu potencial risco de separação e conseqüente acumulação a nível da tiróide.

O Tositumomab e Ibritumomab demonstraram também ser eficientes em doentes resistentes ao Rituximab, estando aprovados para LF resistentes a este (van Oers e Kersten, 2011).

C) Transplante de células estaminais

O tratamento de consolidação com mieloablação seguida de transplante autólogo de células estaminais foi mais explorado na era pré-Rituximab, mas recentemente têm sido realizados alguns estudos nesta área.

Segundo estudos de longa duração, esta abordagem confere uma prolongada ausência de recidivas, atingindo um *plateau* por volta dos 12 anos. Os resultados obtidos a nível da sobrevivência livre de doença e da sobrevivência global são tanto melhores quanto mais precocemente forem realizados (Rohatiner *et al.*, 2007)

Recentemente foi publicado um estudo em que se testou este tratamento de consolidação após uma indução com R-CHOP, em doentes com LF na primeira remissão, obtendo-se uma sobrevivência livre de doença aos 5 anos de 79% e sobrevivência global de 90% (Hitz et al., 2011). Este tratamento é igualmente apropriado para doentes cuja doença esteja em segunda ou terceira remissão (Zelenetz *et al.*, 2011).

No entanto, a toxicidade deste tratamento não se pode desprezar, sendo esta uma alternativa válida apenas para doentes mais jovens que não respondem ao tratamento de

primeira linha (Hitz *et al.*, 2011).

O transplante alogénico de células estaminais só pode ser considerado em doentes bem selecionados, uma vez que possui elevadíssimas taxas de mortalidade relacionadas com o tratamento (30 a 38% se se fizer mieloablação, 25% se não houve mieloablação prévia). Nos casos em que não se procede a mieloablação prévia, há um maior risco de progressão da doença (Zelenetz *et al.*, 2011).

7.2.3 O TRATAMENTO DAS RECIDIVAS

Como o tratamento convencional do LF não é considerado curativo, virtualmente todos os doentes desenvolverão uma doença progressiva ou recorrente. A transformação para um grau histológico mais avançado é uma tendência da evolução natural da doença, pelo que, antes do tratamento de cada recidiva, é fortemente recomendada a realização de uma biópsia para confirmar o tipo histológico na recidiva. Isto é válido sobretudo para doentes que apresentem sinais e sintomas suspeitos de transformação, incluindo: rápida progressão das adenopatias, infiltração de locais extraganglionares, desenvolvimento de sintomas B, aumento da LDH sérica e/ou hipercalcémia (Hitz *et al.*, 2011).

Tal como no tratamento inicial, no LF recidivado não existe um tratamento padrão. A escolha depende da idade do doente, das comorbilidades, da carga tumoral e da sua localização, e do tipo de tratamento prévio e da sua resposta. Independentemente do tratamento que seja usado, deve fazer-se tratamento de manutenção com Rituximab, pois está demonstrado que este prolonga o tempo livre de doença e a sobrevivência (van Oers, 2007).

Além disso, sabe-se que o Rituximab é eficaz no re-tratamento de LF recidivados, mesmo que estes tenham sido previamente tratados com um regime contendo este agente (Hitz *et al.*, 2011). Em doentes debilitados deve optar-se pela monoterapia, dada a sua baixa

toxicidade, enquanto doentes com melhor estado geral beneficiam de uma combinação de imunoquimioterapia como a R-FCM, pelas suas taxas de resposta superiores, embora possam acarretar maior toxicidade e não haja evidência de uma maior sobrevivência global (Hitz *et al.*, 2011). Uma alternativa possível e bastante eficaz é a Radioimunoterapia, com os radiofármacos anteriormente descritos.

Pode ainda ser considerada a Radioterapia externa de baixa dose (2Gy x 2), que constitui um tratamento atrativo em LF recidivados em doentes com comorbilidades. Estudos realizados demonstram respostas globais de 92%, com remissões completas locais de 61% e tempo livre de doença local de 42 meses, sem causar grande toxicidade (Hoppe, 2011).

Tabela 11. Tratamentos sugeridos pela NCCN, dispostos por ordem alfabética.

Tratamento de 1ª linha	2ª linha e tratamento subsequente
<ul style="list-style-type: none"> - Bendamustina + Rituximab (categoria 1) - Fludarabina + Rituximab - R-CHOP (cat. 1) - R-CVP (cat. 1) - Radioimunoterapia (cat. 2B) - Rituximab <p>Em idosos ou doentes com comorbilidades (se nenhum dos anteriores tolerável):</p> <ul style="list-style-type: none"> - Alquilantes (Ciclofosfamida/Clorambucil) +- Rituximab - Radioimunoterapia - Rituximab (preferível) 	<ul style="list-style-type: none"> - Imunoquimioterapia (como na 1ª linha) - R-FCM (cat. 1) - Radioimunoterapia (cat. 1)
Consolidação ou manutenção - 1ª linha	Consolidação ou manutenção - 2ª linha
<ul style="list-style-type: none"> - Manutenção com Rituximab até 2 anos (cat. 1) - Radioimunoterapia após QT (cat. 1) 	<ul style="list-style-type: none"> - Manutenção com Rituximab (cat. 1) - Terapia de alta dose seguida de mieloablação com transplante autólogo de células estaminais - Transplante alogénico de células estaminais em indivíduos altamente selecionados

(adaptado de Zelenetz *et al.*, 2011)

7.3 OS NOVOS AGENTES

Nos últimos anos têm-se intensificado as pesquisas de novos fármacos que possam ser úteis para combater este tipo de neoplasias, na expectativa de poder melhorar os resultados no tratamento destes doentes.

Uma série de novos fármacos estão em estudo para o tratamento do LF, como imunomoduladores (Lenalidomida), inibidores do proteasoma (Bortezomib), Anticorpos anti-survivina, novos antiCD20 (Ofatumumab); e Oligonucleótidos anti-BCL-2 (Oblimersen).

A **Lenalidomida**, é um análogo da talidomida, com efeitos imunomodulatórios, antiproliferativos e anti-angiogénicos, mas muito mais potente, menos neurotóxico e melhor tolerado. *In vitro*, foi demonstrado efeitos antitumorais sinérgicos entre a Lenalidomida e o Rituximab (Wu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009). Nos primeiros resultados de pequenos estudos em doentes com recidiva de linfomas indolentes observaram-se respostas globais de 25 a35% com a utilização de Lenalidomida isoladamente e de 75-80% ao usar a combinação dos dois (Dutia *et al.*, 2011; Fowler *et al.*, 2009). Esta combinação parece ser vantajosa ao fornecer um regime terapêutico eficaz livre de quimioterapia, o que pode ser útil em doentes idosos e debilitados.

O **Bortezomib**, um inibidor do proteasoma, demonstrou atividade em linfomas indolentes recidivados. Alguns estudos mostram que a combinação com fludarabina e rituximab é eficaz, com toxicidade manuseável (Di Bella *et al.*, 2010).

O **Oblimersen-Sódio**, é um oligonucleótido que se liga ao mRNA de BCL-2, inibindo-o. Num estudo de fase II o Oblimersen combinado com Rituximab, demonstrou respostas completas em 23% e parciais em 19% dos doentes (Pro *et al.*, 2008).

Estratégias de vacinação têm sido testadas, mas sem os resultados esperados. Atualmente tentam-se desenvolver vacinas baseadas no ADN, em lipossomas e em células dendríticas usadas como “sistemas de distribuição” (Sakamaki *et al.*, 2011).

8. CONCLUSÃO

O Linfoma Folicular é um linfoma indolente de células B do centro germinativo folicular, sendo um dos LNH mais prevalentes nos países desenvolvidos.

É uma patologia que afeta predominantemente indivíduos acima dos 50 anos, com maior incidência no sexo feminino, embora possua uma variante pediátrica com algumas particularidades distintas.

A sua patogénese ainda não está completamente estabelecida, pelo que continuam a ser publicados estudos com novas descobertas. Atualmente sabe-se que a alteração inicial envolve a t(14;18)(q32.3;q21.3) com consequente hiperexpressão da proteína antiapoptótica, BCL2, à qual se associam várias alterações moleculares e genéticas secundárias e e/ou epigenéticas e modificações do microambiente, entre outras, que são essenciais ao desenvolvimento e progressão tumorais (Leich *et al.*, 2011).

O diagnóstico do LF, dada a sua variabilidade clínica e inespecificidade dos sintomas, assenta numa base histológica e imunofenotípica que lhe é característica e que permite fazer um diagnóstico de certeza, diferenciando-o de outras entidades (Zelenetz *et al.*, 2011). Após o diagnóstico, é necessário um estadiamento cuidadoso, pois a abordagem subsequente é diferente consoante o grau da doença. Vários marcadores prognósticos já se encontram definidos, mas muitos mais estão em estudo, procurando identificar características que se correlacionem com a evolução clínica e a sobrevivência, de forma a permitir uma avaliação mais individualizada de cada doente (Leich *et al.*, 2011).

Embora ainda não haja um tratamento curativo do LF, nos últimos 15 anos têm-se assistido a evoluções notáveis devido à descoberta de novos fármacos. A utilização do Rituximab veio modificar o panorama da doença, alcançando-se grandes melhorias na sobrevivência global, na sobrevivência livre de doença e na prevenção e tratamento das recidivas, quando comparado com os esquemas de quimioterapia previamente existentes (van

Oers e Kersten, 2011). Novos esquemas de imunoquimioterapia e de radioimunoterapia têm sido usados também com notável sucesso. Vários outros fármacos estão a ser testados ou desenvolvidos no sentido de proporcionar uma atuação terapêutica cada vez mais dirigida a determinadas características da doença mas, dada a prolongada história natural da doença, são necessários estudos de seguimento longos para avaliar a eficácia e segurança destas novas abordagens terapêuticas (Hitz *et al.*, 2011), esperando-se que num futuro breve seja possível encontrar finalmente uma cura para esta patologia.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Al-Tourah AJ, Gill KK, Chhanabhai M, Hoskins PJ, Klasa RJ, Savage KJ, Sehn LH, Shenkier TN, Gascoyne RD, and Connors JM (2008) Population-based analysis of incidence and outcome of transformed non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 26:5165-5169.
2. Ana Isabel de Almeida Lopes (2009). Linfomas indolentes: caracterização clínica e biológica (Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra, Janeiro de 2009).
3. Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD, and Proj N-HLC (1998) Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: Distributions of the major subtypes differ by geographic locations. *Ann Oncol* 9:717-720.
4. Andjelic B, Mihaljevic B, Todorovic M, Bila J, Jakovic L, and Jovanovic MP (2012) The number of lymphoma-associated macrophages in tumor tissue is an independent prognostic factor in patients with follicular lymphoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 20:41-46.
5. Ardesna KM, Qian W, Stephens R, Smith P, Warden J, Lowry L, Braganca N, Stevens L, Pocock CF, Miall F, et al (2011) Preliminary Results of Quality of Life (Qol) Analyses from the Intergroup Phase Iii Randomised Trial of Rituximab Vs a Watch and Wait Approach in Patients with Advanced Stage, Asymptomatic, Non-Bulky Follicular Lymphoma (Fl). *Ann Oncol* 22:88-88.
6. Ardesna KM, Qian WD, Smith P, Warden J, Stevens L, Pocock CFE, Miall F, Cunningham D, Davies J, Walewski J, et al (2010) An Intergroup Randomised Trial of Rituximab Versus a Watch and Wait Strategy In Patients with Stage II, III, IV,

Asymptomatic, Non-Bulky Follicular Lymphoma (Grades 1, 2 and 3a). A Preliminary Analysis. *Blood* 116:5-5.

7. Ardeschna KM, Smith P, Norton A, Hancock BW, Hoskin PJ, MacLennan KA, Marcus RE, Jelliffe A, Hudson GV, Linch DC, and Invest BNL (2003) Long-term effect of a watch and wait policy versus immediate systemic treatment for asymptomatic advanced-stage non-Hodgkin lymphoma: a randomised controlled trial. *Lancet* 362:516-522.
8. Bachy E, Brice P, Delarue R, Brousse N, Haioun C, Le Gouill S, Delmer A, Bordessoule D, Tilly H, Corront B, et al (2010) Long-term follow-up of patients with newly diagnosed follicular lymphoma in the prirituximab era: effect of response quality on survival--A study from the groupe d'etude des lymphomes de l'adulte. *J Clin Oncol* 28:822-829.
9. Bendandi M (2008) Aiming at a curative strategy for follicular lymphoma. *CA Cancer J Clin* 58:305-317.
10. Bende RJ, Smit LA, and van Noesel CJ (2007) Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia* 21:18-29.
11. Cerhan JR (2011) Host genetics in follicular lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol* 24:121-134.
12. Chiu BC, and Weisenburger DD (2003) An update of the epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Lymphoma* 4:161-168.
13. Dave SS, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Gascoyne RD, Chan WC, Fisher RI, Braziel RM, Rimsza LM, Grogan TM, et al (2004) Prediction of survival in follicular

lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med* 351:2159-2169.

14. de Jong D, and Fest T (2011) The microenvironment in follicular lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol* 24:135-146.
15. de Jong D, Koster A, Hagenbeek A, Raemaekers J, Veldhuizen D, Heisterkamp S, de Boer JP, and van Glabbeke M (2009) Impact of the tumor microenvironment on prognosis in follicular lymphoma is dependent on specific treatment protocols. *Haematologica* 94:70-77.
16. Di Bella N, Taetle R, Kolibaba K, Boyd T, Raju R, Barrera D, Cochran EW, Dien PY, Lyons R, Schlegel PJ, et al (2010) Results of a phase 2 study of bortezomib in patients with relapsed or refractory indolent lymphoma. *Blood* 115:475-480.
17. Dutia M, Deroock I, Reed-Pease C, and Tuscano J (2011) Lenalidomide Plus Rituximab Leads to a High Rate of Durable Responses in Patients with Relapsed/Refractory Indolent Non-Hodgkin's Lymphoma. *Ann Oncol* 22:186-186.
18. Esteller M (2008) Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 358:1148-1159.
19. Fowler N, McLaughlin P, Hagemester FB, Kwak L, Fanale M, Neelapu S, Fayad L, Pro B, Sergent C, White SRS, and Samaniego F (2009) A Biologic Combination of Lenalidomide and Rituximab for Front-Line Therapy of Indolent B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood* 114:683-683.
20. Freedman A (2011) Follicular lymphoma: 2011 update on diagnosis and management. *American Journal of Hematology* 86:769-775.
21. Ganem G, Lambin P, Socie G, Girinsky T, Bosq J, Pico JL, Solal-Celigny P, and

- Cosset JM (1994) Potential role for low dose limited-field radiation therapy (2 x 2 grays) in advanced low-grade non-Hodgkin's lymphomas. *Hematol Oncol* 12:1-8.
22. Haas RL, Poortmans P, de Jong D, Aleman BM, Dewit LG, Verheij M, Hart AA, van Oers MH, van der Hulst M, Baars JW, and Bartelink H (2003) High response rates and lasting remissions after low-dose involved field radiotherapy in indolent lymphomas. *J Clin Oncol* 21:2474-2480.
23. Hainsworth JD, Litchy S, Shaffer DW, Lackey VL, Grimaldi M, and Greco EA (2005) Maximizing therapeutic benefit of rituximab: Maintenance therapy versus re-treatment at progression in patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma - A randomized phase II trial of the minnie pearl cancer research network. *Journal of Clinical Oncology* 23:1088-1095.
24. Hayashi D, Lee JC, Devenney-Cakir B, Zaim S, Ounadjela S, Solal-Celigny P, Juweid M, and Guermazi A (2010) Follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Radiol* 65:408-420.
25. Herishanu Y & Polliack A (2005). Chronic lymphocytic leukemia: A review of some new aspects of the biology, factors influencing prognosis and therapeutic options. *Transfusion and Apheresis Science*; 32: 85-97.
26. Herman, J. G. & Baylin, S. B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoterhypermethylation. *N Engl J Med*. 349(21): 2042-54.
27. Hitz F, Ketterer N, Lohri A, Mey U, Pederiva S, Renner C, Taverna C, Hartmann A, Yeow K, Bodis S, and Zucca E (2011) Diagnosis and treatment of follicular lymphoma. *Swiss Med Wkly* 141.

28. Hofman MS, and Hicks RJ (2011) Imaging in follicular NHL. *Best Pract Res Clin Haematol* 24:165-177.
29. Hoppe RT (2011) Treatment strategies in limited stage follicular NHL. *Best Pract Res Clin Haematol* 24:179-186.
30. Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M, et al. (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006*, National Cancer Institute, Bethesda, MD, seer.cancer.gov/1975_2006/, 2009.
31. Horning SJ (1993) Natural-History of and Therapy for the Indolent Non-Hodgkins-Lymphomas. *Semin Oncol* 20:75-88.
32. Irish JM, Myklebust JH, Alizadeh AA, Houot R, Sharman JP, Czerwinski DK, Nolan GP, and Levy R (2010) B-cell signaling networks reveal a negative prognostic human lymphoma cell subset that emerges during tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:12747-12754.
33. Kahl BS, Bartlett NL, Leonard JP, Chen L, Ganjoo K, Williams ME, Czuczman MS, Robinson KS, Joyce R, van der Jagt RH, and Cheson BD (2010) Bendamustine Is Effective Therapy in Patients With Rituximab-Refractory, Indolent B-cell Non-Hodgkin Lymphoma Results From a Multicenter Study. *Cancer* 116:106-114.
34. Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM (1999), *Wintrobe's Clinical Hematology* (Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM eds), pp2447-2511.
35. Leich E, Ott G, and Rosenwald A (2011) Pathology, pathogenesis and molecular genetics of follicular NHL. *Best Pract Res Clin Haematol* 24:95-109.
36. Martinez A, Carreras J, and Campo E (2008) The follicular lymphoma

- microenvironment: From tumor cell to host immunity. *Curr Hematol Malig Rep* 3:179-186.
37. Martin-Subero JI, Ammerpohl O, Bibikova M, Wickham-Garcia E, Agirre X, Alvarez S, Bruggemann M, Bug S, Calasanz MJ, Deckert M, et al (2009) A comprehensive microarray-based DNA methylation study of 367 hematological neoplasms. *PLoS One* 4:e6986.
38. McNamara C, Davies J, Dyer M, Hoskin P, Illidge T, Lyttelton M, Marcus R, Montoto S, Ramsay A, Wong WL, and Ardeshtna K (2012) Guidelines on the investigation and management of follicular lymphoma. *Br J Haematol* 156:446-467.
39. Morschhauser F, Radford J, Van Hoof A, Vitolo U, Soubeyran P, Tilly H, Huijgens PC, Kolstad A, d'Amore F, Gonzalez Diaz M, et al (2008) Phase III trial of consolidation therapy with yttrium-90-ibritumomab tiuxetan compared with no additional therapy after first remission in advanced follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 26:5156-5164.
40. Natkunam Y (2007) The biology of the germinal center. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 210-215.
41. O'Riain C, O'Shea DM, Yang Y, Le Dieu R, Gribben JG, Summers K, Yeboah-Afari J, Bhaw-Rosun L, Fleischmann C, Mein CA, et al (2009) Array-based DNA methylation profiling in follicular lymphoma. *Leukemia* 23:1858-1866.
42. Ott G, and Rosenwald A (2008) Molecular pathogenesis of follicular lymphoma. *Haematologica* 93:1773-1776.
43. Pro B, Leber B, Smith M, Fayad L, Romaguera J, Hagemester F, Rodriguez A,

- McLaughlin P, Samaniego F, Zwiebel J, et al (2008) Phase II multicenter study of oblimersen sodium, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with rituximab in patients with recurrent B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Brit J Haematol* 143:355-360.
44. Relander T, Johnson NA, Farinha P, Connors JM, Sehn LH, and Gascoyne RD (2010) Prognostic factors in follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 28:2902-2913.
45. Roehle A, Hoefig KP, Repsilber D, Thorns C, Ziepert M, Wesche KO, Thiere M, Loeffler M, Klapper W, Pfreundschuh M, et al (2008) MicroRNA signatures characterize diffuse large B-cell lymphomas and follicular lymphomas. *Br J Haematol* 142:732-744.
46. Rohatiner AZ, Nadler L, Davies AJ, Apostolidis J, Neuberg D, Matthews J, Gribben JG, Mauch PM, Lister TA, and Freedman AS (2007) Myeloablative therapy with autologous bone marrow transplantation for follicular lymphoma at the time of second or subsequent remission: long-term follow-up. *J Clin Oncol* 25:2554-2559.
47. Rohatiner AZS, Gregory WM, Peterson B, Borden E, Solal-Celigny P, Hagenbeek A, Fisher RI, Unterhalt M, Arranz R, Chisesi T, et al (2005) Meta-analysis to evaluate the role of interferon in follicular lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 23:2215-2223.
48. Rummel MJ, Niederle N, Maschmeyer G, Banat A, von Gruenhagen U, Losem C, Heil G, Welslau M, Balser C, Kaiser U, et al (2009) Bendamustine Plus Rituximab Is Superior in Respect of Progression Free Survival and CR Rate When Compared to CHOP Plus Rituximab as First-Line Treatment of Patients with Advanced Follicular, Indolent, and Mantle Cell Lymphomas: Final Results of a Randomized Phase III Study of the StiL (Study Group Indolent Lymphomas, Germany). *Blood* 114:168-169.

49. Sakamaki I, Qin H, and Kwak LW (2011) Translational development of vaccination strategies in follicular NHL. *Best Pract Res Clin Haematol* 24:295-304.
50. Salles G, Seymour JF, and Offner F (2011) Rituximab maintenance for 2 years in patients with high tumour burden follicular lymphoma responding to rituximab plus chemotherapy (PRIMA): a phase 3, randomised controlled trial (vol 377, pg 42, 2011). *Lancet* 377:1154-1154.
51. Salles GA (2007) Clinical features, prognosis and treatment of follicular lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 216-225.
52. Seymour JF, Pro B, Fuller LM, Manning JT, Hagemester FB, Romaguera J, Rodriguez MA, Ha CS, Smith TL, Ayala A, et al (2003) Long-term follow-up of a prospective study of combined modality therapy for stage I-II indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 21:2115-2122.
53. Taverna CJ, Bassi S, Hitz F, Mingrone W, Pabst T, Cevreska L, del Giglio A, Vorobiof DA, Simcock M, and Ghielmini M (2010) Rituximab Maintenance Treatment for a Maximum of 5 Years In Follicular Lymphoma: Safety Analysis of the Randomized Phase III Trial SAKK 35/03. *Blood* 116:752-753.
54. Tucci E, Liso A, Piris M, and Falini B (2006) Evolving concepts in the pathogenesis of hairy-cell leukaemia. *Nat Rev Cancer* 6:437-448.
55. van Besien K, Schouten H (2007) Follicular lymphoma: a historical overview. *Leuk lymphoma* 48:232-243.
56. van Oers MH (2007) Rituximab maintenance therapy: a step forward in follicular lymphoma. *Haematologica* 92:826-833.

57. van Oers MH, and Kersten MJ (2011) Treatment strategies in advanced stage follicular lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol* 24:187-201.
58. Vidal L, Gafter-Gvili A, Leibovici L, Dreyling M, Ghielmini M, Schmitz SFH, Cohen A, and Shpilberg O (2009) Rituximab Maintenance for the Treatment of Patients With Follicular Lymphoma: Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Trials. *J Natl Cancer I* 101:248-255.
59. Wirth A, Foo M, Seymour JF, Macmanus MP, and Hicks RJ (2008) Impact of [18f] fluorodeoxyglucose positron emission tomography on staging and management of early-stage follicular non-hodgkin lymphoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 71:213-219.
60. Wu L, Adams M, Carter T, Chen R, Muller G, Stirling D, Schafer P, and Bartlett JB (2008) lenalidomide enhances natural killer cell and monocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab-treated CD20+ tumor cells. *Clin Cancer Res* 14:4650-4657.
61. Yoo, C. B. & Jones, P. A. (2006). Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 5(1): 37-50.
62. Zelenetz AD, Abramson JS, Advani RH, Andreadis CB, Bartlett N, Bellam N, Byrd JC, Czuczman MS, Fayad LE, Glenn MJ, et al (2011) Non-Hodgkin's Lymphomas. *J Natl Compr Canc Ne* 9:484-560.
63. Zhang L, Qian Z, Cai Z, Sun L, Wang H, Bartlett JB, Yi Q, and Wang M (2009) Synergistic antitumor effects of lenalidomide and rituximab on mantle cell lymphoma in vitro and in vivo. *Am J Hematol* 84:553-559.

