



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**

SARA MARGARIDA VALENTE FIGUEIRA

LINFOMAS NÃO-HODGKIN AGRESSIVOS

**ARTIGO REVISÃO
ÁREA CIENTÍFICA DE HEMATOLOGIA**

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:
PROFESSORA DOUTORA ANA BELA SARMENTO RIBEIRO**

MARÇO 2012

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	- v -
RESUMO	- ix -
ABSTRACT	- xi -
1. INTRODUÇÃO	13
2. PATOGÉNESE DOS LINFOMAS AGRESSIVOS	21
2.1. Diferenciação normal das células B	21
2.2. Linfomagéne	27
2.3. Sinalização celular e linfomagéne	32
3. CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DOS DIFERENTES SUBTIPOS DE LINFOMAS AGRESSIVOS	34
3.1. LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B	34
3.1.1. Definição e origem	34
3.1.2. Características clínicas	37
3.1.3. Características morfológicas	37
3.1.4. Subtipos moleculares	39
3.1.5. Variantes clinicopatológicas	47
3.1.6. Prognóstico	51
3.2. LINFOMA DE BURKITT	53
3.2.1. Definição e origem	53
3.2.2. Epidemiologia	53
3.2.3. Etiologia	54
3.2.4. Características clínicas	56
3.2.5. Características e patogéne molecular	58

3.2.6. Prognóstico	62
3.3. LINFOMA DE CÉLULAS B, INCLASSIFICÁVEL, COM CARACTERÍSTICAS INTERMÉDIAS ENTRE O LDGC-B E O LB	63
3.3.1. Definição e origem	63
3.3.2. Patogénese molecular e diagnóstico	63
3.3.3. Prognóstico	66
3.4. LINFOMA LINFOBLÁSTICO DE CÉLULAS B PRECURSORAS	66
3.4.1. Definição e origem	66
3.4.2. Epidemiologia e características clínicas	67
3.4.3. Características laboratoriais e patogénese molecular	67
3.4.4. Diagnóstico diferencial	69
3.5. LINFOMA DE CÉLULAS DO MANTO	71
3.5.1. Definição e origem	71
3.5.2. Características clínicas, laboratoriais e patogénese molecular	71
3.5.3. Prognóstico e diagnóstico diferencial	74
3.6. LINFOMA DE GRANDE CÉLULAS ANAPLÁSICO	76
3.6.1. Definição e origem	76
3.6.2. Epidemiologia	76
3.6.3. Características clínicas	77
3.6.4. Características laboratoriais e patogénese molecular	77
3.6.5. Prognóstico	79
4. TRATAMENTO DOS LINFOMAS AGRESSIVOS	80
5. CONCLUSÃO	82
6. BIBLIOGRAFIA	84

LISTA DE ABREVIATURAS

A20 - Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Protein 3 or TNFAIP3 gene

ABC - activated B cell-like

ADN – ácido desoxirribonucleico

ALK - Anaplastic lymphoma kinase

ATM – ataxia telangiectasia gene

BCL1 – B-cell leukemia and lymphoma 1 gene

BCL11A - B-cell leukemia and lymphoma 11a gene

BCL2 - B-cell leukemia and lymphoma 2 gene

BCL-2 - B-cell leukemia and lymphoma 2 protein

BCL-6 - B-cell leukemia and lymphoma 6 protein

BCL6 - B-cell leukemia and lymphoma 6 gene

BCR – *B-cell receptor*; Receptor de células B

B-UNC – linfoma de células B inclassificável

CCND1 – gene ciclina D1

CD – *cluster differentiation*

CG – centro germinativo

CHOP - ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona

C-MYC – celular myelocytomatosis oncogene

CODOX-M/IVAC - ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, metotrexato/ifosfamida, etoposideo e citarabina

EBER - Epstein-Barr virus–encoded small RNA

EBNA1 - Epstein-Barr nuclear antigen 1

EBV - Epstein Barr virus

FISH - *fluorescent in situ hybridization*

GAPs - proteínas activadoras de GTPase

GCB - *Germinal Center B-Cell like DLBCL*

GDP - guanosina difosfato

GEFs - factores de troca de nucleótidos de guanina

GTP - guanosina trifosfato

HSC - *hematopoietic stem cells*

HTLV-1 - *Human t-lymphotropic virus type 1*

HVH8 – Herpes virus Humano tipo 8

Hyper-CVAD - ciclofosfamida hiperfraccionada, vincristina, doxorubicina e dexametasona

Ig – Imunoglobulina

IgH – cadeia pesada da Imunoglobulina

IgL – cadeia leve da Imunoglobulina

IL – Interleucina

ING - inhibitor of growth gene

IPI – internacional prognosis index

IRF4/MUM1 - Interferon Regulatory Factor 4/ Multiple myeloma oncogene 1 gene

IRF4/MUM1 - Interferon Regulatory Factor 4/ Multiple myeloma oncogene 1 protein

ITAM - Immunoreceptor tyrosine-based activation motif

JAK/STAT - cinase Janus/transdutores de sinais e activadores da transcrição

LCM – linfoma de células do Manto

LCR – líquido cefalorraquídeo

LDGC-B – linfoma difuso de grandes células B

LDH – lactato desidrogenase

LEZM – linfoma esplénico da zona Marginal

LF – linfoma folicular

LGCA – linfoma de grandes células anaplásico

LH – linfoma de Hodgkin

LLA – leucemia linfoblástica aguda

LL-B – linfoma linfoblástico de células B precursoras

LLC – leucemia linfocítica crónica

LLP – linfoma linfoplasmocítico

LMP - *latent membrane protein*

LNH – linfoma não-Hodgkin

LPL – leucemia pró-linfocítica

MACOP-B - metotrexato, adriamicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona, bleomicina

MALT - *mucosa associated lymphoid tissue*

MAPK - *Mitogen-activated protein kinases*

MM – mieloma múltiplo

MO – medula óssea

mRNA- ácido ribonucleico mensageiro

NF- κ B - *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NK – *natural killer*

NPM1 - nucleophosmine (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin) gene

OMS – Organização Mundial de Saúde

P. falciparum – Plasmodium falciparum

p53 – *protein 53*

PET - *positron emission tomography*

PfEMP1 - proteína-1 da membrana do eritrócito

PMCL - *primary mediastinal B-cell lymphoma*; linfoma primário do mediastino de grandes células B

PTEN - phosphatase and tensin homolog gene

R-CHOP – Rituximab - ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona

REAL - Revised American European Lymphoma classification

RM – ressonância magnética

ROS - *reactive oxygen species*; espécies reativas de oxigênio

RS – Reed-Sternberg

RTK - receptor tirosina-cinase

SE – sarcoma de Ewing

SNC – sistema nervoso central

TC – tomografia computadorizada

TP53 - tumor protein p53 gene

TRAF - *TNF receptor associated factors*

VHC – vírus da Hepatite C

VIH – vírus da imunodeficiência humana

XBP1 - *X-box binding protein 1*; factor de transcrição

RESUMO

Os linfomas são neoplasias resultantes da acumulação de linfócitos malignos nos gânglios linfáticos, podendo atingir o sangue (fase leucémica) ou infiltrar outros órgãos para além dos do tecido linfóide. Têm origem nas células do sistema linfóide em diferentes estádios de diferenciação. A maioria tem origem em células B e menos frequentemente em células T ou NK. Existem dois grandes subtipos principais: os linfomas Hodgkin (LH) e os linfomas não-Hodgkin (LNH).

Os LNH são os tumores hematológicos mais comuns, representando actualmente a quinta neoplasia mais frequente no mundo. Contrariamente aos LH, a sua incidência tem vindo a aumentar em todos os grupos etários, excepto em crianças.

Os conhecimentos sobre a patogénese molecular dos LNH têm aumentado significativamente nas últimas décadas tendo-se demonstrado que a imortalização celular se deve à acumulação de lesões genéticas e/ou epigenéticas, em conjunto com outros factores de risco tais como determinadas infecções, debilitação do sistema imunitário e diversos factores ambientais.

A classificação mais actual dos linfomas é da Organização Mundial de Saúde (OMS), baseada na célula de origem e nas características histológicas, morfológicas, imunofenotípicas, genéticas/moleculares e clínicas. No entanto, não engloba a forma e o comportamento relativamente à evolução clínica. Com base nestas características os LNH são subdivididos em indolentes, agressivos e altamente agressivos.

Os linfomas agressivos representam 65% do total de LNH e no geral apresentam uma evolução rápida, geralmente sintomática mas com melhor resposta à terapêutica do que os linfomas indolentes. Incluem diversas entidades histológicas, que se distribuem preferencialmente por diferentes faixas etárias e apresentam diferente comportamento clínico.

Abrangem várias entidades histológicas distintas, que incluem o linfoma difuso de grandes células B, o linfoma de Burkitt, o linfoma linfoblástico, o linfoma de células do manto e o linfoma de grandes células anaplásico, entre outros.

O avanço tecnológico das últimas décadas permitiu o estudo molecular de linfomas que apesar de histologicamente semelhantes apresentam comportamentos clínicos diferentes. Através desta análise foi possível construir modelos de prognóstico e novos alvos terapêuticos, tornando o tratamento dos LNH agressivos mais eficaz e personalizado.

Este trabalho procura fazer uma revisão sobre o actual conhecimento da caracterização molecular/biológica e clínica dos LNH agressivos e qual a sua relevância clínico-terapêutica nestas neoplasias do sistema linfóide, dando especial atenção a alguns dos subtipos mais frequentes.

Palavras chave: Linfomas, Linfomas não hodking agressivos, centro germinativo, célula B, índice de prognóstico internacional

ABSTRACT

Lymphomas result from cumulating malignant lymphocytes in the lymph nodes, that could reach the blood (leukemic phase) or infiltrate other organs beyond the lymphoid tissue. They derive from lymphoid system cells at different stages of differentiation. Most derive from B-cells and, less often, from T-cells or NK-cells. There are two major subtypes: Hodgkin (HL) and non-Hodgkin lymphomas (NHL).

NHL are the most frequent hematological malignancies, currently being the fifth world's commonest cancer. In contrast with HL, its incidence has been increasing in all age groups, except in children.

The knowledge about NHL's molecular pathogenesis have significantly increased in the last decades, concluding that cellular immortalization is due to genetic and/or epigenetic lesions, combined with other risk factors as infections, immunodeficiency and environmental factors.

World's Health Organization's (OMS) classification of lymphomas is the most current, based on cell origin and histological, morphological, immunophenotypic, genetic/molecular and clinical features. However it doesn't include clinical evolution. Based on these features, NHL are subdivided into indolent, aggressive and highly aggressive lymphomas.

The aggressive lymphomas account for 65% of all NHL and in general progress rapidly, often symptomatic but respond better to therapy than indolent lymphomas. They comprise several histological entities (diffuse large B-cell lymphoma, Burkitt's lymphoma, lymphoblastic lymphoma, mantle-cell lymphoma, anaplastic large cell lymphoma) and different clinical behavior, affecting specific age groups.

Last decades' technological advances enabled the molecular analysis of lymphomas that exhibit different clinical behaviors although histologically similar. This allowed the

definition of prognostic systems and new therapeutic targets, rendering the aggressive NHL treatment more efficient and individualized.

This paper aims to review the current knowledge about aggressive NHL molecular/biological and clinical characterization and its clinical and therapeutical relevance, giving special attention to some of the most frequent subtypes.

Keywords: Lymphomas, aggressive non-Hodgkin lymphomas, germinal center, B-cell, international prognosis index

1. INTRODUÇÃO

Os linfomas são neoplasias resultantes da acumulação de linfócitos malignos nos gânglios linfáticos, podendo atingir o sangue (fase leucêmica) ou infiltrar outros órgãos para além dos do tecido linfóide. Têm origem nas células do sistema linfóide em diferentes estádios de diferenciação. A maioria, cerca de 95%, tem origem em células B e os restantes em células T ou NK.

Existem dois grandes subtipos principais: os linfomas Hodgkin (LH) e os linfomas não-Hodgkin (LNH), separados com base na presença histológica de células de Reed-Sternberg (RS) no LH.

Os LNH são os tumores hematológicos mais comuns (Figura 1), representando actualmente a quinta neoplasia mais frequente no mundo. Contrariamente aos LH, a sua incidência tem vindo a aumentar em todos os grupos etários, excepto em crianças, a uma taxa de 2 a 8% por ano a nível global, entre 1950 e finais dos anos 90 (Longo DL, 2011).

Contudo, nos últimos anos, a taxa de aumento parece estar a diminuir, sendo que em 2010 foram diagnosticados 360 000 novos casos de LNH em todo o mundo, predominando o aumento dos LNH de alto grau e doença extranodal. (Müller A *et al* , 2005; Longo DL, 2011)

Os LNH são mais frequentes no idoso e no sexo masculino, tendo maior incidência na raça branca.

No entanto, a incidência e padrões de expressão dos LNH têm variação geográfica. Enquanto na Ásia são mais comuns os linfomas de células T bem como os linfomas mais agressivos e doença extranodal associados a infecção pelo vírus *Epstein-Barr* (EBV) e pelo vírus linfotrópico de células T humano tipo 1 (HTLV-1), nos países ocidentais são mais comuns certos subtipos de linfomas de células B, como o linfoma folicular (LF). Em África, o linfoma de Burkitt (LB) endémico representa grande parte dos LNH. (Müller A *et al.*, 2005; Patte C *et al.*, 2007).

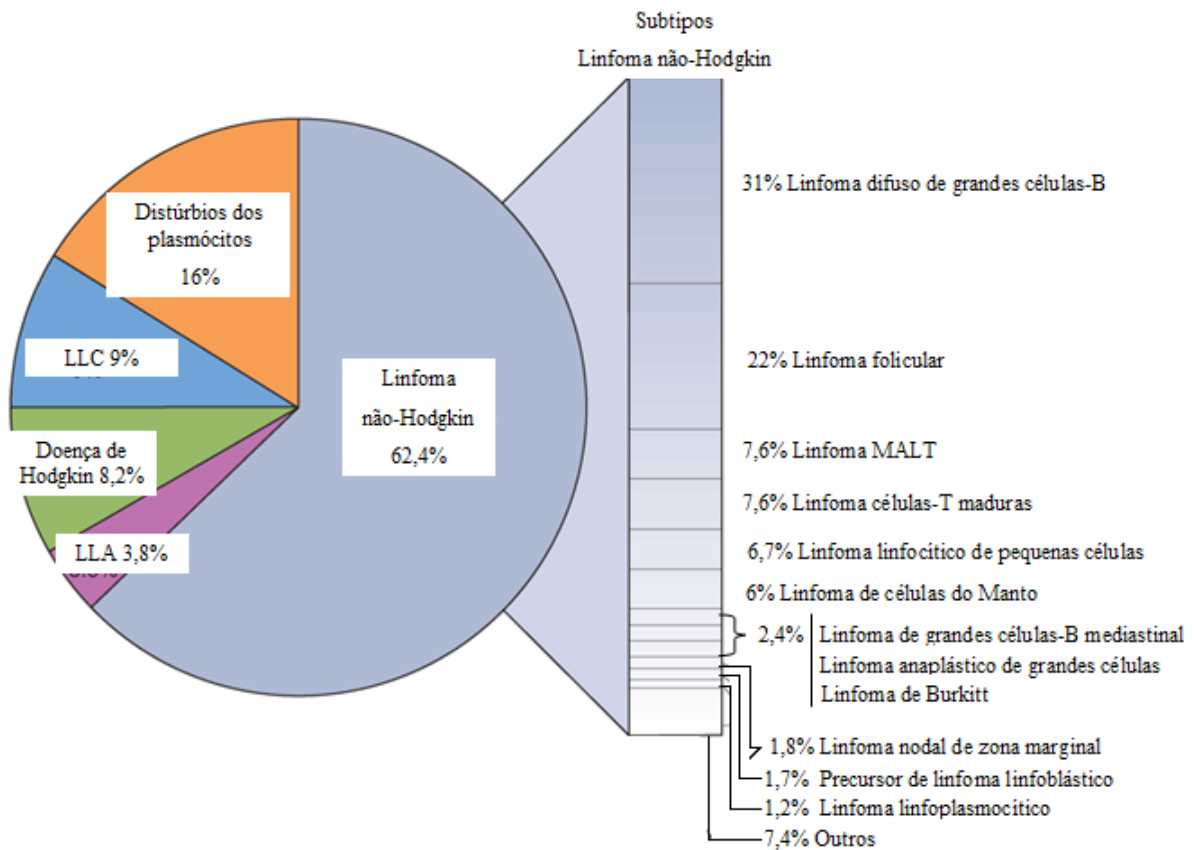


Figura 1 - Frequência relativa das neoplasias linfóides MALT – tecido linfóide associado à mucosa, LLC – leucemia linfocítica crônica, LLA – leucemia linfoblástica aguda. (Adaptado de Longo DL, 2011)

O conhecimento sobre a patogênese molecular dos LNH tem aumentado significativamente nas últimas décadas, muito em parte graças aos novos meios de diagnóstico como os microarrays de ADN, tendo-se demonstrado que a imortalização celular se deve à acumulação de lesões genéticas e/ou epigenéticas, em conjunto com outros factores de risco.

Entre esses factores de risco para desenvolver LNH estão doentes que apresentem *imunodeficiência* (primária ou secundária), como infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) (embora a introdução de terapêutica retroviral muito eficaz tenha diminuído

este risco), submetidos a transplante de órgãos e imunodeficiências hereditárias. (Longo DL, 2011)

Outros factores associados incluem factores ambientais como agentes infecciosos, doenças auto-imunes e exposição a certas substâncias químicas ou fármacos. (Longo DL, 2011)

Relativamente aos *agentes infecciosos*, além do VIH, é conhecida a associação entre a infecção pelo EBV e linfoma de Burkitt em África e a outros subtipos de LNH agressivos nos países ocidentais, sobretudo em imunocomprometidos (linfoma após transplante de órgãos, linfoma difuso primário de grandes células B do sistema nervoso central, linfoma de células T/*Natural Killer* (NK) extranodais do tipo nasal na Ásia e América do Sul, entre outros). O HTLV-1 está associado ao desenvolvimento do linfoma de células T do adulto, com incidência particularmente elevada no sul do Japão e no Caribe. Também o vírus da hepatite C (VHC) e o *Herpes* vírus humano tipo 8 (HVH8) estão associados ao desenvolvimento de neoplasias linfóides. (Longo DL, 2011). Destaca-se ainda a infecção por *Helicobacter pylori*, associada a linfoma do tecido linfóide associado à mucosa (MALT) gástrico.

A associação entre *doenças auto-imunes* como a artrite reumatóide, Síndrome de Sjögren, doença celíaca e lúpus eritematoso sistémico com os LNH tem sido frequentemente descrita. (Longo DL, 2011).

Analisando os factores ocupacionais, tem sido encontrada uma relação com a exposição a *insecticidas e pesticidas, fármacos* como a fentoína, *irradiação e quimioterapia/radioterapia anteriores*. (Longo DL, 2011).

O aumento da esperança média de vida e os melhores métodos de tratamento também contribuíram para o desaparecimento de algumas doenças e o predomínio de outras, como os LNH. Todos estes factores estão, directa ou indirectamente, envolvidos com a ocorrência dos

mesmos embora os mecanismos moleculares e genéticos da doença ainda não sejam completamente conhecidos (Müller A *et al.*, 2005).

A classificação dos LNH tem sido modificada várias vezes ao longo dos anos devido ao crescente conhecimento da sua origem e à evolução dos métodos diagnósticos (imunohistoquímica, citogenética, perfil genético, microarrays) (Patte C *et al.*, 2007).

Em 1994, foi publicada a *Revised American European Lymphoma classification* (REAL), que teve grande aplicação. A classificação mais actual dos linfomas é da Organização Mundial de Saúde (OMS), baseada na célula de origem e nas características histológicas, morfológicas, imunofenotípicas, genéticas/moleculares e clínicas (Tabelas 1 e 2). No entanto, não engloba a forma e o comportamento relativamente à evolução clínica. Com base nestas características os LNH são subdivididos em indolentes, agressivos e altamente agressivos.

Os LNH agressivos e altamente agressivos incluem várias entidades distintas. Assim, as suas características clínicas vão depender, para além das características do doente, da histologia de cada subtipo. Podemos encontrar aspectos comuns a todos eles assim como os métodos de diagnóstico também são semelhantes. (Dunleavy K *et al.*, 2009)

Tipicamente estes linfomas apresentam-se com uma ou várias adenopatias, que pode(m) ser assintomática(s) ou causar sintomas por compressão de outros órgãos. Certos subtipos histológicos associam-se a características particulares, como é o caso do envolvimento ileocecal no LB ou da polipose linfomatóide no linfoma de células do manto (LCM). (Dunleavy K *et al.*, 2009)

Podem estar presentes *sintomas B*, resultantes da produção de moléculas inflamatórias, citocinas e quimiocinas pelo linfoma, que incluem perda de peso inexplicada superior a 10% do peso corporal em 6 meses, febre superior a 38°C e suores nocturnos (Dunleavy K *et al.*, 2009)

Em alguns casos há envolvimento do anel de Waldeyer, na orofaringe, podendo causar odinofagia ou obstrução com respiração ruidosa. É comum a presença de hepatoesplenomegalia e envolvimento de gânglios linfáticos retroperitoneais e mesentéricos.

O envolvimento extranodal é mais frequente no trato gastrointestinal. Já o envolvimento da medula óssea (MO) é menos comum, quando comparado com os linfomas indolentes (Hoffbrand A.V. *et al.*, 2008)

Tabela 1 | Classificação da OMS para neoplasias dos tecidos linfóide e hematopoiético

<u>Neoplasias de células linfóides B</u>	<u>Neoplasia de células linfóides T e NK</u>
<ul style="list-style-type: none"> • Neoplasias de células B precursoras <ul style="list-style-type: none"> - Linfoma/leucemia linfoblástica de precursor B • Neoplasias de células B maduras <ul style="list-style-type: none"> - Leucemia linfocítica crônica/linfoma linfocítico - Leucemia prolinfocítica B - Linfoma linfoplasmocítico - Linfoma da zona marginal esplênica - Tricoleucemia - Mieloma múltiplo - Plasmocitoma ósseo - Plasmocitoma extra-ósseo 	<ul style="list-style-type: none"> • Neoplasias de células T precursoras <ul style="list-style-type: none"> - Linfoma/leucemia linfoblástica de precursor T - Linfoma de células NK blásticas • Neoplasias de células T e NK maduras <ul style="list-style-type: none"> - Leucemia prolinfocítica T - Leucemia linfocítica de grandes células T granulares - Leucemia agressiva de células NK - Leucemia/linfoma de células T do adulto (HTLV1 +) - Linfoma de células NK/T extranodal, do tipo nasal - Linfoma de células T do tipo enteropatia - Linfoma de células T hepatoesplênico - Linfoma cutâneo de células T, do tipo paniculite subcutânea - Micose fungóide - Síndrome de Sézary - Linfoma cutâneo primário de grandes células anaplásicas - Linfoma de células T periféricas não-especificado - Linfoma de células T angioimunoblástico - Linfoma de grandes células anaplásicas • Proliferações de células T de potencial maligno incerto <ul style="list-style-type: none"> - Papulose linfomatóide
<ul style="list-style-type: none"> - Linfoma da zona marginal extralinfonodal do tecido linfóide associado à mucosa (linfoma Malt) - Linfoma da zona marginal linfonodal - Linfoma folicular - Linfoma de células do manto - Linfoma difuso de grandes células B - Linfoma de grandes células B mediastinal (tímico) - Linfoma de grandes células B intravascular - Linfoma primário de efusões - Linfoma/leucemia de Burkitt • Proliferações de células B de potencial maligno incerto <ul style="list-style-type: none"> - Granulomatose linfomatóide - Doença linfoproliferativa pós-transplante 	<p>Linfoma de Hodgkin</p> <ul style="list-style-type: none"> • Linfoma de Hodgkin, predominância linfocítica nodular • Linfoma de Hodgkin clássico <ul style="list-style-type: none"> - Linfoma de Hodgkin clássico, esclerose nodular - Linfoma de Hodgkin clássico, rico em linfócitos - Linfoma de Hodgkin clássico, celularidade mista - Linfoma de Hodgkin clássico, depleção linfocítica

(Adaptado de Paes R *et al.*, 2002)

Tabela 2 | Classificação das neoplasias linfoides de células maduras (OMS, 2008)

Neoplasias de células B	Neoplasias de células T e NK
<p>Leucemia linfocítica crónica / linfoma linfocítico de pequenas células</p> <p>Leucemia prolinfocítica B</p> <p>Linfoma da zona marginal esplénica</p> <p>Leucemia de células cabeludas</p> <p>Linfoma/leucemia esplénico, não classificável</p> <p>Linfoma linfoplasmocítico</p> <p>Doenças de cadeias pesadas</p> <p>Neoplasias de plasmócitos</p> <p>Linfoma da zona marginal extranodal do tecido linfóide associado à mucosa (linfoma MALT)</p> <p>Linfoma da zona marginal nodal</p> <p>Linfoma folicular</p> <p>Linfoma cutâneo primário do centro folicular</p> <p>Linfoma de células do manto</p> <p>Linfoma difuso de grandes células B (LDGC-B), não especificado</p> <p>Linfoma de grandes células B rico em células T/histiócitos</p> <p>LDGC-B primário do SNC</p> <p>LDGC-B cutâneo primário na perna</p> <p>LDGC-B EBV-positivo no idoso</p> <p>LDGC-B associado a inflamação crónica</p> <p>Granulomatose linfomatóide</p> <p>Linfoma primário do mediastino (tímico) de grandes células B</p> <p>LDGC-B intravascular</p> <p>LDGC-B ALK-positivo</p> <p>Linfoma plasmoblástico</p> <p>Linfoma de grandes células B surgindo na doença de Castleman multicêntrica associada a infecção pelo HVH-8</p> <p>Linfoma efusional primário</p> <p>Linfoma de Burkitt</p> <p>Linfoma de células B, inclassificável, com características intermédias entre o LDGC-B e o LB</p> <p>Linfoma de células B, inclassificável, com características intermédias entre o LDGC-B e o linfoma de Hodgkin clássico</p>	<p>Leucemia prolinfocítica de células T</p> <p>Leucemia linfocítica de grandes células T granulares</p> <p>Doenças linfoproliferativas crónicas de células NK</p> <p>Leucemia agressiva de células NK</p> <p>Doenças linfoproliferativas de células T EBV-positivas na criança</p> <p>Leucemia / linfoma de células T do adulto</p> <p>Linfoma de células NK/T extranodal, do tipo nasal</p> <p>Linfoma de células T associado a enteropatia</p> <p>Linfoma de células T hepatoesplénico</p> <p>Linfoma de células T do tipo paniculite subcutânea</p> <p>Micose fungóide</p> <p>Síndrome de Sézari</p> <p>Doenças linfoproliferativas cutâneas primárias de células T CD30-positivas</p> <p>Linfomas cutâneos primários de células T gamma-delta</p> <p>Linfoma de células T periféricas, não especificado</p> <p>Linfoma de células T angioimunoblástico</p> <p>Linfoma de grandes células anaplásicas, ALK positivo</p> <p>Linfoma de grandes células anaplásicas, ALK negativo</p>

(Adaptado de Swerdlow SH *et al.*, 2008)

A investigação diagnóstica, para além de uma história e exame físico cuidados, deve incluir exames laboratoriais como: (Hoffbrand A.V. *et al.*, 2008)

- Hemograma completo com fórmula leucocitária: é comum existir anemia normocítica normocrómica ou, menos frequentemente, anemia hemolítica auto-imune e, em casos mais avançados, com envolvimento difuso da MO, neutropenia com aumento da susceptibilidade a infecções e trombocitopenia com púrpura.

- Bioquímica sérica: a lactato desidrogenase (LDH) aumenta em casos de doença rapidamente proliferativa e extensa e este aumento tem implicações prognósticas em certos subtipos de linfomas.

- Electroforese de proteínas plasmáticas: presença eventual de paraproteínas.

- Testes serológicos para vírus: VIH, VHC, HTLV-1, EBV.

Contudo, a investigação definitiva consiste na biopsia da adenopatia para diagnóstico histológico, complementada por análises imunofenotípicas e genéticas, imperativo para a determinação do tratamento e prognóstico.

O estadiamento da doença é muito importante e inclui radiografia do tórax, tomografia computadorizada (TC) torácica, abdominal e pélvica e, eventualmente ressonância magnética (RM). A *positron emission tomography* (PET) é muito útil, tanto no estadiamento como posteriormente para avaliar a resposta ao tratamento. (Dunleavy K *et al.*, 2009)

O estadiamento dos linfomas agressivos é feito de acordo com o sistema de estadiamento Ann Arbor (revisão Costwold) (Tabela 3), originalmente descrito para o LH. (Hoffbrand A.V. *et al.*, 2008; Dunleavy K *et al.*, 2009).

Todos os doentes devem efectuar biopsia da MO e os que apresentem tipos histológicos de linfoma associados a maior risco de envolvimento do sistema nervoso central (SNC), como LB ou doença extranodal do linfoma difuso de grandes células B (LDGC-B),

devem efectuar punção lombar para avaliação do líquido cefalorraquídeo (LCR). (Dunleavy K et al., 2009)

Para avaliar o prognóstico dos doentes foi desenvolvido, em 1993, o Índice de Prognóstico Internacional (*International Prognosis Index – IPI*) para os linfomas agressivos, baseado na idade, estado geral, LDH sérica, número de locais extraganglionares envolvidos e estadiamento de Ann Arbor (Tabelas 4A e B) (Ekström-Smedby K, 2006).

Nas últimas décadas, o avanço tecnológico permitiu o estudo molecular de linfomas que apesar de histologicamente semelhantes apresentam comportamentos clínicos diferentes. Através desta análise foi possível construir modelos de prognóstico e novos alvos terapêuticos, tornando o tratamento dos LNH agressivos mais eficaz e personalizado.

Tabela 3 | Sistema de estadiamento Ann Arbor para linfomas não-Hodgkin

ESTÁDIO	CARACTERÍSTICAS
I	Foco localizado de doença ganglionar (I/N) ou extraganglionar (I/E)
II	Doença no mesmo lado do diafragma ≥ 2 focos ganglionares (II/N) ou extraganglionares (II/E) ≥ 1 região ganglionar + ≥ 1 foco extraganglionar (II/N/E)
III	Doença nos dois lados do diafragma ≥ 2 focos ganglionares (III/N) ou extraganglionares (III/E) ≥ 1 região ganglionar + ≥ 1 foco extraganglionar (III/N/E)
IV	Doença disseminada nos órgãos extralinfáticos, envolvimento do fígado ou da medula óssea, com ou sem envolvimento ganglionar (IV/N/E)
A	Sem sintomas sistémicos
B	Com sintomas sistémicos: febre superior a 38°C e suores nocturnos no mês anterior, perda de peso inexplicada superior a 10% do peso corporal em 6 meses,
N	Doença nodal/ganglionar
E	Doença de tecido extranodal excluindo o fígado e medula óssea
X	Envolvimento de mais de 1/3 mediastino e/ou tamanho da massa tumoral > 10 cm

(Adaptado de Gil C *et al.*, 2006; Hofbrand, 2011)

Tabela 4A | Factores de prognóstico

Características	Parâmetros		Pontuação dos parâmetros de mau prognóstico
	Bom	Mau	
Idade	<60 anos	>60 anos	1
Estado geral	0 ou 1	>2	1
Estádio	I ou II	III ou IV	1
Número de locais extraganglionares envolvidos	0 ou 1	>2	1
LDH sérica	Normal	Aumentada	1

(Adaptado de Zelenetz A D., 2011; Hofbrand, 2011)

Tabela 4B | Índice de Prognóstico Internacional (IPI)

Score IPI (todos os doentes)	Grupo de risco	Sobrevivência aos 5 anos (%)
0, 1	Baixo	73
2	Intermédio baixo	51
3	Intermédio alto	43
4, 5	alto	26

(Adaptado de Dunleavy K *et al.*, 2009; Zelenetz A D., 2011)

2. PATOGÉNESE DOS LINFOMAS AGRESSIVOS

2.1. Diferenciação normal das células B

A produção de células B inicia-se ainda antes do nascimento no saco vitelino, fígado fetal e medula óssea fetal. Após o nascimento torna-se exclusiva da MO, onde o processo de desenvolvimento a partir de células estaminais hematopoiéticas (HSC) passa por vários

estádios e é independente de estimulação antigénica. A *célula pró-B (pré pré B)* é o primeiro progenitor da série linfóide (Figura 2) e inicia uma remodelação dos genes das cadeias pesadas (IgH) e leves (IgL: Igκ e Igλ) das imunoglobulinas (Igs) a nível da região variável, denominado processo de recombinação VDJ (Figura 3), cujo resultado final é a aquisição de um receptor de superfície de antigénio (BCR) funcional e não auto-reactivo. (Kuby *et al.*, 2002; Küppers R, 2005).

Terminado o rearranjo das cadeias pesadas das Igs, a célula encontra-se no estágio de *célula pré-B*. É necessário o rearranjo das cadeias leves para que se desenvolvam as *células B imaturas*, que se diferenciam em *células B maduras (virgens ou naives)*. Estas expressam IgM e IgD na sua superfície, apresentando uma especificidade antigénica particular. Estas células saem da medula óssea e, circulando através do sangue e da linfa, são transportadas para órgãos linfóides periféricos como o baço, gânglios linfáticos (foliculos primários e zona do manto) e MALT, constituindo as *células B recirculantes* (Figura 2). (Kuby *et al.*, 2002).

Os tumores com origem nestas células são normalmente de baixo grau/indolentes, atingem o sangue (fase leucémica) e são normalmente CD5+. Duas neoplasias correspondem a estas características, a leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico de pequenas células (LLC/SLL) e o linfoma do manto (LM), embora este último com um percurso mais agressivo (Figura 2) (Jaffe ES *et al.*, 2008).

Quando as células B virgens encontram um antigénio movem-se para a zona de células T dos tecidos linfóides (paracórtex dos gânglios linfáticos) onde se transformam em blastos, proliferam e se diferenciam em plasmócitos produtores de anticorpos IgG (tempo de vida curto) ou em células B de memória (Figura 2). (Harris NL *et al.*, 2001; Lopes A, 2009; Hoffbrand AV *et al.*, 2011).

As células blásticas migram para o centro de um folículo primário, onde proliferam e se diferenciam em centroblastos, formando o centro germinativo (Lopes A, 2009). Os

centroblastos são células grandes com núcleo vesicular, um a três nucléolos periféricos e citoplasma basófilo. Muitos perdem expressão de Igs e de *BCL-2*, logo, são susceptíveis à apoptose. Os centroblastos expressam *BCL-6* (tal como os centrócitos) e CD10 (Harris NL *et al.*, 2001; Jaffe ES *et al.*, 2008). A partir dos centroblastos originam-se linfomas mais agressivos, com maior capacidade proliferativa, como o LDGC-B e linfoma de Burkitt (Figura 2) (Harris NL *et al.*, 2001; Jaffe ES *et al.*, 2008; Lopes A, 2009).

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, em que estas células resistem à apoptose devido a serem portadores de uma translocação, a t(14;18), responsável pelo aumento da expressão de *BCL-2* (figura 2). (Harris NL *et al.*, 2001)

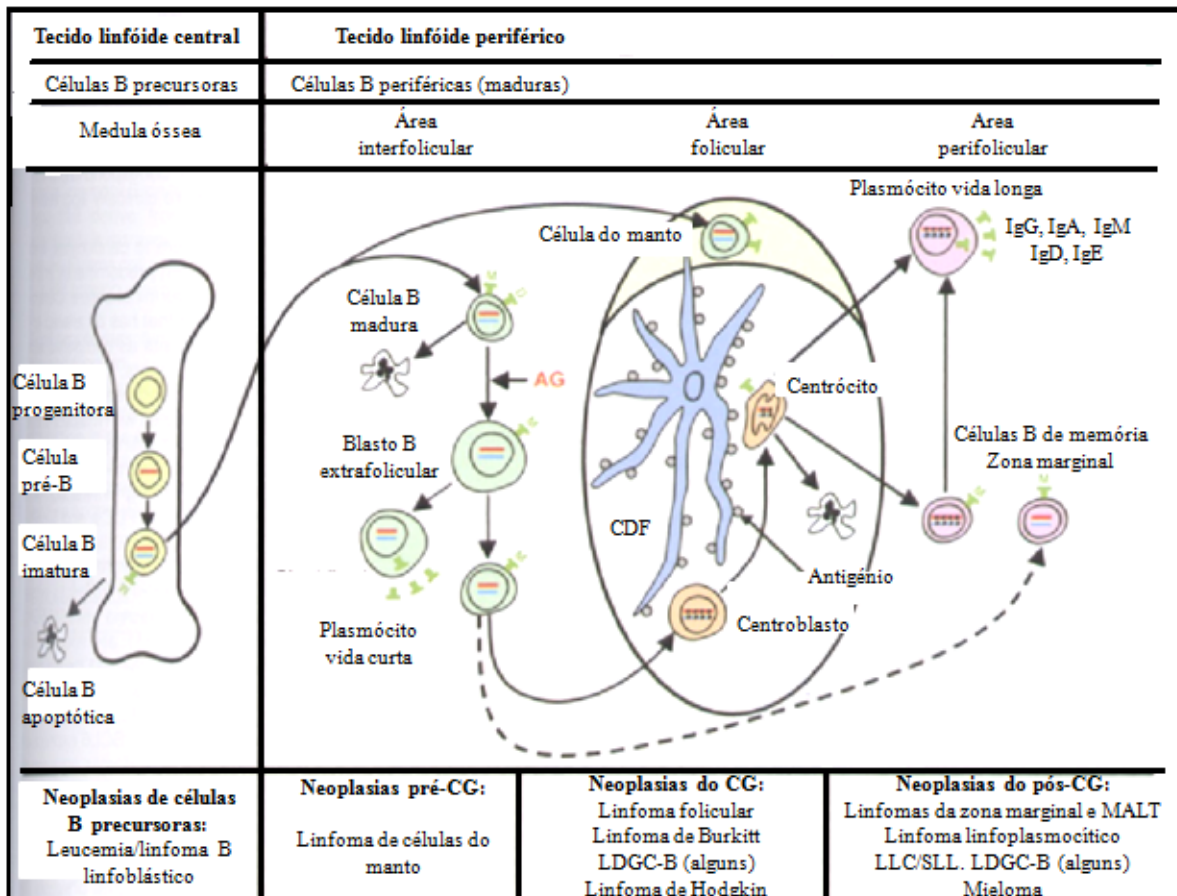


Figura 2 – Esquema representativo da diferenciação da célula B e sua relação com neoplasias de célula B. AG – antígeno, LDGC-B – linfoma difuso de grandes células B, MALT – tecido linfóide associado à mucosa, LLC - leucemia linfoblástica crônica, SLL- linfoma linfocítico de pequenas células, CDF - células dendríticas foliculares, CG – centro germinativo, Ig – imunoglobulina. (Adaptado de Jaffe ES *et al.*, 2008).

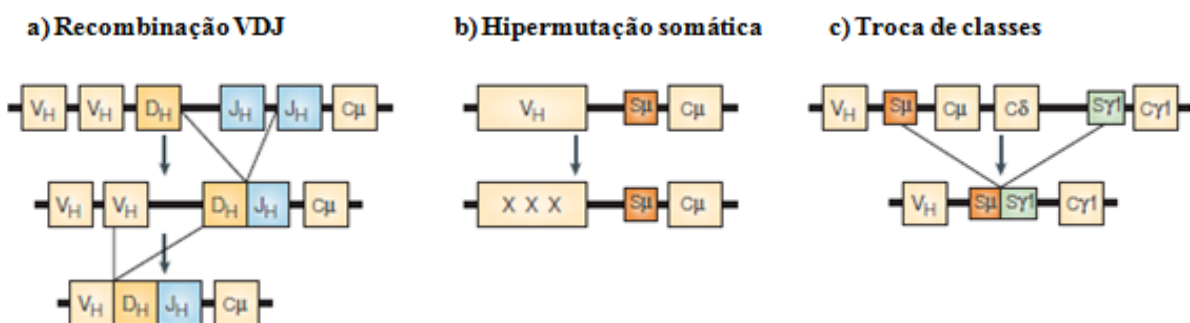


Figura 3 - Processos moleculares com remodelação dos genes da imunoglobulina. As imunoglobulinas (Igs) são expressas pelas células B e são constituídas por regiões variáveis

(V), que interagem com o antigénio, e regiões constantes (C), que medeiam as funções efectoras das Igs. Para produzir uma Ig funcional, nas células B ocorre um rearranjo dos segmentos de ADN que codificam as cadeias pesadas (H) e leves (L) da região variável. | Em **a**) está representado o processo denominado “recombinação V(D)J”, em que se reúnem 3 segmentos de genes – VH, DH e JH – para codificar a região variável da cadeia pesada. As regiões V das cadeias leves κ e λ são codificadas por 2 segmentos de genes – VL e JL. As células B precursoras iniciam rearranjo Dh-Jh nos genes da cadeia pesada, seguindo-se rearranjo Vh-DhJh o que resulta na expressão de um receptor na célula pré-B. É possível originar um enorme repertório de anticorpos já que a cadeia pesada da Ig contém cerca de 50 segmentos Vh, 27 segmentos Dh e 6 segmentos Jh. A cadeia leve também possui numerosos segmentos V e J. Esta diversidade é ainda aumentada pela adição ou remoção de nucleótidos nas regiões recombinantes. As células procedem depois ao rearranjo dos genes das cadeias leves. Por fim a região-V do gene da Ig é conectada com a região-C ($C\mu$ da IgM no diagrama). Em **b**), o processo de hipermutação somática é activado quando as células B atingem o centro germinativo (CG). Este processo leva à introdução de mutações pontuais, deleções ou duplicações na região-V dos genes da Ig que havia sofrido rearranjo (“Xs” na figura). Estas mutações ocorrem na região-V dos genes da Ig. Em **c**) observa-se a troca de classes que resulta na substituição do gene da região-C da cadeia-H originalmente expresso por outro gene Ig. No diagrama, a região-C da IgM ($C\mu$) e IgD ($C\delta$) são trocadas pela região-C da IgG ($C\gamma 1$) por recombinação nas regiões de troca desses genes ($S\mu$ e $S\gamma 1$, respectivamente). Isto resulta num anticorpo com diferentes funções efectoras mas com o mesmo domínio de ligação ao antigénio. (Adaptado de Küppers R, 2005).

Nos folículos secundários dos órgãos linfóides identificam-se pelo menos três zonas, a zona do manto, a zona clara e a zona escura (Figura 4).

Zona do Manto: após rearranjo bem sucedido dos genes da Ig, as células B maduras não expostas ainda a um antigénio, permanecem nesta zona por um período de tempo desconhecido, rodeando o centro germinativo (Seto M, 2004). As células B maduras parecem estar na fase G0 do ciclo celular e expressam o gene *BCL2*, que emite um sinal anti-apoptótico mantendo as células vivas neste estágio. A maioria destas células expressa a glicoproteína CD5 na superfície celular (à semelhança das células T) (Küppers R, 2005).

Zona Escura: a estimulação antigénica e os sinais recebidos pelas células T auxiliares permitem que a célula B entre em ciclo dando início à formação de um centro germinativo com a proliferação de células B, rapidamente divisíveis e com núcleo não clivado que recebem a denominação de centroblastos e que entram periodicamente na zona clara (Seto M, 2004; Lenz G, *et al*, 2010).

Nestas células em proliferação vai ocorrer o processo denominado de hipermutação somática (Figura 3) que consiste na introdução de mutações pontuais e algumas duplicações e deleções com grande especificidade nos genes da região variável das Igs da célula B. (Kušec R, 2002)

Se deste processo resultar a expressão de um BCR de alta afinidade para um antígeno análogo, a célula B sobrevive e diferencia-se, caso contrário sofre apoptose. Este processo de selecção parece ter lugar na zona clara.

Zona Clara: nesta zona os centroblastos transformam-se morfológicamente em centrócitos, como mencionado, que são células não divisíveis com núcleo clivado, que se encontram em “descanso”. Estas ligam-se a antígenos apresentados pelas células foliculares dendríticas e apresentam-no a células T CD4+ (CD40) próximas. Parte das células do centro germinativo sofre troca de classe (Figura 3), na qual há substituição de um gene da região constante da cadeia pesada da Ig por outro (troca de IgM por IgG, IgA ou IgE, classes mais específicas).

Finalmente podem-se diferenciar em plasmócitos ou células B de memória e entram na circulação periférica abandonando o folículo via *Zona Marginal* (Figuras 2 e 4) (Seto M, 2004).

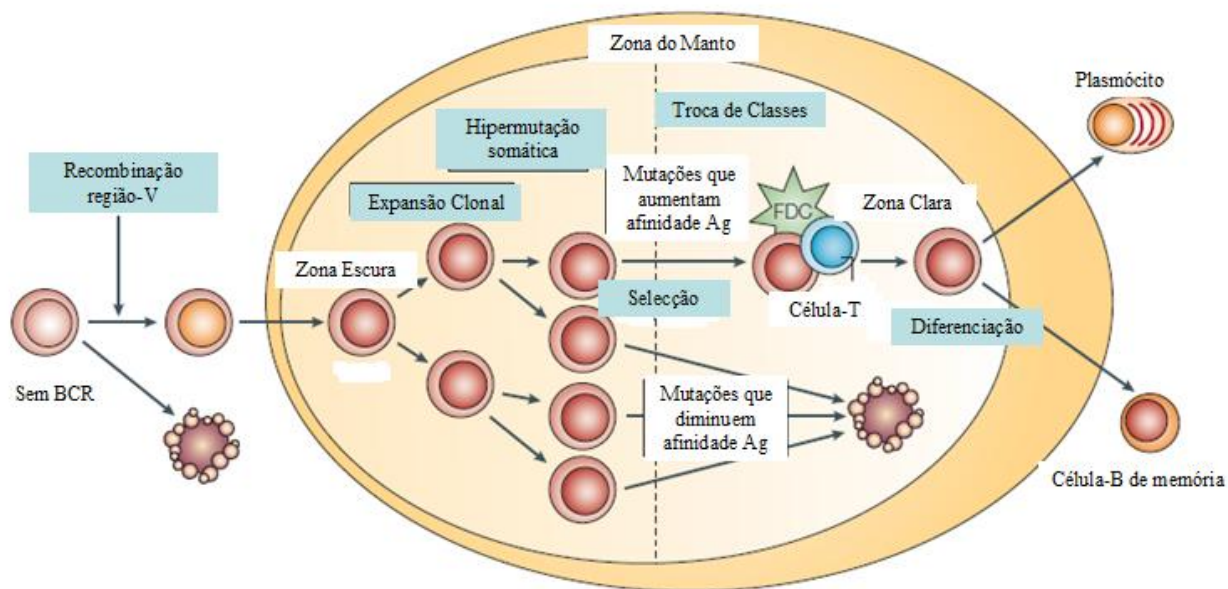


Figura 4 - Diferenciação da célula B no gânglio linfático e formação do centro germinativo. (Adaptado de Küppers R, 2005)

Além destas três zonas principais, num gânglio é possível ainda distinguir a *zona marginal*. Tal como a zona do manto, é um local de passagem de *células B maduras* e células B de memória pós-centro germinativo. A zona marginal é mais pronunciada no baço e placas de peyer (Lenz G, *et al*, 2010).

2.2. Linfomagénesse

Os linfomas B originam-se a partir de células B normais em diferentes estádios de desenvolvimento (Figuras 2, 5 e 6). Os processos de hipermutação somática e troca de classes não ocorrem em células T (o que pode contribuir para explicar o maior número de neoplasias de células B) (Küppers R, 2005)

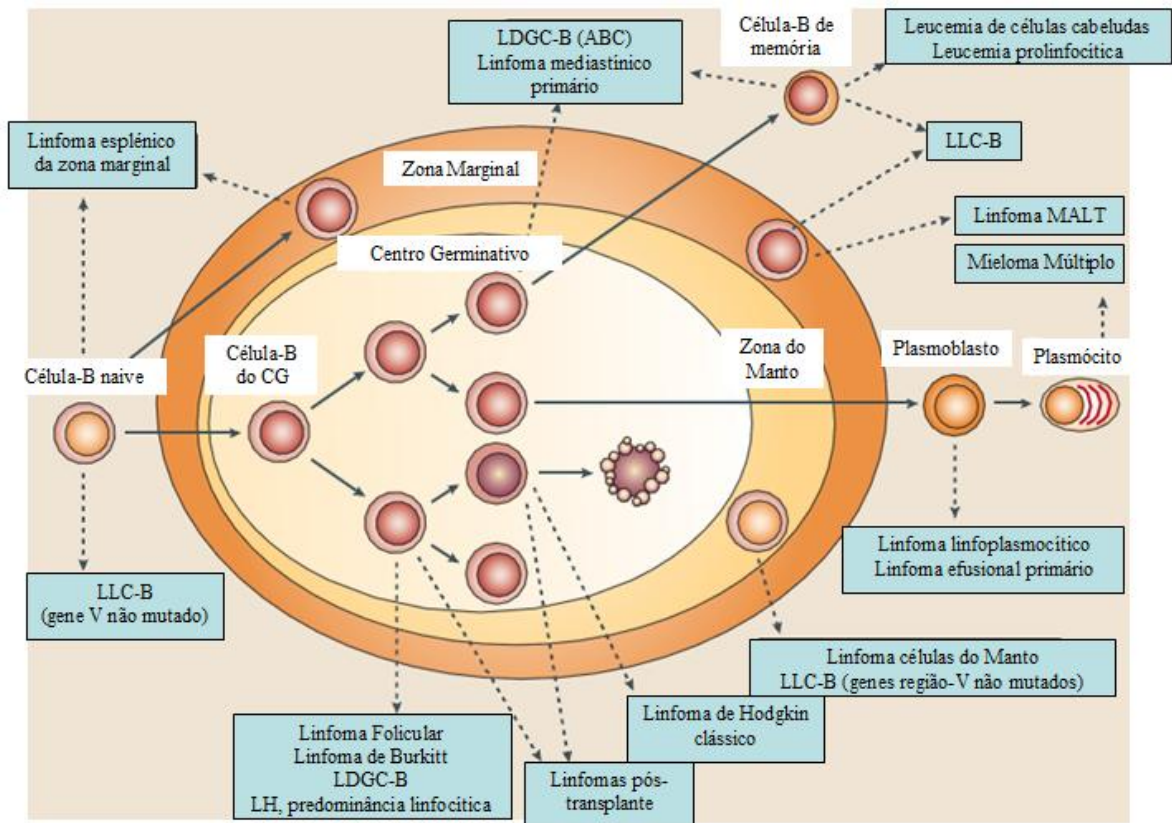


Figura 5 - Origem celular dos linfomas de células B humanos. LDGC-B – linfoma difuso de grandes células B, ABC – *activated B-cell*, LLC-B – leucemia linfocítica crônica de células B, MALT – tecido linfóide associado à mucosa, LH – linfoma de Hodgkin, CG – centro germinativo. (Adaptado de Küppers R, 2005)

Como referido, a maioria dos linfomas deriva de células B do centro germinativo ou pós-centro germinativo, nas quais ocorre anomalias no programa de diferenciação normal.

As translocações cromossômicas recíprocas têm um papel fundamental na patogénese dos linfomas de células B, embora sejam necessárias outras alterações genéticas e epigenéticas adicionais para que ocorra malignização, como representado na Tabela 5 (Seto M, 2004; Lenz G, 2010).

Tabela 5 | Mecanismos patogénicos dos linfomas de células B

Linfoma	Translocações cromossómicas	Mutações em genes supressores de tumores	Vírus	Outras alterações
Linfoma de células do manto	CCND1-IgH	ATM	-	Delecção 13q14
Leucemia linfocítica crónica de células-B	-	ATM, TP53	-	Delecção 13q14
Linfoma folicular	Bcl2-IgH	-	-	-
Linfoma difuso de grandes células-B	Bcl6-vários Bcl2-IgH MYC-IgH ou MYC-IgL	CD95 ATM TP53		Hipermutação aberrante ou múltiplos proto-oncogenes
Linfoma primário do mediastino de grandes células-B	-	SOCS1	-	Hipermutação aberrante ou múltiplos proto-oncogenes
Linfoma de Burkitt	MYC-IgH ou MYC-IgL	TP53, RB2	EBV	-
Linfoma pós-transplante	-	-	EBV	-
Linfoma de Hodgkin clássico	-	IKBA, IKBE, CD95	EBV	Amplificações REL
Linfoma de Hodgkin – predominância linfocitária	Bcl6-vários	-	-	-
Linfoma da zona marginal esplénico	-	-	-	Delecção 7q22-36
Linfoma MALT	API2-MALT1 Bcl10-IgH MALT1-IgH FOXP1-IgH	CD95	Papel indirecto H. pylori nos linfomas MALT gástricos	-
Linfoma linfoplasmacitóide	PAX5-IgH	-	-	-
Linfoma efusional primário	-	-	HHV8, EBV	-
Mieloma múltiplo	CCND1-IgH FGFR3-IgH MAF-IgH	CD95	-	Várias alterações MYC Mutações RAS Delecção 13q14

(Adaptado de Küppers R, 2005)

A desregulação causada pela translocação cromossómica resulta na expressão de genes em estádios de desenvolvimento inapropriados, onde o produto dos genes envolvidos é detectado como aberrante (Seto M, 2004).

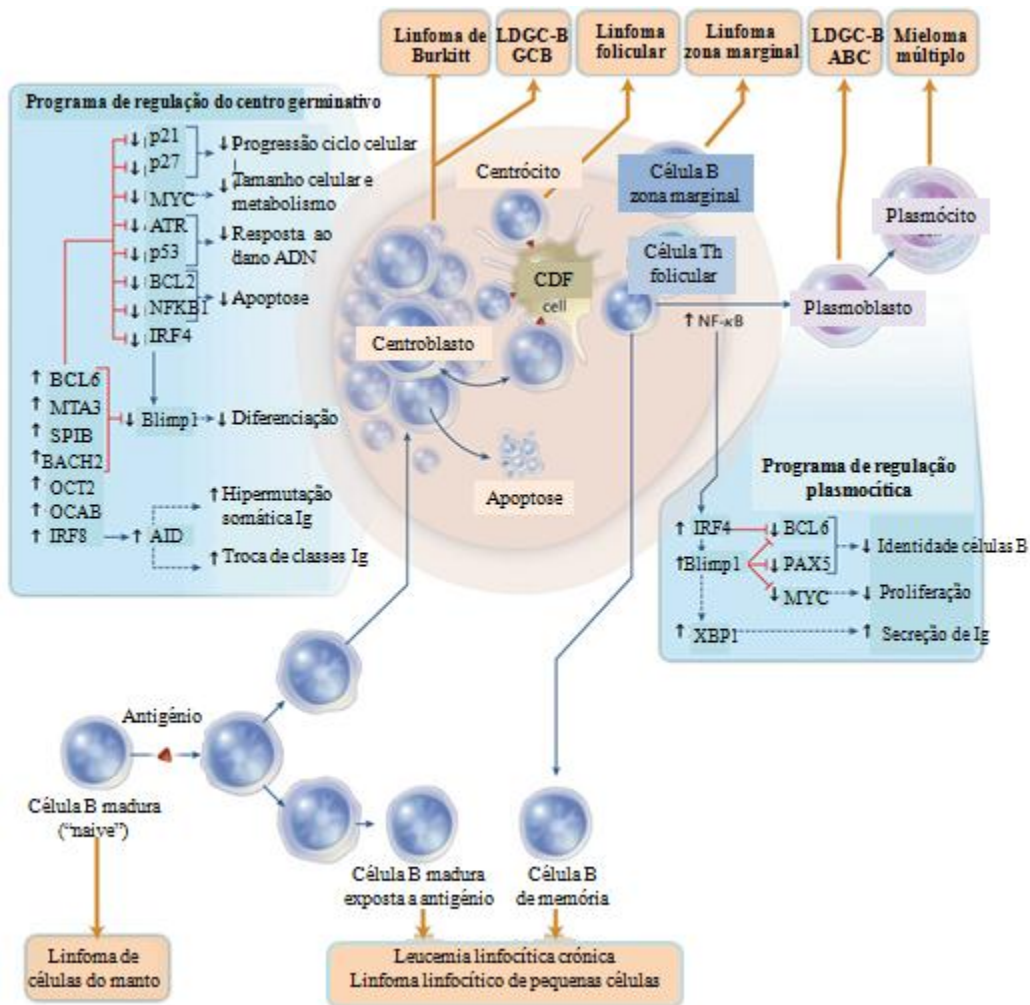


Figura 6 – Diferenciação das células B e Linfomagéneses. Os linfomas podem ter origem em múltiplos estádios do desenvolvimento normal das células B. Após a estimulação de uma célula B madura (“naive”) com um antígeno dependente de células T inicia-se a reacção do centro germinativo. As células B do centro germinativo caracterizam-se por um programa de regulação único e pela acção da desaminase da citidina induzida pela activação (AID), que induz a hipermutação somática e troca de classes da imunoglobulina (Ig). São necessários vários factores de transcrição para manter a identidade e a função das células B do centro germinativo, tais como BCL6, MTA3, SPIB, BACH2, OCT2, OCAB, e IRF8. As linhas vermelhas indicam que um factor de regulação inibe o gene ou a função celular indicados, já as linhas azuis indicam uma regulação positiva. Estes factores bloqueiam a diferenciação plasmocítica através da repressão do gene Blimp-1 e promovem a progressão do ciclo celular sem crescimento celular. No centro germinativo, os centroblastos que proliferam rapidamente são propensos a sofrerem apoptose. Periodicamente os centroblastos migram para um subcompartimento do centro germinativo onde se transformam em contrócitos. IRF4 inicia a diferenciação em plasmócitos através de um programa de regulação específico que promove a

diferenciação terminal e secreção de imunoglobulinas. Está indicada a suposta origem de vários linfomas não-Hodgkin. Os linfomas derivados de células B do centro germinativo apresentam anormalidades genéticas recorrente causando o bloqueio da diferenciação celular, promovendo o crescimento celular e evitando a apoptose. NFκB – factor nuclear κB. CDF- células dendríticas foliculares. GCB - *Germinal-Center B-cell-like*. ABC - *Activated B Cell*. Célula Th – célula T *helper* (auxiliar) (Adaptado de Lenz G, 2010).

As translocações ocorrem essencialmente num dos seguintes mecanismos moleculares, recombinação, hipermutação somática e troca de classes.

Recombinação V(D)J

A translocação ocorre nas *células pró-B*, na MO, devido a erros durante a recombinação VDJ, resultando na desregulação da transcrição de um proto-oncogene funcional pela sua transposição para o locus da Ig. As mais comuns são as translocações que envolvem os genes *BCL2* e *BCL1*.

A t(14;18) (q32;q21) *BCL2/IgH* coloca o gene *BCL2* sob controlo do locus IgH. A expressão de BCL-2 só será detectada como aberrante no estágio de célula folicular do centro germinativo, ou seja, enquanto os centroblastos normais não expressam BCL-2 e apenas uma minoria não sofre apoptose. Os centroblastos malignos, por possuírem translocação activadora do gene *BCL2*, transmitem sinais anti-apoptóticos, evitando a morte celular programada e proliferando com a ajuda de sinais das células dendríticas foliculares. Esta translocação associa-se ao linfoma folicular e alguns LDGC-B (Kušec R, 2002).

Na t(11;14) (q13;q32) *BCL1/IgH*, a expressão de BCL-1 no estágio de célula do Manto vai ser detectada como aberrante, emitindo um sinal de crescimento celular e progressão do ciclo celular por aumento da ciclina D1 nuclear, o que está na origem do linfoma de células do Manto (Seto M, 2004).

Hipermutação Somática

Além dos genes das Igs, outros podem sofrer hipermutação somática com desregulação da sua função. Um exemplo é o oncogene *BCL6*, cuja expressão é aberrante em células B pós-centro germinativo e parece evitar a diferenciação terminal das células B. Esta translocação relaciona-se com o LDGC-B (Kušec R, 2002).

Outro exemplos são os genes supressores tumorais e pró-apoptóticos *CD95 (FAS)*, encontrado em cerca de 20% dos linfomas de células B pós-centro germinativo, e *p53*, que se encontra alterado em alguns tipos específicos de LNH (ex. LCM, LB), sobretudo em estádios tardios da doença.

Troca de Classes

Tem sido detectada uma extensa variedade de translocações envolvendo as regiões constantes da cadeia pesada da Ig, durante o processo de troca de classes. (Kušec R, 2002; Küppers R, 2005)

2.3. Sinalização celular e linfomagénese

São várias as vias de sinalização intracelular relacionadas com a linfomagénese, como a via BCR/PI3K/AKT/mTOR (receptor da célula B/fosfoinosítido 3-cinase/proteína-cinase B AKT/alvo da Rapamicina nos mamíferos), a via RAS/MAPK (MAPK, proteínas cinases activadas por mitogénese, associadas com as proteínas RAS-RAF) (Figura 7), a via IP3/PLC (Inositol 1,4,5-trifosfato/fosfolipase-C) (Figura 7), e, menos frequentemente, a via JAK/STAT (cinase Janus/transdutores de sinais e activadores da transcrição) (Parcells et al., 2006; Small, 2006; Oliveira, 2008; Morschhauser et al., 2010, Mendes J, 2012). A via RAS/RAF/MEK ou MAPK é um potencial alvo terapêutico no LNH. As proteínas RAS situam-se na superfície interna na membrana celular pela adição de um grupo farnesil ou carboxílico terminal. Isto

permite a interacção da proteína com a camada hidrofóbica da membrana celular o que é crítico para a conversão da proteína RAS na sua forma biológica activa. Estas modificações são essenciais para a sua função, ligando e hidrolisando GTP, transformando as proteínas RAS na forma activa, quando ligadas a GTP (guanosina trifosfato), na sua forma inactiva ligada a guanosina difosfato (GDP) (figura 7). Através dos receptores de superfície celular RTKs (receptor tirosina-cinase) e outros receptores membranares, diversos ligando extracelulares promovem a forma activa ligada a guanosina trifosfato (GTP), regulada por GEFs (factores de troca de nucleótidos de guanina) e GAPs (proteínas activadoras de GTPase).

A via MAPK está envolvida na regulação da proliferação e diferenciação das células hematopoiéticas normais. O papel desta via na patogénese dos linfomas é sugerido por estudos nas linhas celulares derivadas de linfomas. Além disso, alguns estudos mostraram que esta via pode ser um bom alvo terapêutico a dois níveis major, as proteínas RAS e RAF. (Hachem A, Gartenhaus R, 2005).

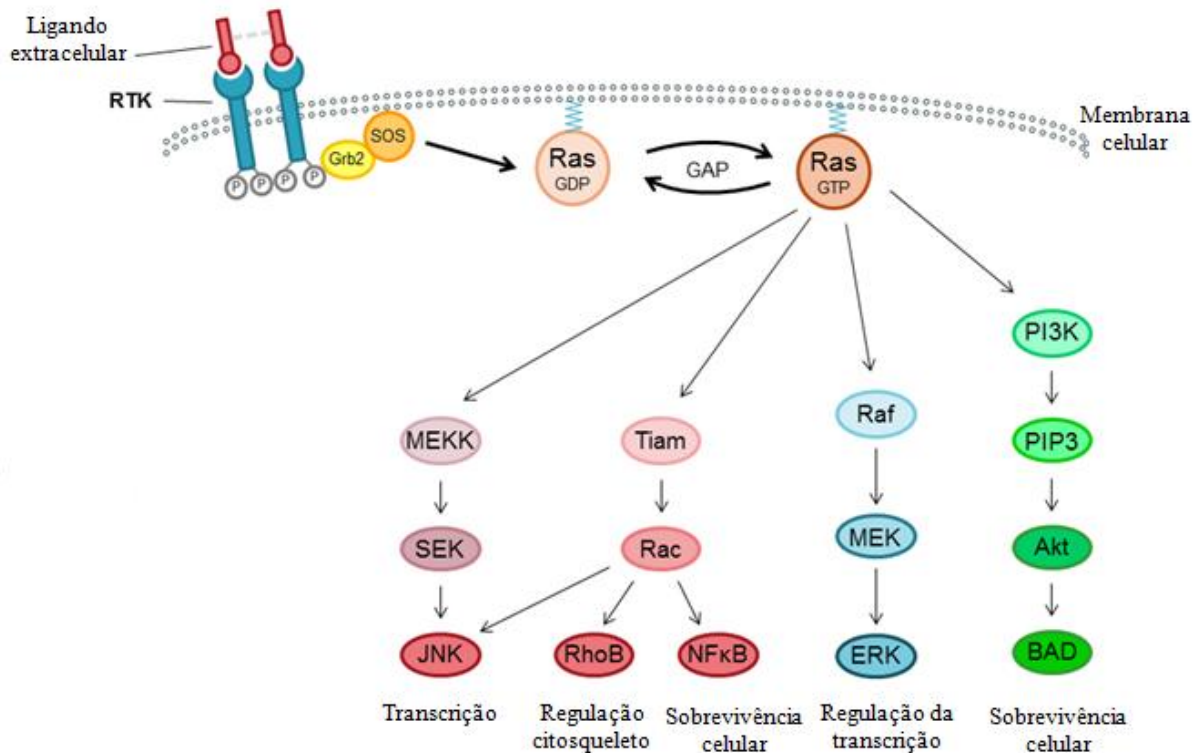


Figura 7 – Vias de sinalização celular com ativação do receptor tirosina-cinase (RTK) e da proteína RAS. A activação do receptor induz a activação de várias vias de sinalização, incluindo as vias PI3K/AKT e MAPK, onde a proteína RAS tem um papel essencial. (Adaptado de Stirewalt & Radich, 2003; Mendes J, 2012).

3. CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DOS DIFERENTES SUBTIPOS DE LINFOMAS AGRESSIVOS

3.1. LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B

3.1.1. DEFINIÇÃO E ORIGEM

O LDGC-B é considerado um linfoma agressivo que resulta da acumulação de múltiplos eventos genéticos e/ou epigenéticos em diferentes genes (Neto A *et al.*, 2006). Trata-se de uma neoplasia de células B linfóides com tamanho duas vezes superior ao do linfócito normal e cujo núcleo tem tamanho igual ou superior ao núcleo do macrófago (Stein H *et al.*, 2008). Normalmente surge “de novo” contudo é importante reconhecer que pode resultar da progressão ou transformação de um linfoma menos agressivo ou indolente (como

LF, LLC/SLL, Linfoma da Zona Marginal ou até mesmo de um LH) o que, embora não altere a escolha do tratamento inicial, vai influenciar a história natural da doença e o prognóstico (Stein H *et al.*,2008).

Através de vários estudos morfológicos, biológicos e clínicos os LDGC-B são subdivididos em variantes morfológicas, subgrupos moleculares e imunofenotípicos e em diversas entidades clínicas distintas (Tabela 6).

Tabela 6 | Linfoma difuso de grandes células B: variantes, subgrupos e subtipos/entidades

LDGC-B, não especificado	Subtipos de LDGC-B	Outros linfomas de grandes células B	Casos “borderline”
Variantes morfológicas comuns: -centroblástico -imunoblástico -anaplásico	Linfoma de grandes células B rico em células T/histiócitos LDGC-B primário do SNC	Linfoma primário do mediastino (tímico) de grandes células B LDGC-B intravascular LDGC-B associado a inflamação crônica	Linfoma de células B, inclassificável, com características intermédias entre o LDGC-B e o LB
Variantes morfológicas raras Subgrupos moleculares: -GCB -ABC	LDGC-B cutâneo primário na perna LDGC-B EBV-positivo no idoso	Granulomatose linfomatóide LDGC-B ALK-positivo	Linfoma de células B, inclassificável, com características intermédias entre o LDGC-B e o linfoma de Hodgkin clássico
Subgrupos imunohistoquímicos: -LDGC-B CD5+ -GCB -não GCB		Linfoma plasmoblástico Linfoma de grandes células B surgindo na doença de Castleman multicêntrica associada a infecção pelo HVH-8 Linfoma efusional primário	

LDGC-B - Linfoma difuso de grandes células B, ABC - *Activated B Cell*, GCB - *Germinal-Center B-cell-like*, SNC – sistema nervoso central, EBV – vírus *Epstein Barr*, HVH-8 – *Herpes* vírus humano tipo 8, LB – linfoma de Burkitt (Adaptado de Stein H *et al.*,2008)

É o linfoma mais comum, constituindo cerca de 25% a 40% dos LNH em adultos nos países Ocidentais (Figuras 1 e 8). É mais frequente no idoso, pela 7ª década de vida, mas também atinge crianças e adultos jovens. A incidência é ligeiramente superior no sexo masculino (Stein H *et al.*,2008).

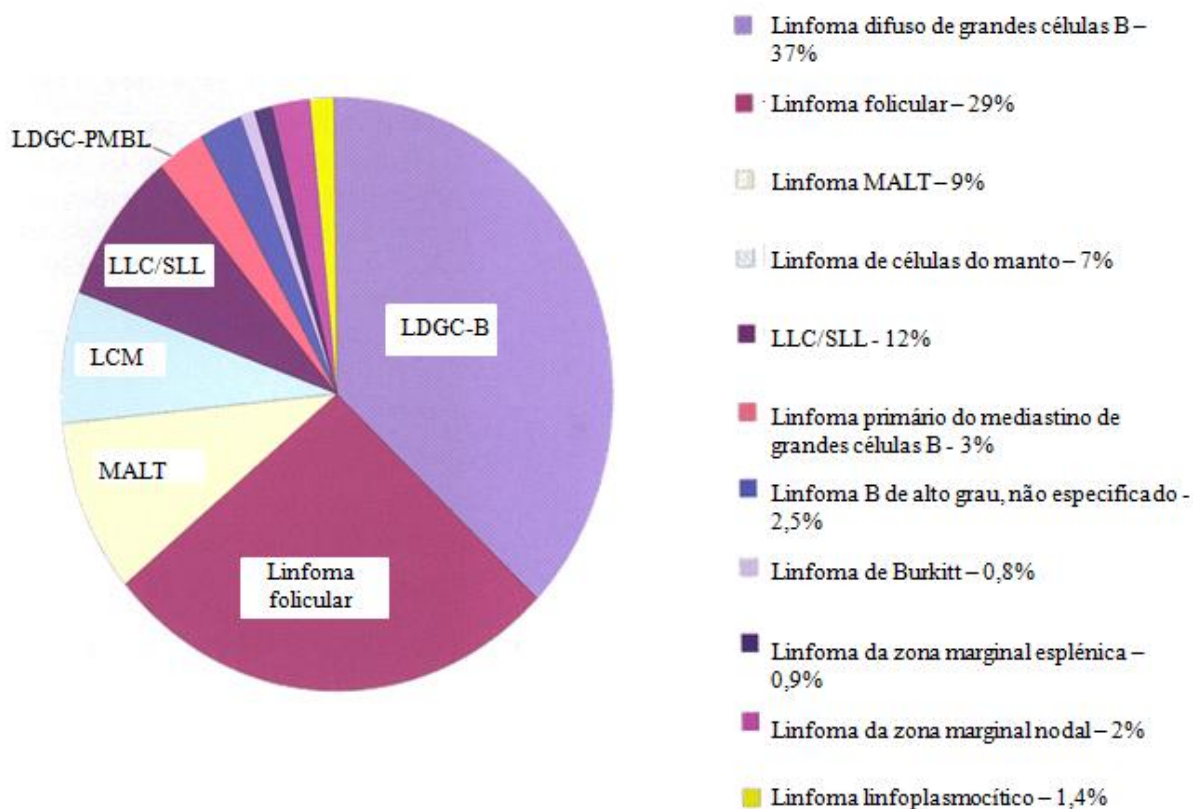


Figura 8 – Frequência dos LNH. MALT – tecido linfóide associado à mucosa, LLC/SLL – leucemia linfocítica crônica/ linfoma linfocítico de pequenas células, LDGC-B – linfoma difuso de grandes células B, LCM – linfoma de células do manto, LDGC-PMBL - linfoma primário do mediastino de grandes células B (Adaptado de Swerdlow HS *et al.*, 2008)

3.1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Os doentes com este tipo de linfomas tipicamente apresentam-se com adenopatias ou grandes massas de progressão rápida devido à grande proliferação celular, que atingem apenas um ou vários locais. No entanto, a maioria dos doentes é assintomática. Quando existem sintomas, vão depender do local envolvido. Quase metade apresenta doença no estágio I ou II na altura do diagnóstico (Stein H *et al.*, 2008).

A doença pode ser localizada aos gânglios linfáticos, embora em 30 a 40% dos casos, esteja inicialmente confinada a locais extraganglionares. O local extraganglionar preferencialmente invadido pelo tumor é o abdómen, mais concretamente estômago e região ileocecal. Outros locais comuns são o timo, osso, testículos, baço, anel de Waldeyer, glândulas salivares, tiróide, fígado, rim e supra-renal, embora virtualmente qualquer localização possa ser um local primário. Com a progressão da doença, esta afecta a medula óssea em 11 a 27% dos casos e destes 1/3 apresenta células malignas no sangue periférico (Stein H *et al.*, 2008).

3.1.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

O LDGC-B é uma entidade clínico-patológica heterogénea (Neto A *et al.*, 2006). Apresenta habitualmente perda total ou parcial da arquitectura dos gânglios linfáticos atingidos, devido a uma proliferação difusa de grandes células linfóides (diâmetro médio de 20 µm), cujo núcleo tem um tamanho duas vezes superior ao de um linfócito normal, igualando ou excedendo o tamanho do núcleo dos macrófagos. Podem-se encontrar figuras mitóticas numerosas e macrófagos fagocitando detritos nucleares (Pileri S *et al.*, 2000; Stein H *et al.*, 2008).

O LDGC-B apresenta 3 variantes morfológicas principais, tipo centroblástico, Imunoblástico e Anaplásico.

O *Centroblástico* é o tipo morfológico mais comum (Figura 9). Pode ser monomórfico (constituído por mais de 90% de centroblastos) ou, mais frequentemente, polimórfico (mistura de centroblastos e imunoblastos, representando estes últimos menos de 90% das células). Os centroblastos são linfócitos de tamanho médio a grande, com núcleos ovais a redondos e vesiculares, contendo cromatina fina com 2 a 4 nucléolos. O citoplasma é habitualmente escasso e anofílico a basófilo. Os núcleos podem ser multilobados em situações mais raras, especialmente no osso e outros locais extraganglionares (Stein *et al.*, 2008).

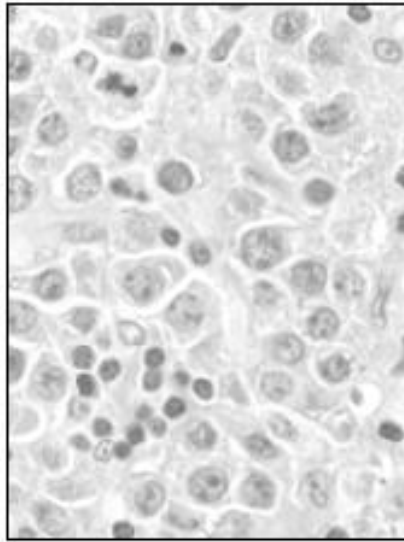


Figura 9 - Linfoma Difuso de Grandes Células B variante centroblástica (Adaptado de Yang W *et al.*, 2005)

No tipo *Imunoblástico* mais de 90% das células são imunoblastos. Caracteriza-se por uma monotonia celular, com camadas de células que apresentam núcleos vesiculares grandes, nucléolo central único e proeminente eosinófilo bem como citoplasma anofílico ou basófilo abundante e excêntrico. Podem apresentar imunoblastos com diferenciação plasmocitóide pelo que a clínica e/ou imunofenotipagem podem ser essenciais para o diagnóstico diferencial com linfoma plasmoblástico ou mieloma de células plasmáticas imaturas (Figura 10-A)

(Yang W *et al.*, 2005; Stein H *et al.*, 2008). Esta variante é característica de doentes com doenças auto-imunes (ex. Tiroidite de Hashimoto) (Yang W *et al.*, 2005).

No tipo *Anaplástico, as*: células são grandes a muito grandes, ovais ou poligonais cujo núcleo grande e pleomórfico lembra as células RS ou células de Hodgkin (Figura 10-B). Tem um crescimento em camadas coesivas, que pode simular um carcinoma indiferenciado, e sinusoidal, lembrando um linfoma anaplástico de origem T ou NK (distinguíveis pela imunofenotipagem e citogenética) (Yang W *et al.*, 2005).

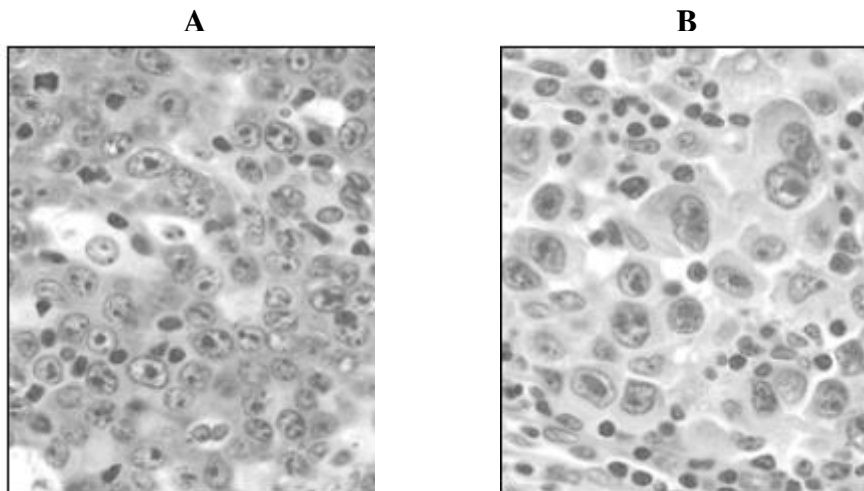


Figura 10 - Linfoma Difuso de Grandes Células B. Em **A** está representado a variante Imunoblástica e em **B**, a variante Anaplásica (Adaptado de Yang W, *et al.*, 2005).

Não existe consenso sobre a utilidade da identificação destas variantes histológicas, contudo o tipo Imunoblástico parece apresentar maior agressividade (Pileri S *et al.*, 2000).

3.1.4. SUBTIPOS MOLECULARES

Os estudos de expressão do perfil genético destes linfomas têm revelado diferenças na expressão de milhares de genes (Figura 11). Surgindo aparentemente de células B normais em

diferentes estádios de desenvolvimento, são também diferentes a apresentação clínica e resposta ao tratamento (Jong D *et al.*, 2011).

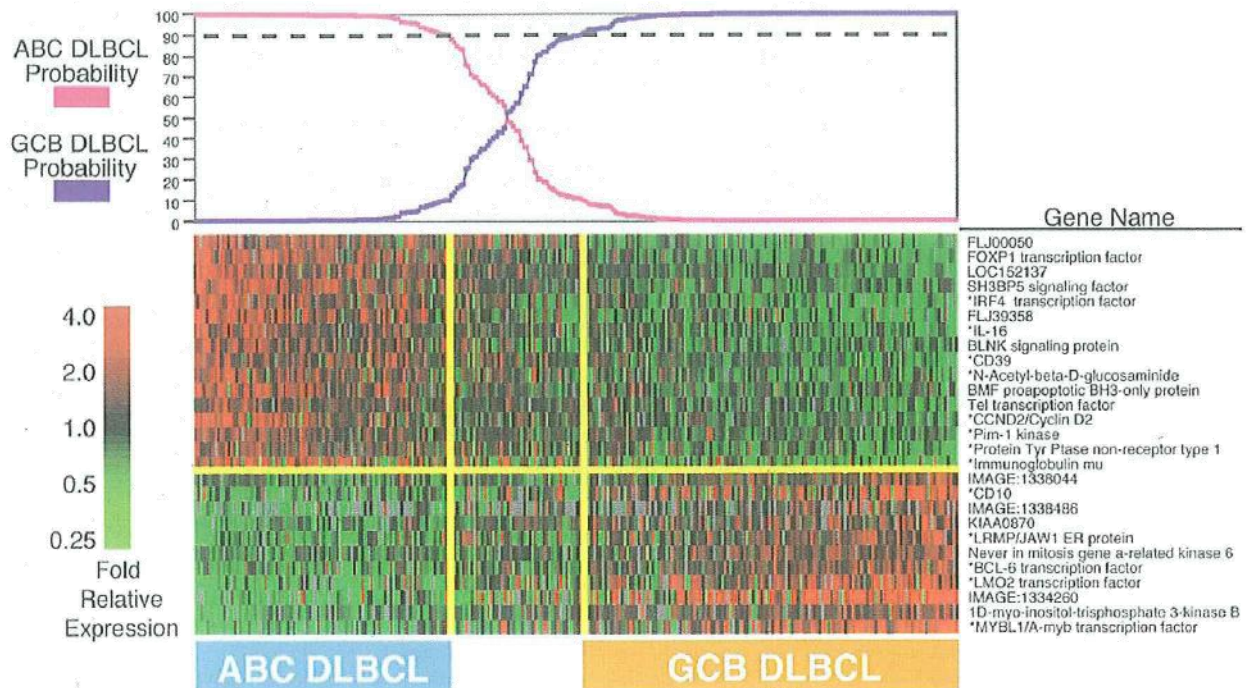


Figura 11 – Identificação do perfil genético de LDGC-B por micro-arrays de ADN. Está representado a expressão de 27 genes o que permite dividir os casos de LDGC-B em 2 subtipos, o ABC (*Activated B Cell*) e o GCB (*Germinal-Center B-cell-like*) (Adaptado de Hofbrand, 2011).

Com base nestes perfis genéticos e na imunofenotipagem e citogenética, distinguem-se no LDGC-B três subtipos moleculares distintos, um derivado de células B do centro germinativo (*Germinal-Center B-cell-like*, GCB), um derivado de células B activadas, o subtipo ABC (*Activated B cell*) e um terceiro subtipo, o linfoma primário do mediastino de grandes células B (PMBL), com características patobiológicas diferentes dos subtipos anteriores (Figuras 6, 11 e 12) (Lenz *et al.*, 2010; Jaffe E, *et al.*, 2011). Todos estes subtipos moleculares diferem na expressão de centenas de genes e também no prognóstico (Hachem A, *et al.*, 2005; Lenz *et al.*, 2010; Jong D *et al.*, 2011). No entanto, existem alterações genéticas

comuns entre os três subtipos moleculares, como por exemplo a mutação no gene *p53* (Jong D *et al.*, 2011)

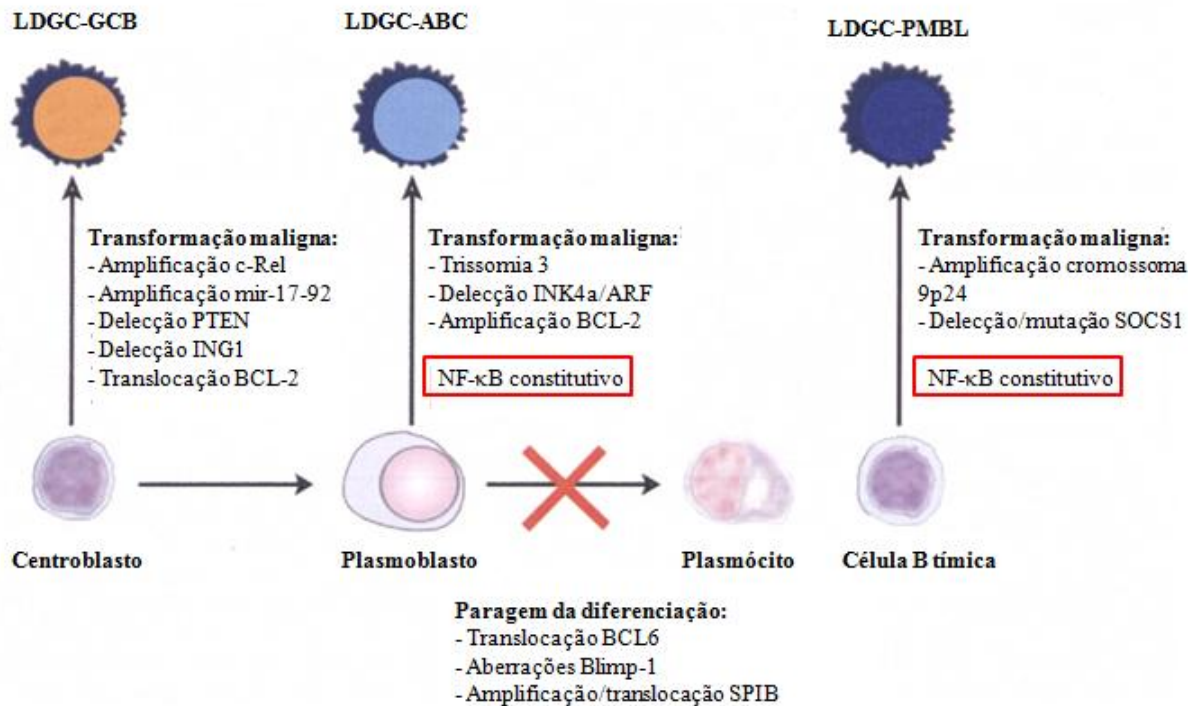


Figura 12 - Subtipos moleculares de LDGC-B - GCB – Germinal Center B Cell-like; ABC – Activated B Cell-like; PMBL – Primary Mediastinal B-cell Lymphoma (Adaptado de G Lenz, 2010).

Como podemos observar nas figuras 11 e 12, os *LDGC-GCB* expressam centenas de genes similares aos das células B normais do centro germinativo, bem como as características funcionais destas células como hipermutação somática e troca de classes. (Lenz G, *et al.*, 2010; Jong D, *et al.*, 2011). As alterações genéticas específicas deste subtipo incluem (Lenz G *et al.*, 2010; Jong D *et al.*, 2011):

- Elevada prevalência da translocação *t(14;18)* envolvendo o gene anti-apoptótico *BCL2*, em cerca de 35% dos casos.
- Perda do gene supressor de tumor *ING*, em aproximadamente 30% dos casos.

- Amplificação da região MIHG1 no cromossoma 13 (microRNA cluster, mir-17-92), em cerca de 12% dos casos.

- *Deleção* do gene supressor tumoral *PTEN* no cromossoma 10, em cerca de 11% dos casos.

O principal resultado destas alterações é a inibição da apoptose, especialmente devido à translocação *BCL2* e à inter-regulação *C-MYC* e mRNA, o que pode constituir um alvo terapêutico. (Jong D, *et al*, 2011).

Imunofenotipicamente, mais de 30% das células são CD10+ ou CD10-, *BCL-6*+, *IRF4/MUM1*- (Stein H, *et al.*,2008).

No subtipo de LDGC-ABC: as células assemelham-se a células B activadas, apresentando o programa de regulação dos plasmócitos que inclui o factor de transcrição XBP1 (regulador *major* da secreção de Ig) (Lenz G, *et al*, 2010).

Estas células requerem a activação constitucional da via NF-KB (Figura 13) para sobreviverem, conseguindo-o através de diversas alterações genéticas e cromossómicas.

O gene *NF-kB* codifica um factor de transcrição, o NF-kB, que pertence à família c-Rel e que interfere com a expressão de mais de 200 genes (Hachem A, *et al.*, 2005).

Alguns desses factores de transcrição são retidos no citoplasma da célula como produtos maduros por um inibidor específico - o inibidor de kB (IkB) - enquanto outros são derivados de clivagem proteolítica de grandes precursores intracitoplasmáticos. Após activação, o NF-kB transloca-se do citoplasma para o núcleo, onde regula a transcrição de genes, tendo um papel importante na regulação da imunidade inata e adaptativa, resposta inflamatória, desenvolvimento de órgãos linfóides e na inibição da apoptose. O NF-kB inibe a apoptose induzindo a expressão de factores anti-apoptóticos como c-IAP, FAS/FLICE/c-FLIP, receptor TNF (TNFR) bem como TRAF1 e TRAF2 e membros da família BCL-2.

A actividade da via NF- κ B sofre um controlo apertado durante o desenvolvimento normal das células B (Hachem A, *et al.*, 2005). Encontra-se activada transitoriamente através de vários receptores de superfície, incluindo o BCR e TCR e outros (TLR, TNF-R, IL-1R e CD10) (Lenz G, *et al.*, 2010).

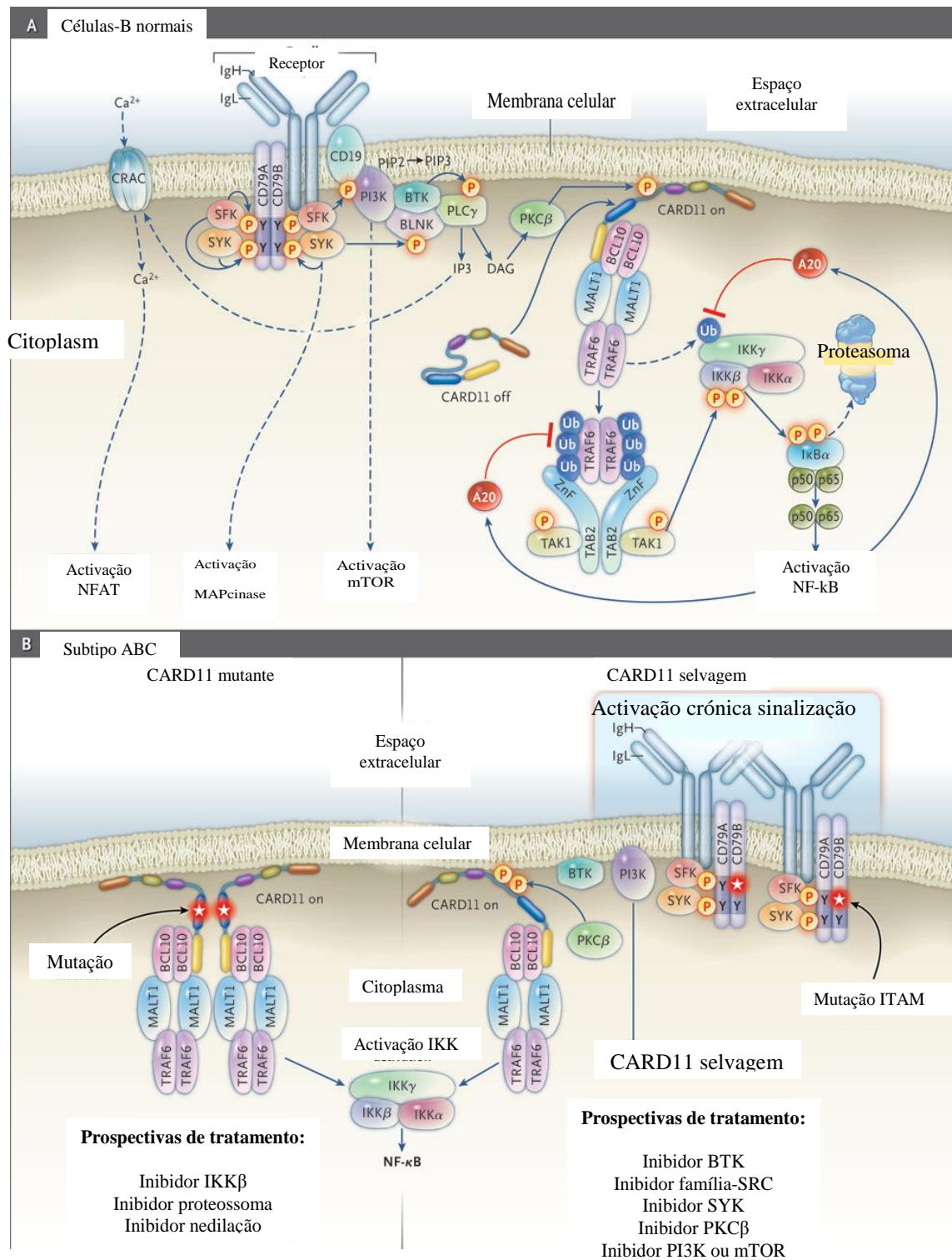


Figura 13 - Vias de sinalizaçào do receptor da célula B e do NF- κ B nos linfócitos normais e malignos. (Adaptado de Lenz G, *et al.*, 2010)

A activação constitutiva do NF-kB é crítica para o desenvolvimento do subtipo ABC (bem como para outros LNH, como o linfoma MALT e o linfoma mediastinico de células B). Esta resulta da fosforilação da IKK (cinase IκB) e, conseqüentemente, degradação do IκB no proteossoma. Deste modo, o factor de transcrição citoplasmático NF-kB fica livre, migra para o núcleo e activa genes-alvo, validando a activação constitutiva da via NF-kB (Hachem A, *et al.*, 2005; Lenz G, *et al.*, 2010).

Assim, este mecanismo molecular pode constituir um alvo terapêutico na medida em que a introdução de um super-repressor IκB, que não pode ser fosforilado pelo IKK, é selectivamente tóxico para o subtipo ABC, causando apoptose e prisão da célula na fase G1 do ciclo celular (Hachem A, *et al.*, 2005). De igual modo, a inibição da degradação do IκB no proteossoma pode impedir a activação do NF-kB, bloqueando a proliferação e induzindo a apoptose das células (Ribeiro A, 2012). De salientar que este perfil molecular não foi observado no subtipo GCB, sugerindo que cada subtipo tem a sua própria especificidade molecular.

As principais alterações genéticas que estão na base da activação constitucional da via NF-kB são (Hachem A *et al.*, 2005; Lenz G *et al.*, 2010):

- Mutação no complexo CBM (CARD11, Bcl10, MALT1) em 10% dos casos, resultando na activação constitutiva deste complexo formado pela proteína CARD11, que forma um complexo multiproteico com BCL10 e MALT1 em regiões especializadas da membrana plasmática, activando então a cinase IκB (IKK) que fosforila o IκB.

- Mutação no gene supressor tumoral, *A20 (Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Protein 3 or TNFAIP3)*, em 20% dos casos, que funciona como regulador negativo da sinalização NF-kB (Vereecke L *et al.*, 2009).

- BCR cronicamente activado (sinal pseudo-BCR sustentado) – mutações somáticas em CD79a e CD79b do BCR e nos ITAM, em cerca de 20% dos casos.

- Mutações inativadoras do gene *BLIMP1* em cerca de 25% dos casos, o que promove a proliferação celular pois deixa de existir repressão dos genes que controlam a progressão do ciclo celular e bloqueio da diferenciação terminal da célula B. Estes mecanismos em conjunto com a activação constitutiva do Nf-kB desregula a proliferação e a sobrevivência celulares (*NFkb e BLIMP1*)

Por outro lado as alterações cromossómicas mais frequentes incluem a amplificação 18q21-q22 (locus *BCL2*), a *deleção* intersticial do cromossoma 9 (*deleção INK4A-ARF*, que envolve os genes p14 e p16 que regulam o ciclo celular através regulação dos genes supressoras tumorais pRB e p53, respectivamente), a trissomia 3, a *deleção* 6q21-q22 e a amplificação 19q (Jong D, *et al*, 2011; Lenz G, *et al*, 2010).

O *LDGC-PMBL* (Linfoma primário do mediastino de grandes células B) representa 2 a 4% de todos os LNH, tem um predomínio no sexo feminino (1:2) (Gaulard P *et al.*, 2008) e apresenta um pico de incidência pela 4ª década de vida (idade média: 30 a 35 anos), contrastando com a população mais idosa afectada pelo LDGC-B (Johnson P *et al.*, 2008)

Pensa-se que tem origem em células B da zona medular do timo (Oschlies I *et al.*, 2011), podendo ser identificados corpúsculos de Hassall em amostras anatomopatológicas. (Johnson P *et al.*, 2008)

A apresentação clínica apoia esta origem, uma vez que os doentes apresentam uma massa mediastínica antero-superior, geralmente com mais de 10 cm de diâmetro (massa "*bulky*") (Gaulard P *et al.*, 2008) e rapidamente progressiva, podendo provocar sintomas por compressão local como tosse, dispneia, disfagia e síndrome da veia cava superior.

Frequentemente invade estruturas mediazinhas adjacentes como os pulmões, parede torácica, pleura ou pericárdio o que muitas vezes origina efusões pleurais e/ou pericárdicas.

(Oschlies I *et al.*, 2011). O edema mamário é comum e a presença de rouquidão pode traduzir lesão do nervo laríngeo recorrente. (Johnson P *et al.*, 2008)

Como estas manifestações locais são detectadas precocemente, a maioria dos casos apresenta-se no estágio I ou II. Com a progressão ou com a recorrência da doença após tratamento, é relativamente comum a disseminação para órgãos extraganglionares como rim, supra-renal, fígado, baço, SNC e ovários. Normalmente não há envolvimento da MO. (Gaulard P *et al.*, 2008; Johnson P *et al.*, 2008)

Pode ocorrer disseminação para os gânglios linfáticos supraclaviculares e cervicais. A ausência de envolvimento de outros gânglios linfáticos ou da medula óssea é pré-requisito para excluir um LDGC-B sistémico com envolvimento mediastínico secundário (Gaulard P *et al.*, 2008).

A morfologia do PMLB pode ser variável. Geralmente as células têm tamanho médio a grande, com citoplasma pálido e abundante e núcleo redondo ou ovóide (Gaulard P *et al.*, 2008). Em alguns casos, têm núcleos pleomórficos ou multilobados que podem lembrar células RS e confundir-se com LH (Gaulard P *et al.*, 2008), contudo preservam o programa das células B e expressam marcadores de linhagem B como CD19, CD20, CD22, CD79a mas sem Ig de superfície (Igs -) e são tipicamente positivas para CD23 (Oschlies I *et al.*, 2011). Há expressão de CD30 em mais de 80% dos casos, mas geralmente é fraca e heterogénea quando comparada com o LH (Johnson P *et al.*, 2008). Em contraste com o LH, os factores de transcrição PAX5, BOB.1, OCT-2 e PU.1 são sempre expressos e o CD15 apenas ocasionalmente está presente ou é negativo (Johnson P *et al.*, 2008). São células frequentemente positivas para IRF4/MUM1 (75%) e CD23 (70%), com expressão variável de BCL2 (55 a 80%), BCL6 (45 a 100%) e CD10 (8 a 32%). As células tumorais também são positivas para FIG1, MAL (70% dos casos em contraste com apenas 3% nos LDGC-B não

mediastínicos) CD54 e CD95, com co-expressão TRAF1 e REL nuclear (Johnson P *et al.*, 2008).

Na maioria dos casos foram encontrados vários defeitos da expressão do HLA classe I e/ou II (Gaulard P *et al.*, 2008).

Estudos citogenéticos permitiram identificar ganhos no cromossoma 9p24 (codificando JAK2, PDL1 e PDL2) em cerca de 75% casos, no cromossoma 2p15 (codificando REL, BCL11A) em cerca de 50% e no cromossoma X, Xp11.4-21 (33%) e Xq24-26 (33%). Pode ainda existir *deleção* do gene *SOCS1* (supressor da sinalização JAK-STAT) (Lenz G *et al.*, 2010) e inactivação dos genes da *p16INK4* e *TP53* (menos de 20% casos) (Gaulard P *et al.*, 2008). Estas alterações genéticas resultam na activação constitucional do NF-kB e da via JAK-STAT (Gaulard P *et al.*, 2008).

De salientar que apenas a caracterização molecular permite distinguir os diferentes subtipos de LDGC-B. De facto, não é possível reconhecer o subgrupo através da morfologia; apesar de a variante imunoblástica e centrobástica com células pleomórficas serem mais frequentemente observadas no subtipo ABC, são também observadas em alguns GCB. (Gaulard P *et al.*, 2008).

3.1.5. VARIANTES CLINICOPATOLÓGICAS

De acordo com a apresentação clínica definem-se também diferentes subtipos, sendo de salientar o *LDGC-B primário do SNC*, o *LDGC-B cutâneo primário da perna*, o *LDGC-B intravascular*, o *Linfoma efusional primário*, o *LDGC-B rico em células T/histiócitos* e o *LDGC-B EBV-positivo do idoso*.

- O *LDGC-B primário do SNC* inclui doentes com apresentação cerebral da doença mas também intra-ocular. Representa menos de 1% de todos os LNH e cerca de 2 a 3% de

todos os tumores cerebrais. A idade média de aparecimento é pelos 60 anos de idade, com maior prevalência no sexo masculino. Parece existir uma relação ente o LDGC-B primário do SNC e o LDGC-B com apresentação nos testículos, já que ambos são “santuários” imunitários (Kluin P *et al.*, 2008; Jaffe E *et al.*, 2011).

A maioria dos doentes apresenta défices neurológicos focais e, em alguns casos, sintomas neuropsiquiátricos e de hipertensão intracraniana. O envolvimento das leptomeninges traduz-se por cefaleias e neuropatias cranianas assimétricas. Visão enevoada pode ser o primeiro sintoma de doença intraocular (Kluin P *et al.*, 2008).

- O *LDGC-B cutâneo primário da perna* representa cerca de 20% de todos os linfomas cutâneos primários de células B. Tem uma maior incidência no sexo feminino, pela sétima década de vida. Geralmente apresenta-se como uma lesão de cor vermelha ou azulada numa ou em ambas as pernas. São linfomas agressivos, ao contrário de outros linfomas cutâneos, que frequentemente se disseminam para outros locais extracutâneos e que por isso requerem tratamento com quimioterapia (Meijer C *et al.*, 2008). Quando analisados a nível molecular, a maioria destes linfomas apresenta um fenótipo ABC (Jaffe E *et al.*, 2011).

- O *LDGC-B intravascular* é raro, desenvolvendo-se selectivamente no lúmen de pequenos vasos, em particular capilares. Ocorre em adultos, sem preferência por sexo.

Geralmente poupa os gânglios linfáticos mas tem uma disseminação extraganglionar extensa, sendo mais frequentemente diagnosticado devido a envolvimento cutâneo (formação de placas) (Jaffe E *et al.*, 2011).

A apresentação clínica pode consistir na presença de sintomas relacionados com o órgão envolvido, sobretudo nos casos Ocidentais ou então em falência multiorgânica, hepatoesplenomegalia, pancitopenia e síndrome hemafagocítico na variante Asiática. Em

ambas as formas de apresentação é comum a presença de *sintomas B* (Nakamura S *et al.*, 2008).

Imunofenotipicamente, muitos destes linfomas expressam CD5 e a maioria possui um fenótipo ABC. O diagnóstico pode ser difícil devido à sintomatologia diversa e à falta de evidência radiológica definitiva da doença (Jaffe E *et al.*, 2011).

- O *Linfoma efusional primário* caracteriza-se pela presença de grandes células bizarras e pleomórficas em efusões serosas nas cavidades corporais. Geralmente surge em doentes com imunodeficiência como na infecção VIH, pós-transplante renal e em idosos. As células malignas contêm o antígeno do HVH8 e também geralmente do EBV.

O diagnóstico pode ser dificultado pelo fenótipo peculiar das células neoplásicas que podem lembrar neoplasias não hematopoiéticas e pela falta de expressão de marcadores de células B e T (Shimizu T *et al.*, 2011).

- O *LDGC-B rico em células T/histiócito*: trata-se de uma variante morfológica do LDGC-B, contudo com características clínicas muito distintas. Representa menos de 10% de todos os LDGC-B e é mais frequente por volta dos 50 anos de idade.

Tem um comportamento agressivo, apresentando-se geralmente em estádios avançados, com envolvimento da MO, esplenomegalia e/ou hepatomegalia (Wolf-Peeters C *et al.*, 2008). Apresenta um padrão de crescimento micronodular substituindo o parênquima normal dos gânglios linfáticos. As células B encontram-se dispersas num fundo de pequenos linfócitos T e um número variável de histiócitos. Podem simular um LH de predomínio linfocítico ou mesmo assemelham-se a células RS ou células de Hodgkin (Figura 14). A presença de histiócitos é útil para diferenciar estes tumores (Wolf-Peeters C *et al.*, 2008; Jaffe E *et al.*, 2011)

No baço há um envolvimento multifocal ou micronodular da polpa branca e, no fígado, podem ser observados focos linfomatosos nos ramos da veia Porta (Wolf-Peeters C *et al.*, 2008).

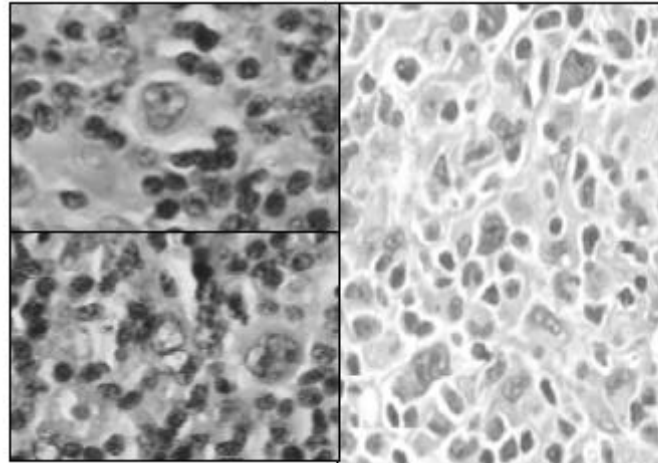


Figura 14 - LDGC-B rico em células T/histiócitos. Em cima, esquerda: células semelhantes a centroblastos. Em baixo, esquerda: células semelhantes a células de Hodgkin. À direita: células semelhantes a células de RS (Adaptado de Yang W *et al.*, 2005).

- O *LDGC-B EBV-positivo do idoso*: surge geralmente em doentes com mais de 50 anos de idade sem imunodeficiências associadas ou linfoma prévio. O comportamento clínico é agressivo, com apresentação extraganglionar frequente, e com mau prognóstico. Em alguns casos, a morfologia é semelhante ao LH clássico, contudo com melhor prognóstico nestes casos. O aparecimento deste tipo de linfoma parece estar relacionado com a imunosenescência que ocorre com o avanço da idade.

Apesar de muito mais frequente no idoso, pode ocorrer em doentes mais jovens associado a infecção primária pelo EBV.

Estes linfomas podem-se apresentar com úlceras mucocutâneas, resultantes da proliferação induzida pela infecção pelo EBV. As células frequentemente apresentam características histológicas (Figura 15) e um imunofenótipo semelhante as células do LH, com expressão de CD30, CD15 e, por vezes, CD20 (Jaffe E *et al.*, 2011).

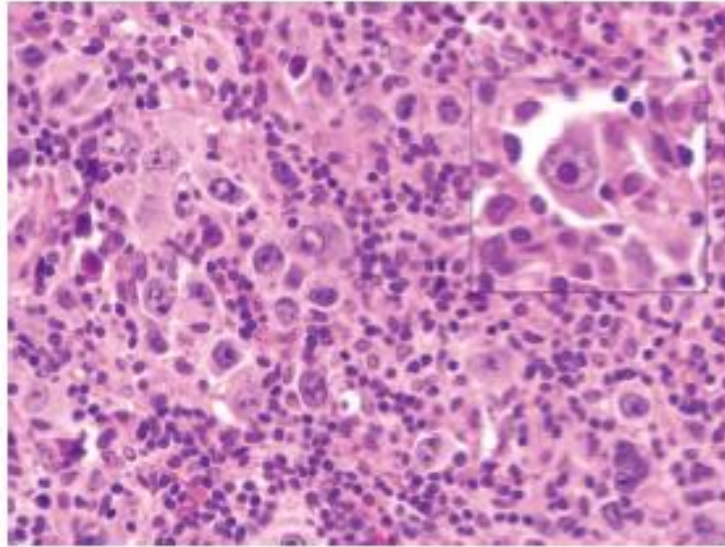


Figura 15 - Aspectos histológicos do LDGC-B EBV positivo do idoso. Observa-se grandes células linfóides, algumas com inclusões proeminentes (ampliação), sobre um fundo de linfócitos e histiócitos. As grandes células linfóides são EBV-positivas com evidenciado por técnicas de hibridização EBER *in situ* (não mostrado) (Adaptado de Jaffe E *et al.*, 2011).

3.1.6. PROGNÓSTICO

O prognóstico individual é muito variado, com uma taxa de sobrevivência aos 5 anos muito variável (30% a 80%), dependendo em grande parte de factores de risco clínicos e da sua heterogeneidade biológica, bem como da necessidade de tratamento adequado (Jong D *et al.*, 2011).

Como mencionado, para avaliar o prognóstico dos doentes foi desenvolvido em 1993 o Índice de Prognóstico Internacional (*International Prognosis Index – IPI*) para os linfomas agressivos, baseado na idade, estado geral, LDH sérica, número de locais extraganglionares envolvidos e estadiamento de Ann Arbor (Tabelas 4A e B) (Ekström-Smedby K, 2006), o qual foi modificado (revisto) com a introdução da terapêutica com Rituximab (Tabela 7).

Tabela 7 | Índice de Prognóstico Internacional (IPI) modificado.

Nº factores IPI	Score IPI	Prognóstico	Sobrevivência global (%)
0	0	Muito bom	94
1-2	1-2	Bom	79
3, 4 ou 5	3-5	Mau	55

(Adaptado de Dunleavy K *et al.*, 2009)

Antes da introdução do anticorpo monoclonal anti CD20 (Rituximab) no tratamento, a taxa de remissão no LDGC-B era de 50 a 60%. O IPI parece perder algum do seu valor preditivo em doentes tratados com Rituximab, pois nestes doentes o prognóstico melhorou significativamente. O envolvimento da MO parece associar-se a pior prognóstico (10% de sobrevivência aos 5 anos). Relativamente à morfologia, a variante imunoblástica está associada a um mau prognóstico, ao contrário das outras variantes.

A identificação dos subtipos de LDGC-B, com base em características moleculares, permitiu identificar diferentes grupos de risco, com sobrevivências distintas (Figura 16). Assim, o subtipo molecular GCB está associado a melhor prognóstico que o subtipo ABC, que tem um prognóstico reservado e menor sobrevivência global (Figura 16).

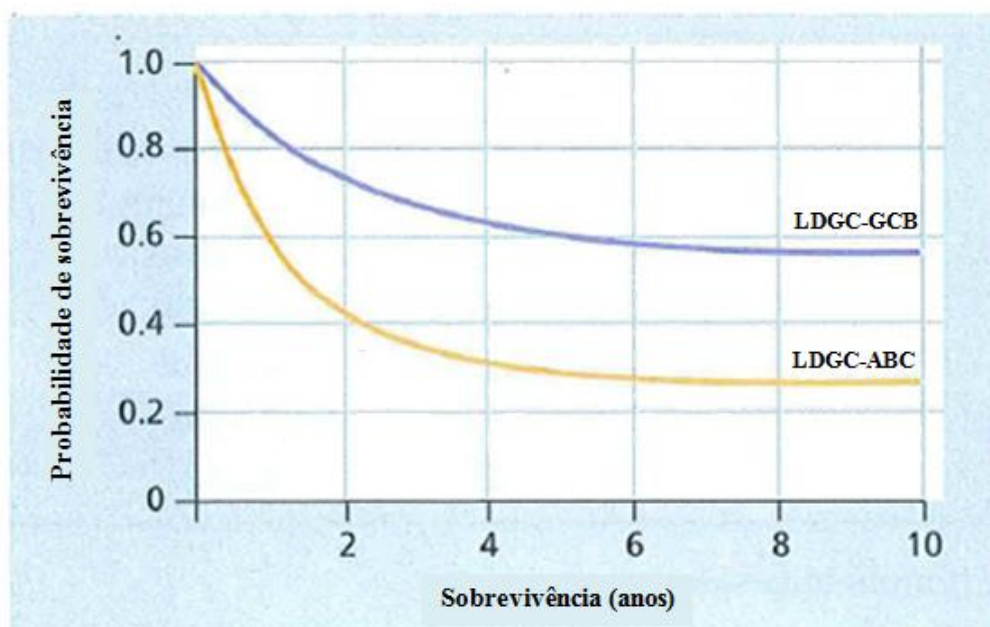


Figura 16 – Curvas de sobrevivência de doentes com LDGC-ABC e GCB. (Adaptado de Hoffbrand, 2011)

Além disso, a expressão de alguns marcadores imunohistoquímicos como CD10, BCL6 e LMO2 está associada a um prognóstico mais favorável, enquanto a expressão de BCL2, IRF/MUM1, ciclina D2 e D3, entre outros, associam-se a um prognóstico adverso. Um maior índice de proliferação Ki67 está também associado a pior prognóstico (Stein H *et al.*, 2008).

3.2. LINFOMA DE BURKITT

3.2.1. DEFINIÇÃO E ORIGEM

É um linfoma de células B altamente agressivo, de crescimento muito rápido, que geralmente se apresenta em locais extraganglionares ou como leucemia aguda.

Apresenta alguns aspectos morfológicos particulares bem como uma série de translocações envolvendo o gene *C-MYC* altamente características, contudo o diagnóstico só pode ser obtido com a combinação de várias técnicas que permitam um estudo global morfológico, imunofenotípico e genético (Leoncini L *et al.*, 2008).

A classificação da OMS reconhece a existência de três variantes clínicas do linfoma de Burkitt, Endêmico, Esporádico e Associado a imunodeficiência (Yang W *et al.*, 2005),

3.2.2. EPIDEMIOLOGIA

- **Linfoma de Burkitt Endêmico:**

O linfoma de Burkitt endêmico é a neoplasia pediátrica mais frequente na África equatorial e Nova Guiné, apresenta um pico de incidência entre os 4 e os 7 anos, sendo mais frequente no sexo masculino (2:1).

Verifica-se uma correlação entre a ocorrência geográfica e alguns factores climáticos (elevada precipitação, baixa altitude), correspondente à distribuição da malária holoendémica (*Plasmodium falciparum*) (Leoncini L *et al.*, 2008).

- **Linfoma de Burkitt Esporádico:**

O linfoma de Burkitt esporádico distribui-se por todo o mundo com baixa incidência, correspondendo a cerca de 1 a 2% dos linfomas nos adultos e 30 a 50% nas crianças, na Europa Ocidental e EUA. (Ferry J, 2006)

A idade média dos doentes adultos é 30 anos, sendo o LNH mais frequente em crianças e adolescentes. É mais frequente no sexo masculino, em todos os grupos etários (Leoncini L *et al.*, 2008).

- **Linfoma de Burkitt associado a Imunodeficiência:**

O linfoma de Burkitt associado a imunodeficiência corresponde a 30-40% dos LNH em doentes VIH positivos (Ferry J, 2006), ocorrendo frequentemente como manifestação inicial da SIDA (Leoncini L *et al.*, 2008). Surge também em doentes pós-transplantes e com imunodeficiência congénita. (Ferry J, 2006)

3.2.3. ETIOLOGIA

O evento transformante fundamental no Linfoma de Burkitt envolve a translocação do gene *C-MYC*. Contudo, existem outros factores que contribuem para a origem e manutenção da neoplasia como a infecção por EBV, a malária, a imunodeficiência e mutações somáticas espontâneas (Brady G *et al.*, 2007).

Estas variantes clínicas são histologicamente semelhantes contudo variam na associação com o EBV. O genoma do EBV é encontrado em mais de 95% dos casos endémicos (Brady G *et al.*, 2007).

A infecção primária pelo EBV estimula fortemente a proliferação de células B, sendo normalmente subclínica e adquirida na infância. Esta persiste depois como infecção latente assintomática nas células B de memória, mantida sob controlo pelas células T do hospedeiro. (Njie R, *et al.*, 2009)

O EBV pode apresentar três padrões diferentes de expressão de genes latentes (Brady G *et al.*, 2007). Os linfomas de Burkitt EBV positivos apresentam o fenótipo de latência I com expressão de EBNA-1 e EBERs, mas negativo para LMP, que contribuem para a patogénese do LB bloqueando a apoptose (Brady G *et al.*, 2007; Jaffe E *et al.*, 2011). A proteína EBNA-1 pode induzir a formação de ROS conduzindo à instabilidade genética (Sumba P *et al.*, 2010). Um segundo factor de risco no LB endémico é a infecção por *P. falciparum*, verificando-se uma forte ligação epidemiológica com a malária holoendémica, predispondo para o LB-EBV positivo (Njie R *et al.*, 2009). Este facto prejudica o controlo mediado pelas células T citotóxicas sobre o crescimento das células B anteriormente infectadas por EBV, verificando-se uma carga de EBV periférica cerca de 5 vezes superior durante a malária aguda comparando com os níveis observados na convalescença ou em pessoas saudáveis (Brady G *et al.*, 2007). Isto apoia a evidência de que os LB EBV positivos se originam das células B de memória (Leoncini L *et al.*, 2008).

Além disso, o *P. falciparum*, pode activar directamente a proliferação de células B via C1DR1alfa na PfEMP1 (proteína-1 da membrana do eritrócito) do *P. falciparum*, que liga a Ig de superfície, com subsequente protecção da apoptose, melhorando a sobrevivência das células B centro germinativo e suportando mutações oncogénicas. Além da activação de células B, é possível que também a proliferação das células B seja melhorada pela IL-10 cujos

níveis no soro estão aumentados em crianças com malária aguda comparada com controlos saudáveis (Brady G, *et al.*, 2007).

Os LB esporádicos estão menos consistentemente associados a infecção por EBV. Cerca de 5 a 10% dos casos são EBV positivos (Brady G, *et al.*, 2007), podendo variar de acordo com factores geográficos e o *status* sócio-económico, entre outros (Ferry J 2006; Njie R *et al.*, 2009).

Cerca de 30% a 40% dos casos associados a Imunodeficiência por VIH são EBV positivos (Brady G *et al.*, 2007).

No primeiro ano de infecção por VIH, o número de células B infectadas por EBV na sua forma latente aumenta no sangue sem evidência de um prejuízo acentuado da contagem de células T CD4+. Isto sugere que a imunossupressão por si só não explica o risco aumentado de LB (Leoncini L *et al.*, 2008).

Um potencial mecanismo de ligação entre LB endémico associado a imunodeficiência por VIH é a activação policlonal de células B que ocorre após a infecção por malária e VIH (Brady G *et al.*, 2007).

Assim, o diagnóstico de linfoma de Burkitt num doente VIH positivo representa, geralmente, o primeiro critério definidor de SIDA (Ferry J, 2006).

3.2.4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Devido à elevada taxa mitótica e conseqüente rápido crescimento tumoral (“bulky”) num curto espaço de tempo, os sintomas são normalmente reportados em apenas algumas semanas e variam de com o subtipo e com o local envolvido. Os doentes pediátricos com linfoma de Burkitt são estadiados de acordo com o sistema de Murphy *et al.* Cerca de 70% dos doentes apresentam-se na altura do diagnóstico em estádios avançados da doença (III e IV) (Leoncini L *et al.*, 2008).

- **Linfoma de Burkitt Endémico:**

O doente com este tipo de linfoma, tipicamente uma criança, tem como local de apresentação, em 50% dos casos, a mandíbula e outros ossos da face (órbita) (Figura 17).

Nos restantes casos a apresentação pode ocorrer em outros locais extraganglionares como o ileon distal, cego, omento, rins, gónadas, ossos longos, tiróide, glândulas salivares ou mamas (com ou sem envolvimento da mandíbula).

Apesar de poder atingir a medula óssea, não se manifesta como leucemia no sangue periférico (Leoncini L *et al.*, 2008).



Figura 17 - Criança com Linfoma de Burkitt. Edema facial característico por envolvimento extenso da mandíbula (Adaptado de Hofbrand, 2011).

- **Linfoma de Burkitt Esporádico:**

No linfoma de Burkitt Esporádico, o envolvimento da mandíbula é muito raro. De facto a maioria dos doentes (criança e adultos) apresenta-se com massas abdominais (Yang W *et al.*, 2005).

A região ileocecal é o local mais frequentemente envolvido. Também pode atingir os ovários, rins, omento e, mais raramente, estruturas do anel de Waldeyer e mediastino.

Pode ocorrer envolvimento bilateral e massivo da mama no início da puberdade, gravidez ou lactação. A presença de massas retroperitoneais pode causar compressão da espinhal medula e paraplegia. Podem ainda ocorrer efusões pleurais malignas ou ascite.

O envolvimento dos gânglios linfáticos é mais comum em adultos que em crianças.

Raramente se apresenta como leucemia primária (nestes casos classificada como ALL, L3 pelo sistema de classificação FAB) (Ferry J, 2006; Leoncini L *et al.*, 2008).

- **Linfoma de Burkitt associado a Imunodeficiência:**

O linfoma de Burkitt associado a imunodeficiência frequentemente atinge os gânglios linfáticos, abdómen, medula óssea e SNC (Brady G *et al.*, 2007; Leoncini L *et al.*, 2008).

3.2.5. CARACTERÍSTICAS E PATOGÉNESE MOLECULAR

Características Morfológicas

As células características do LB são monomórficas, de tamanho médio, (Leoncini L *et al.*, 2008) e apresentam um citoplasma moderadamente abundante, profundamente basofílico (como é rico em RNA cora de azul escuro com Giemsa ou coloração de Wright) e com múltiplos vacúolos lipídicos. Pode haver retracção citoplasmática na fixação com formalina

levando a bordos tipo quadrado entre células vizinhas (Ferry J, 2006). Além disso, têm um núcleo redondo uniforme com cromatina fina e pequenos nucléolos múltiplos e basofílicos (Ferry J, 2006).

Apresenta um padrão de crescimento coesivo, difuso e monótono, com uma fracção de proliferação extremamente elevada o que condiciona a presença de múltiplas figuras mitóticas bem como elevada fracção de apoptose, abundantes corpos apoptóticos e macrófagos. Isto vai criar uma aparência em “céu estrelado” (Figura 18), em que numerosos macrófagos fagocitam os abundantes restos apoptóticos das células tumorais (Leoncini L *et al.*, 2008).

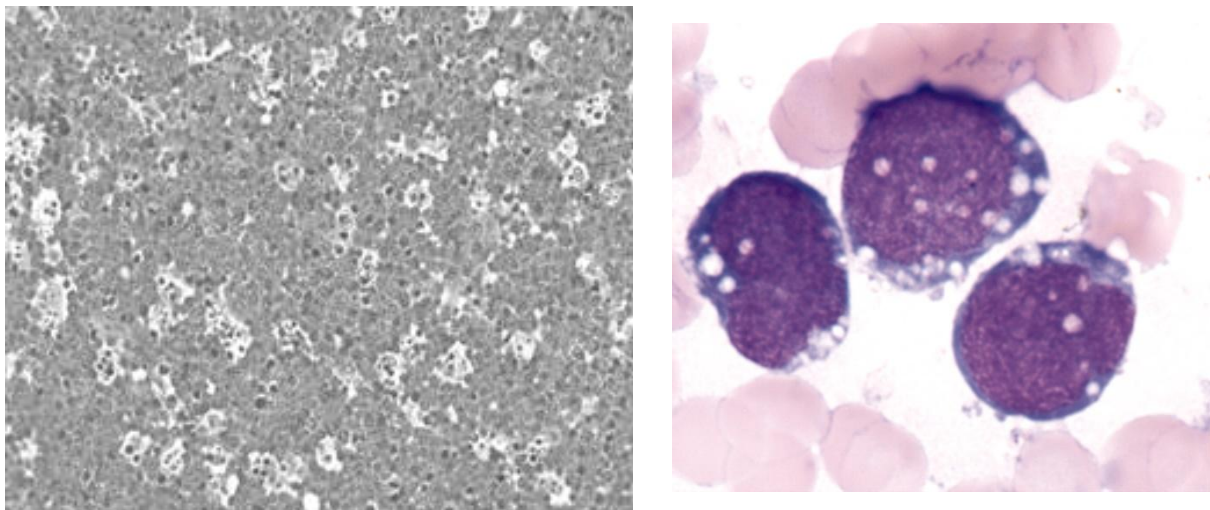


Figura 18 - Aspectos morfológicos do Linfoma de Burkitt. Em **A)** é evidente o aspecto em “céu estrelado”; em **B)** observa-se células com acentuada basófilia e e abundantes vacúolos lipídicos no citoplasma (Adaptado de Yang W *et al.*, 2005).

Contudo existem casos classificados como LB que apresentam uma morfologia atípica, apresentando grande pleomorfismo nuclear e que tendem a possuir menor número de nucléolos (muitas vezes um único central), contudo mais proeminentes (Figura 19).

Esta morfologia atípica (Figura 19) ocorre essencialmente nas duas variantes do LB clássico descritas pela OMS e associadas a pior prognóstico, o LB com diferenciação plasmocitóide

(associado sobretudo a imunodeficiência) e o linfoma de células B, inclassificável, com características intermediárias entre o LDGC-B e o LB (muitos dos casos de LB esporádicos em adultos) (Ferry J, 2006).

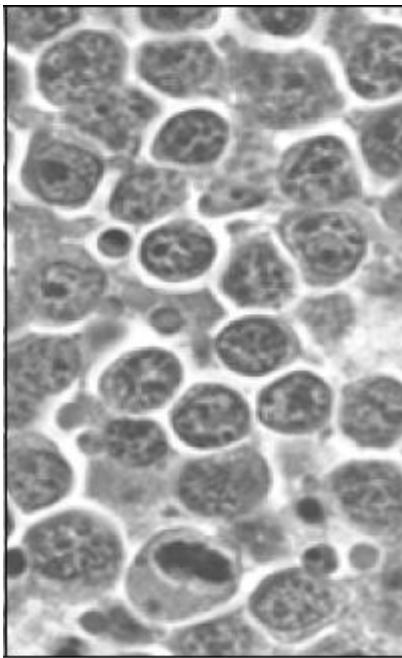


Figura 19 - Características morfológicas atípicas de Linfoma de Burkitt. Observa-se variante atípica com menor uniformidade e nucléolo proeminente (Adaptado de Yang W *et al*, 2005)

Imunohistoquímica

A expressão de IgM de superfície, de marcadores de células B como CD19, CD20, CD22, CD79a e de centroblastos do centro germinativo como CD10, BCL6 e proteína HGAL estão habitualmente presentes no LB. No entanto, tipicamente não expressa TdT, BCL2, CD5, CD23 nem CD138 (Ferry J, 2006; Brady G *et al.*, 2007; Cho B, 2011). Apresenta ainda uma elevada percentagem de células positivas para Ki67 (> 90%), devido à elevada taxa de proliferação (Kurita N *et al.*, 2011).

Características Genéticas

O diagnóstico de LB requer a evidência molecular (FISH) de uma translocação isolada envolvendo o gene *C-MYC* (Yang W *et al.*, 2005), a qual está virtualmente presente em 100% dos casos (Jaffe E *et al.*, 2011).

De facto, no LB, a translocação envolvendo o gene *C-MYC* é considerada um evento primário, apresentando um cariótipo simples com poucas anomalias ao contrário dos restantes linfomas em que a presença de uma translocação *C-MYC* ocorre como um evento secundário (Jaffe E, *et al.*, 2011).

Normalmente a translocação ocorre entre o gene *C-MYC* e um dos três genes que codificam as cadeias das imunoglobulinas, sendo a mais comum (80% dos casos) a t(8;14)(q24;q32) que envolve o gene da cadeia pesada da Ig (IgH). Nos restantes 20% dos casos, pode ocorrer a t(2;8)(p12;p24) com o gene da cadeia leve kappa da Ig (IGK) ou a t(8;22)(q24;q11) com o gene da cadeia leve lambda da Ig (IGL) (Cho B, 2011).

Como mencionado, o linfoma de Burkitt endémico origina-se de uma célula B derivada do centro germinativo ou de memória, uma vez que se verifica que as células tumorais passaram por hipermutação somática, processo que ocorre no centro germinativo.

O ponto de rotura no gene da Ig para o qual é translocado o gene *C-MYC* no LB endémico ocorre na região V(D)J, sugerindo que essa translocação ocorre durante o processo de recombinação V(D)J (Brady G *et al.*, 2007).

Em contraste, esse mesmo ponto de rotura no LB esporádico e associado a VIH ocorre na região de troca de classe, que tal como a hipermutação somática se processa no centro germinativo. Tendo isto em conta e o facto de as células do LB expressarem os marcadores de centroblastos do centro germinativo, a sua célula progenitora provavelmente tem origem de células B sujeitas a rearranjos cromossómicos no centro germinativo (Brady G *et al.*, 2007).

Existem algumas evidências que a célula de origem pode ser uma célula B pós centro germinativo ou uma célula B de memória que retorna ao centro germinativo, podendo diferir nos tumores EBV positivos e negativos (Brady G *et al.*, 2007).

3.2.6. PROGNÓSTICO

Apesar de serem linfomas altamente agressivos, são potencialmente curáveis.

A combinação de regimes de quimioterapia intensiva permite obter taxas de cura até 90% em doentes com doença em estádios mais baixos e de 60-80% em doentes com doença avançada (Leoncini L *et al.*, 2008).

Os factores de mau prognóstico incluem (Leoncini L *et al.*, 2008; Miles R *et al.*, 2012):

- Idade avançada e, nos doentes pediátricos, idade superior a 15 anos;
- Mau estado geral;
- massa tumoral superior a 10cm de diâmetro (“bulky”);
- Estádio avançado da doença;
- LDH sérica superior ou igual a 2 vezes o limite superior normal na altura do diagnóstico;
- Envolvimento da medula óssea e do SNC;
- Resposta pobre à ciclofosfamida, vincristina e prednisona;
- Falência em atingir resposta completa ao tratamento;
- Citogenética evidenciando a presença da translocação do gene *C-MYC* ou translocações duplas envolvendo o gene *C-MYC* e *BCL2* (pior prognóstico).

Por outro lado, são factores de bom prognóstico (Leoncini L *et al.*, 2008; Miles R, *et al.*, 2012):

- Doença abdominal ressecável;
- Resposta granulomatosa ao linfoma (associada a doença localizada).

3.3. LINFOMA DE CÉLULAS B, INCLASSIFICÁVEL, COM CARACTERÍSTICAS INTERMÉDIAS ENTRE O LDGC-B E O LB

3.3.1. DEFINIÇÃO E ORIGEM

São linfomas extremamente agressivos, podem surgir “de novo” ou resultar da transformação de outro linfoma (Yang W *et al.*, 2005).

Em 2001, a OMS classificava estes tumores como “LB atípico/LB-like” e pensava-se que representavam um contínuo entre o LB e o LDGC-B. A estratégia terapêutica ótima para esta entidade não estava definitivamente estabelecida.

Contudo, a recente incorporação de dados da genética molecular na classificação da OMS, em 2008, possibilitou alguns refinamentos com implicações terapêuticas significantes, incluindo uma nova designação para estes tumores "Linfoma de células B, inclassificável, com características intermediárias entre o LDGC-B e o LB" (Kluin P *et al.*, 2008; Thomas D *et al.*, 2011).

Estes linfomas apresentam características morfológicas e genéticas intermediárias entre o LDGC-B e o LB e uma grande heterogeneidade clínica e prognóstica (Figura 20) (Kurita N, *et al.*, 2011).

3.3.2. PATOGÉNESE MOLECULAR E DIAGNÓSTICO

Características Morfológicas

Relativamente à morfologia mostram maior pleomorfismo e células maiores que o LB típico sobrepondo-se em parte ao espectro morfológico do LDGC-B (Thomas D *et al.*, 2011)

contudo, geralmente, mantém o padrão “céu-estrelado” do LB, com abundantes figuras mitóticas e corpos apoptóticos.

Imunohistoquímica e características genéticas

As técnicas de imunohistoquímica mostram algumas diferenças fenotípicas relativamente ao LB, uma vez que expressam BCL2, enquanto na maioria o BCL6 está ausente.

Tal como no LB, a determinação do Ki67 geralmente mostra que a quase totalidade das células neoplásicas se encontram em ciclo celular, com uma elevada taxa de proliferação.

Assim, quando confrontados com um linfoma difuso de células B de alto grau cuja morfologia e imunofenotipagem sugerem LB, devem ser efectuados estudos citogenéticos com técnicas de Banda G e FISH. Estas revelam a ocorrência de translocações *IgH/c-C-MYC* semelhantes às que ocorrem na quase totalidade dos casos de LB mas apenas em cerca de 10% LDGC-B. Apresentam contudo um cariótipo complexo com elevado número de outras anomalias citogenéticas, sendo o rearranjo do gene *C-MYC* considerado um evento secundário, o que não se verifica no LB clássico.

Estes tumores podem apresentar também a translocação do gene *BCL2*, na maioria dos casos com o gene da cadeia pesada da Ig– $t(14;18)(q32;q21.3)$, característica do LDGC-B e do linfoma folicular, mas não do LB clássico.

A presença daquelas duas translocações na mesma célula (*IgH/c-C-MYC* e *IgH/BCL2* – recebendo também a designação de linfomas "double hit") ocorre em apenas 2% de todas as neoplasias de células B (Tomita N, 2011) e explica a quimioresistência destes linfomas. De facto, o papel do *C-MYC* na estimulação da proliferação celular e do *BCL2* na inibição da apoptose, além da supressão da reparação do ADN por um mecanismo desconhecido

envolvendo *C-MYC*, são mecanismos que podem contribuir para resistência à terapêutica neste tipo de linfomas.

Normalmente estes casos apresentam-se em estádios avançados da doença, muitas vezes acompanhado por envolvimento extranodal (93%) e do SNC (56%), bem como da medula óssea, presença de sintomas B e níveis séricos de LDH elevados (Kurita N *et al.*, 2011).

Na figura 20 estão representadas as principais características morfológicas e imunofenotípicas que permitem fazer o diagnóstico diferencial entre linfoma de Burkitt, o linfoma de Células B inclassificável com características intermédias entre o linfoma de Burkitt e o e linfoma Difuso de Grandes Células B (*B-UNC/BL/DLBCL*), e o linfoma Difuso de Grandes Células B (subtipo GCB).

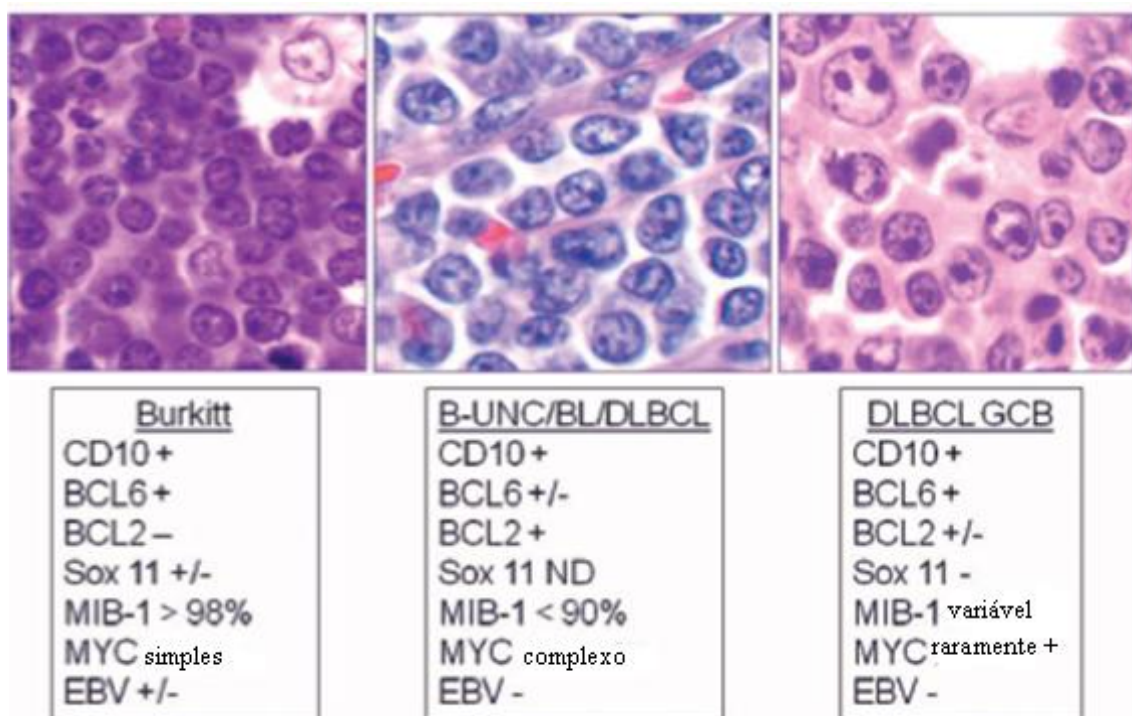


Figura 20 - Características morfológicas e imunofenotípicas do Linfoma de Burkitt, Linfoma de Células B inclassificável com características intermédias entre o Linfoma de Burkitt e o e Linfoma Difuso de Grandes Células B (*B-UNC/BL/DLBCL*), e o Linfoma Difuso de Grandes Células B (subtipo GCB) (Adaptado de Jaffe E *et al.*, 2011).

3.3.3. PROGNÓSTICO

O prognóstico destes linfomas não é favorável, especialmente nos casos em que existem as duas translocações anteriormente referidas na mesma célula. Aqueles que atingem a remissão completa tendem a recair num curto período de tempo (Tomita N, 2011). Verifica-se uma sobrevivência média de 6 meses e uma taxa de sobrevivência ao fim de 1 ano de cerca de 22% (Kurita N *et al.*, 2011).

Assim, estes linfomas devem ser correctamente diagnosticados, através da integração completa das duas características morfológicas, imunofenotípicas e genéticas (Steere J *et al.*, 2006), já que vai ter implicações em termos de prognóstico e de tratamento, podendo beneficiar com regimes mais agressivos de quimioterapia (Wu D *et al.*, 2010).

Vários estudos retrospectivos sugerem que estes linfomas respondem mal à terapêutica quando são instituídos regimes usados no tratamento do LDGC-B (ex. regimes R-CHOP) em vez dos utilizados no LB. (Thomas D *et al.*, 2011). O papel do transplante autólogo de células estaminais no tratamento destes linfomas permanece pouco claro, com poucos casos estudados (Tomita N, 2011).

3.4. LINFOMA LINFOBLÁSTICO DE CÉLULAS B PRECURSORAS

3.4.1. DEFINIÇÃO E ORIGEM

O linfoma linfoblástico de células B precursoras (LL-B) é um linfoma incomum, altamente agressivo, representando cerca de 2% de todos os LNH (Cho S *et al.*, 2011). É uma neoplasia de células linfóides imaturas e corresponde ao equivalente sólido da leucemia linfoblástica aguda (LLA) (Maitra A *et al.*, 2001).

Enquanto 85% dos casos de LLA são da linhagem B, apenas 10% dos LL-B expressam marcadores de células B, sendo que os restantes 90% têm o fenótipo de células T imaturas.

Os critérios usados para distinguir o LL-B da LLA são (Maitra A *et al.*, 2001):

- Envolvimento focal da medula óssea (inferior a 25%) ou ausente;
- Manifestação como massas “bulky” em órgãos sólidos;
- Ausência de envolvimento do sangue periférico.

Estes linfomas podem surgir “de novo” ou serem tumores secundários após um diagnóstico inicial de linfoma Folicular (L Leoncini *et al.*, 2005).

3.4.2. EPIDEMIOLOGIA E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

O LL-B ocorre mais frequentemente na infância e, na maioria dos casos, apresentam-se com envolvimento extraganglionar, poupando a medula óssea. O local mais atingido é a pele, seguindo-se os gânglios linfáticos e o osso e, mais raramente, o mediastino.

Embora a pele seja o local mais atingido, o LL-B cutâneo primário (e não secundário a doença sistêmica) é muito raro e quase exclusivo em crianças e jovens adultos. A sua localização mais frequente é a região da cabeça e pescoço (Cho S *et al.*, 2011).

3.4.3. CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS E PATOGÊNESE MOLECULAR

Características Morfológicas

Relativamente à morfologia, podem ser observadas camadas de células de tamanho pequeno a médio, com citoplasma extremamente escasso, perfil nuclear irregular, cromatina

fina e nucléolo quase indistinto (Figura 21). São visíveis numerosas figuras mitóticas e corpos apoptóticos, o que atrai numerosos macrófagos. (Maitra A *et al.*, 2001).

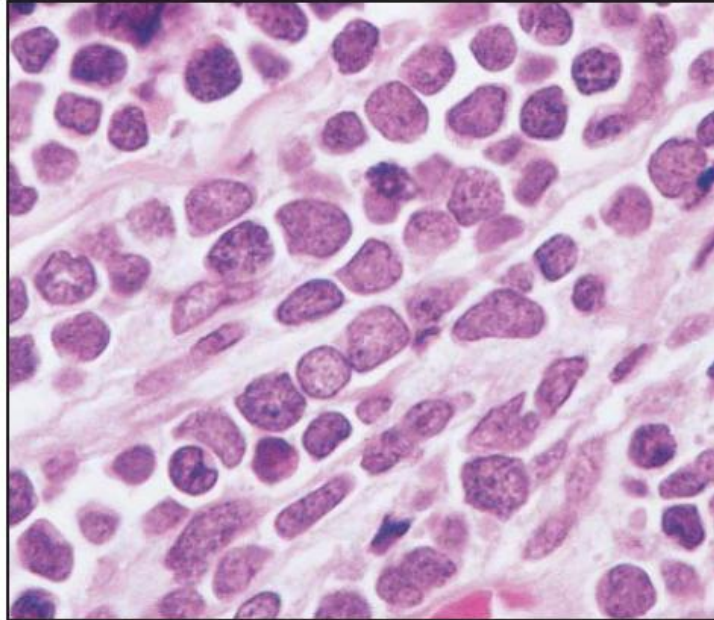


Figura 21 - Aspectos morfológicos de LL-B. A figura mostra linfoblastos uniformes, de tamanho médio, com núcleo redondo a irregular, cromatina fina e nucléolo quase indistinto (Adaptado de Maitra A *et al.*, 2001).

Imunohistoquímica

Pela imunohistoquímica é possível verificar que as células do LL-B expressam, na maioria dos casos, CD19, CD79a, CD10, CD22, CD24, PAX5 e TdT. Como o LL-B e a LLA derivam de linfócitos primitivos, frequentemente não expressam marcadores comumente encontrados em outras formas maduras de linfoma como LCA, CD20 e CD3. A expressão de CD20 e CD34 é variável (Yang W, *et al.*, 2005; Cho S, *et al.*, 2011). Por outro lado, o CD99 é um marcador presente na maioria dos casos e parece específico para este tipo de linfoma (Lucas D *et al.*, 2001).

3.4.4. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

O LL-B faz diagnóstico diferencial com LL células T, LB, variante blastóide, linfoma de células do Manto (Yang W, *et al.*, 2005), bem como com outros tumores de pequenas células redondas em especial Sarcoma de Edwing (SE), mas também neuroblastoma, rabdomiossarcoma, tumor Wilm's, entre outros (Cho S *et al.*, 2011).

Pode ser difícil distinguir entre linfoma linfoblástico do osso e SE pois têm características morfológicas e imunohistoquímicas que se sobrepõem. Contudo esta distinção é muito importante pois o comportamento clínico e o tratamento são muito diferentes. (Lucas D *et al.*, 2001)

Ambos ocorrem frequentemente em crianças manifestando-se quase sempre como um tumor ósseo solitário. A presença de multifocalidade ou metástases em "skip" é mais compatível com LL-B ou LLA, apesar de por vezes serem vistas no SE.

As células malignas são pequenas e uniformes, têm um padrão de crescimento difusamente infiltrativo podendo formar estruturas tipo roseta. No caso do SE, o núcleo geralmente é mais redondo e hipercromático e o citoplasma mais abundante, muitas vezes rico em glicogénio (Figura 22). (Lucas D *et al.*, 2001)

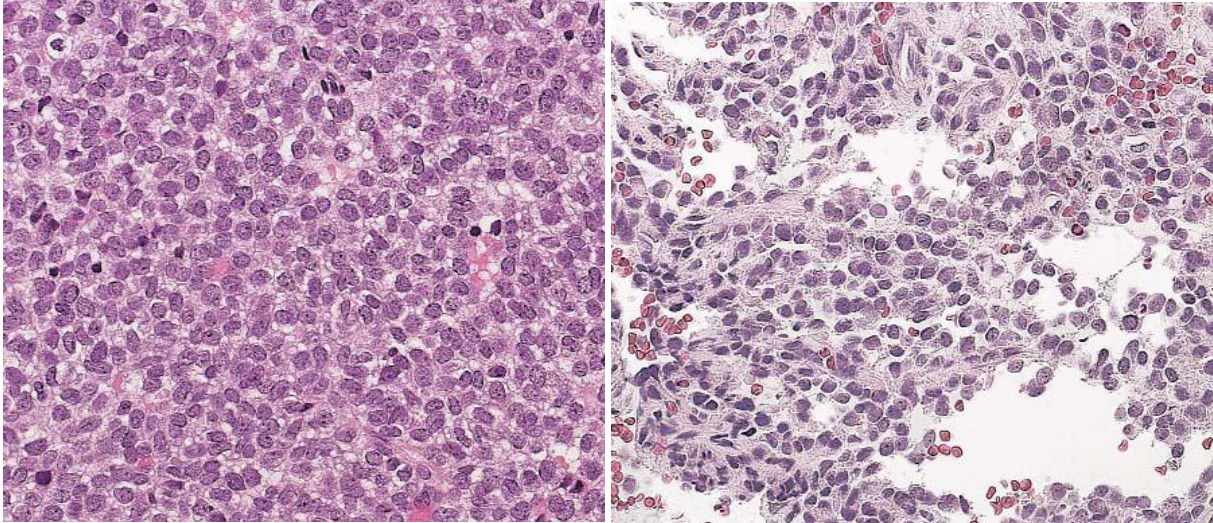


Figura 22 - Características morfológicas do, sarcoma de Ewing (esquerda) e de LL-B (direita). No sarcoma de Ewing as células tendem a ser mais hiper Cromáticas, com núcleo redondo e citoplasma mais abundante e, por vezes, vacuolizado. No LL-B, as células apresentam núcleo redondo uniforme, imitando o sarcoma de Ewing. (Adaptado de Lucas D *et al.*, 2001)

Imunohistoquimicamente o LL-B imita o SE sendo a expressão CD99 (específico para este tipo de linfoma) em combinação com a presença de TdT (ausente no SE) o melhor discriminador. Além disso, o SE é caracteristicamente positivo para a Vimentina.

Recorrendo à citogenética, é frequente encontrar no SE a translocação t(11;22) com a fusão *EWS/FLI-1*. Já o LL-B/LLA apresenta rearranjos do gene das Igs ou do receptor de células T (TCR) (Lucas D *et al.*, 2001)

3.5. LINFOMA DE CÉLULAS DO MANTO

3.5.1. DEFINIÇÃO E ORIGEM

O linfoma de células do manto (LCM) constitui 5 a 10% de todos os casos de LNH. É considerado um linfoma agressivo visto que a sobrevivência média é de 3 a 5 anos, estando assim associado a mau prognóstico. (Seok Y *et al.*, 2012).

Trata-se de uma neoplasia de células B (células linfoides pequenas a médias, semelhantes a centrócitos), com origem em células B periféricas da zona interna do manto (pré- centro germinativo) (Figura 2).

Apresenta algumas variantes morfológicas, sendo a variante blastóide a que está associada a maior agressividade, ocorrendo em 10 a 20% dos doentes com LCM. (Seok Y *et al.*, 2012).

3.5.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, LABORATORIAIS E PATOGÉNESE MOLECULAR

Características Clínicas

A maior parte dos doentes na altura do diagnóstico estão no estágio III ou IV, e apresentam adenopatias, hepatoesplenomegália e envolvimento da MO e do sangue periférico (é comum em quase todos os doentes). Alguns doentes apresentam linfocitose acentuada, mimetizando uma leucemia pró-linfocítica (LPL) (Swerdlow SH *et al.*, 2008).

Características Morfológicas

A morfologia mais comum do LCM consiste em células de tamanho pequeno a médio, com citoplasma pouco abundante ligeiramente basofílico e núcleo indentado com cromatina moderadamente dispersa e um pequeno nucléolo central. São frequentemente encontrados depósitos perivascularares de material hialino e histiócitos acidofílicos. Mais raramente, o LCM pode apresentar pequenas células redondas, elementos blastóides ou população polimórfica podendo ser confundido com LL-B/LLA ou LDGC-B, respectivamente (Figura 23) (Pileri S *et al.*, 2000)

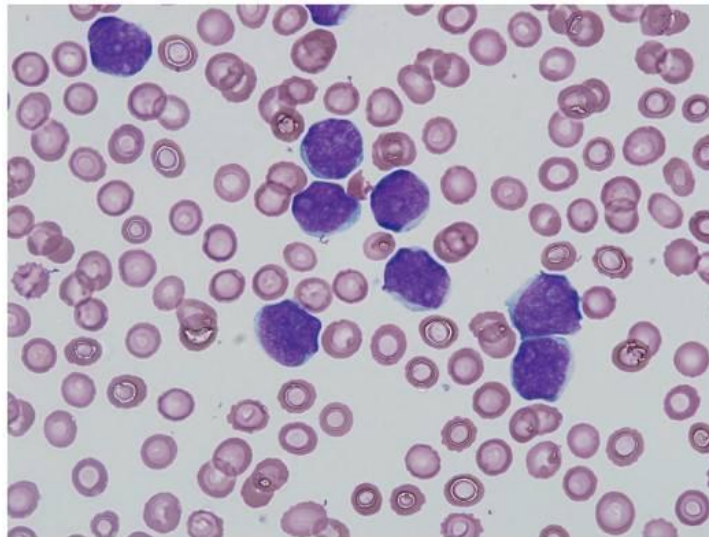


Figura 23 - Amostra de sangue periférico evidenciando um grande número de células blastóides de tamanho médio a grande com núcleo polimorfo e citoplasma basofílico (coloração May Grünwald Giemsa, ampliação x1000) (Adaptado de Seok Y *et al.*, 2012).

Imunohistoquímica

O diagnóstico é feito baseado na imunohistoquímica pela detecção de Ciclina D1 que, em contexto apropriado e excluindo mieloma múltiplo e leucemia de células cabeludas, é um marcador altamente específico de LCM.

Além disso as células do LCM normalmente expressam outros marcadores de células B como CD19, CD20, CD22, CD79a e ainda BCL2, CD5 e/ou CD43 e são negativas para BLC6, CD10, CD23, CD68 e CD72. Ocasionalmente expressam IRF4. (Pileri S *et al.*, 2000; Swerdlow SH *et al.*, 2008).

Características Genéticas

O marcador genético deste tipo de linfoma é a identificação da translocação t(11;14)(q13;q32). Esta ocorre em 70% dos casos e provoca a justaposição do gene *IGH* localizado no cromossoma 14q32 com o gene *BCL1/CCND1* no cromossoma 11q13, com activação constitucional do *CCND1* e desregulação do ciclo celular. Este rearranjo do gene *BCL1* é muito característico do LCM mas não é patognómico, podendo ocorrer em outros tipos de linfomas (Seok Y. *et al.*, 2012). Nos linfomas em que esta translocação está presente, a clínica pode ser caracterizada por esplenomegália e elevada linfocitose periférica, sobrepondo-se às características da leucemia prolinfocítica. (Leoncini L *et al.*, 2005).

Acredita-se contudo que a expressão desregulada do *CCND1* não é suficiente, por si só, para induzir a transformação maligna das células linfóides. Estudos moleculares mostram outras aberrações genéticas na maioria dos casos, tais como a translocação t(8;14)(q24;q32) envolvendo o gene *C-MYC*, como alteração cariotípica secundária, como ocorre em outros LNH. A expressão exagerada de *C-MYC* está associada a pior prognóstico, maior agressividade, menor resposta ao tratamento e menor taxa de sobrevivência. A combinação da translocação t(11;14) e t(8;14) tem um efeito sinérgico na progressão do LCM (Seok Y, *et al.*, 2012).

O gene *SOX11* tem também expressão aberrante no LCM, bem como no LL-B/LLA e LB. A sua expressão é independente da ciclina D1 e provavelmente não se deve a uma translocação (Dictor M. *et al.*, 2009). A expressão de SOX11 pode ser útil na identificação

dos LCM blastóides ciclina D1 negativos (Zeng W *et al.*, 2012). Alterações oncogénicas em genes envolvidos na reparação do ADN e na regulação do ciclo celular têm também sido referidas. Assim, mutações inactivadoras do gene *ATM* (11q22-23) têm sido identificadas em 40 a 75% dos LCM. Além disso, as variantes de LCM com elevado índice de proliferação apresentam normalmente mutações do gene *TP53*, deleções homocigóticas do gene *INK4a/ARF*, inibidor das cinases dependentes de ciclina (CDK) *p18INK4c*, amplificações e aumento da expressão de genes da família *p16* e *CDK4* e por vezes microdeleções do gene *pRB* (Swerdlow SH *et al.*, 2008).

3.5.3. PROGNÓSTICO E DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

O prognóstico do LCM é reservado, apresentando uma sobrevivência média de cerca de 3 a 5 anos (Hoffbrand A.V. *et al.*, 2008).

Como mencionado, a variante blastóide, o envolvimento do sangue periférico (pelo menos nos doentes com adenopatias), a presença de trissomia do cromossoma 12, cariótipos complexos, o aumento da expressão de p53 e o alto índice mitótico, conferem pior prognóstico. Os ganhos nos cromossomas 3q e deleções do 9q estão associadas com pior prognóstico, independentemente da fracção proliferativa. Por outro lado, os doentes com envolvimento do sangue periférico, MO e baço, mas sem adenopatia, parecem ter melhor prognóstico (Swerdlow SH *et al.*, 2008).

O diagnóstico diferencial deve ser feito com os outros linfomas/leucemias de células maduras e pequenas, como a fase leucémica do LF, a LLC, o linfoma linfoplasmocítico (LLP), o linfoma de células da zona marginal, a leucemia pró-linfocítica (LPL) e a leucemia de células cabeludas. (Pileri S *et al.*, 2000) Estas doenças podem ser distinguidas do LCM

com base na clínica, características morfológicas, imunofenótipo, citogenética e anomalias moleculares (Herishanu Y, et al, 2005). Na tabela 8 está representado o diagnóstico diferencial do LCM com outras doenças linfoproliferativas de acordo com as características imunofenotípicas.

Tabela 8 | Diagnóstico diferencial das doenças linfoproliferativas baseado no imunofenótipo

Antigénio	LLC-B	LCM	LEZM	LF	LCC	LPL
sIg	Fraca	++	++	++	+++	+++
CD5	++	++	-/+	-	-	-/+
CD20	Fraca	++	++	++	+++	+++
CD23	++	-	+/-	-	-	-/+
FMC7	-/+	+	++	++	++	++
CD22	-/+	++	++	++	+++	++
CD10	-	-	-/+	+/>++	-	-/+
CD25	-/+	-	+/-	-	+++	+/-
CD103	-	-	+/-	-	+++	-
CD11c	-/+	-	+/-	-	++	-/+

sIg – imunoglobulina de superfície; LCM – Linfoma de Células do Manto; LEZM – Linfoma Esplénico da Zona Marginal; LF – Linfoma Folicular; LCC – Leucemia de Células Cabeludas; LPL – Leucemia pró-linfocítica. (adaptado de Herishanu Y *et al*, 2005; Lopes A, 2009)

3.6. LINFOMA DE GRANDE CÉLULAS ANAPLÁSICO

3.6.1. DEFINIÇÃO E ORIGEM CELULAR

O linfoma de grandes células anaplásico (LGCA) é um linfoma agressivo, de células T, expressando habitualmente CD30, particularmente frequente em crianças, nas quais corresponde a cerca de 10% de todos os LNH (Das D, 2011).

Pode ter um fenótipo T ou nulo, e a apresentação clínica, histológica e citológica é diversa. O LGCA está associado à translocação t(2;5)(p23;q35), a qual conduz à fusão do gene da nucleofosmina (*NPM1*), que codifica uma fosfoproteína nucleolar, envolvida na manutenção da estabilidade genómica e no controlo da via de supressão tumoral, com o gene *ALK*, que codifica uma tirosina cinase. No entanto, os LGCA podem ou não expressar a proteína ALK, constituindo os LGCA ALK positivos e negativos (LGCA ALK+ e ALK-), respectivamente (Das D, 2011).

Os ALK+ representam cerca de 50 a 80% de todos os LGCA, sendo os restantes ALK- (Medeiros L *et al.*, 2007). Estes últimos expressam CD30 e não são morfológicamente distinguíveis dos LGCA ALK+, diferindo apenas na expressão da proteína ALK e parecem associar-se a pior prognóstico (Das D, 2011; Delsol G *et al.*, 2008).

3.6.2. EPIDEMIOLOGIA

Os LGCA ALK+ constituem aproximadamente 3% de todos os LNH do adulto e 10 a 20% das crianças. São mais frequentes nas três primeiras décadas de vida e no sexo masculino, enquanto os LGCA ALK- ocorrem em idades mais avançadas (40 a 65 anos) (Das D, 2011; Delsol G *et al.*, 2008).

3.6.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

É muito importante realizar um diagnóstico correcto uma vez que é um tipo de linfoma que pode ser tratado. A maioria dos casos apresenta-se com adenopatia, contudo tem um curso agressivo com sintomas sistémicos e disseminação extraganglionar envolvendo o anel de Waldayer, pele, pulmão, osso, tecidos moles, trato respiratório e gastrointestinal. (Das D, 2011). O envolvimento do SNC é raro e entre 10 a 30% dos casos atingem a MO. A variante de pequenas células do LGCA-ALK+, pode ter uma apresentação leucémica com invasão do sangue periférico.

Aproximadamente 70% dos doentes, na altura do diagnóstico, está num estágio avançado da doença (III a IV), com adenopatias periféricas e/ou abdominais e com envolvimento extraganglionar e da MO, como referido. Frequentemente os doentes apresentam sintomas B, sobretudo febre elevada (Delsol G *et al.*, 2008).

3.6.4. CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS E PATOGÉNESE MOLECULAR

Características Morfológicas

Morfológicamente, os LGCA apresentam grande pleomorfismo. Tanto os linfomas ALK+ como ALK- exibem a variante clássica onde se observam células anaplásticas, com um padrão de crescimento coesivo, envolvendo preferencialmente os sinusóides linfáticos, podendo mesmo substituir toda a arquitectura do gânglio linfático. As células são grandes, irregulares e muitas vezes apresentam um núcleo polilobado com cromatina vesicular e nucléolo proeminente. O citoplasma é abundante e geralmente basofílico (Figura 24). (Medeiros L *et al.*, 2007)

Podem-se observar células típicas em forma de “donut”, células com núcleo em forma de rim ou de embrião, células gigantes multinucleadas ou com núcleo multilobado, células plasmacitóides pequenas a médias, células em forma de “raquete de ténis” ou mesmo semelhantes a células de RS, vacúolos citoplasmáticos, actividade mitótica e corpos apoptóticos (Das D, 2011).

São descritas ainda outras variantes morfológicas nos linfomas ALK-, ocorrendo num menor número de casos e mais difíceis de reconhecer (Medeiros L *et al*, 2007).

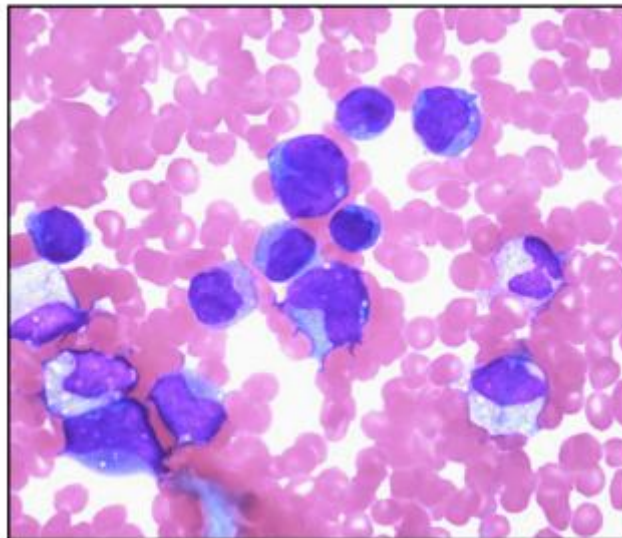


Figura 24 - Linfoma de grandes células anaplásico ALK+, fase leucémica. A amostra de sangue periférico mostra numerosas células neoplásicas (Wright-Giemsa, ampliação x1000) (Adaptado de Medeiros L *et al*, 2007)

Imunofenotipagem

O facto do LGCA ter um amplo espectro morfológico pode dificultar o diagnóstico, confundindo-se com melanoma, carcinoma metastizado, sarcoma, LH ou com linfoma de células B rico em células T. Nestes casos a imunohistoquímica pode ajudar na diferenciação, uma vez que o LGCA é CD30+, LCA+, EMA+, ALK + ou -, CD3 + ou - (em 75% dos

casos), CD15- e CD20- (Das D, 2011) e normalmente CD8-. Em cerca de 70% dos casos as células são positivas para CD2, CD4 e CD5 (Delsol, G *et al.*, 2008).

Geralmente expressam moléculas citotóxicas como granzima B, porfirina, TIA-1 e também a proteína Clusterina. Os LGCA ALK+ virtualmente, são sempre negativos para BCL2, o que nem sempre se verifica nos ALK-, e têm elevada taxa apoptótica (Delsol, G *et al.*, 2008; Medeiros L, *et al.*, 2007).

Características Genéticas

Cerca de 90% dos LGCA-ALK+ apresentam rearranjo clonal do TCR. Além disso, foram identificadas pelo menos 9 translocações cromossômicas envolvendo o locus do gene *ALK* no cromossoma 2p23. A mais frequente, em 75-80% dos casos, está associada com a translocação t(2;5)(p23;q35), ocorrendo fusão do gene da nucleofosmina no cromossoma 5 (*NPM1*) com o gene *ALK* no cromossoma 2 (Medeiros L *et al.*, 2007).

3.6.5. PROGNÓSTICO

Os doentes com LGCA ALK+ e translocação (2;5) têm um prognóstico mais favorável do que os doentes com outros linfomas de células T, incluindo o LGCA ALK- (Medeiros L, *et al.*, 2007).

Assim, se o LGCA for precocemente diagnosticado e tratado, a taxa de sobrevivência global aos 5 anos é de 80% nos linfomas ALK+, enquanto nos ALK- é de apenas 48% (Das D, 2011; Delsol G *et al.*, 2008).

Uma vez que a cinase ALK é essencial para a sobrevivência e proliferação das células do LGCA, o uso de inibidores desta cinase poderá constituir uma importante estratégia terapêutica no tratamento deste tipo de linfomas.

4. TRATAMENTO DOS LINFOMAS AGRESSIVOS

A cura é um objectivo primordial no tratamento dos LNH agressivos pois é possível em mais de metade dos doentes e, caso contrário, a sobrevivência é curta.

O regime CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona) é o mais usado, conseguindo-se atingir a remissão da doença a longo termo. A introdução do anticorpo monoclonal anti-CD20, Rituximab, veio aumentar as remissões completas em cerca de 15%, sem toxicidade adicional significativa, sendo o regime R-CHOP o mais usado actualmente no tratamento inicial dos linfomas agressivos, como no caso do LDGC-B. Além disso, pode-se também associar radioterapia.

Nos doentes não curados por este regime, que apresentem recaídas, a quimioterapia em altas doses e o transplante de células estaminais autólogas parecem ser efectivos (Swinnen L, 2006).

Para o estadiamento inicial e para avaliar a resposta à terapêutica a PET é extremamente informativa, podendo inclusive alterar a abordagem terapêutica inicial em cerca de 9% dos doentes. Neste sentido, a PET foi incorporada nos critérios de resposta e um estudo inicial é fundamental para a interpretação da resposta à terapêutica (Zelenetz AD *et al.*, 2011). São factores de risco preditivos de recaída ou progressão da doença, o estágio e idade avançada (superior a 60 anos), LDH elevada, mau estado geral, doença volumosa (“bulky”) e história prévia de linfoma de baixo grau ou de infecção HIV.

Os doentes com mais de um factor de risco devem receber um curso completo de quimioterapia (6 a 8 ciclos CHOP ou equivalente) e em pacientes com muitos factores de risco devem ser considerados programas de intensificação da quimioterapia. (Tsang R *et al.*, 2001)

No tratamento do LDGC-B convencional não foi demonstrada vantagem no uso de regimes de quimioterapia de 3ª geração contendo antraciclina em vez do regime CHOP

convencional, contudo existem exceções, dependendo do subtipo de linfoma. No subtipo molecular PMBL há evidências que sugerem melhores resultados com os regimes de última geração (como MACOP-B: metotrexato, adriamicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona, bleomicina), associando-se a taxas mais elevadas de remissão completa da doença e menor taxa de recaídas (Johnson P *et al.*, 2008).

O prognóstico do LB melhorou significativamente com a introdução de regimes de quimioterapia com multiagentes, de curta duração e elevada intensidade, sistêmicos e intratecais. O regime CODOX-M/IVAC (ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, e metotrexato; ifosfamida, etoposídeo e citarabina) é altamente efectivo no tratamento do LB. Actualmente é recomendada a realização de 3 ciclos CODOX-M na doença de baixo e de alto risco, neste último caso alternada com 3 ciclos IVAC, bem como a profilaxia do SNC (administração intratecal de citarabina e/ou metotrexato) (Thomas D *et al.*, 2011). Também aqui a associação do anticorpo monoclonal anti-CD20, Rituximab, pode ser benéfica diminuindo a taxa de recorrência e melhorando a taxa de sobrevida livre de doença e a taxa de sobrevida global (Barnes J *et al.*, 2011). Entre outros regimes que podem também ser utilizados está o Hyper-CVAD (ciclofosfamida hiperfraccionada, vincristina, doxorubicina e dexametasona) associado ou não a Rituximab, com profilaxia do SNC. Este regime está associado a uma taxa de remissão completa de 89%.

Actualmente já não é usada radioterapia no tratamento do LB, excepto em emergências como síndrome da veia cava superior ou comprometimento neurológico agudo ou em doentes com recidiva/progressão da doença (Miles R *et al.*, 2012)

O linfoma de células do Manto não responde bem ao regime CHOP pelo que recentemente o regime Hyper-CVAD (ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina e dexametasona), alternado com altas doses de citarabina e metotrexato, têm sido utilizados no

tratamento destes linfomas. A associação do anticorpo monoclonal Rituximab a este regime tem possibilitado remissões completas da doença (Fisher R *et al.*, 2004).

O conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese dos LNH agressivos têm permitido o estudo de novas abordagens terapêuticas dirigidas a genes-alvo, ou à utilização de inibidores moleculares (inibidores de proteossoma como o Bortezomib, inibidores da ADN-metiltransferase, como a azacitidina e decitabina, inibidores do mTOR, como o everolimus e tensirolimus, entre outros) com vista a aumentar a eficácia e diminuir a toxicidade dos tratamentos. São necessários mais estudos para estabelecer o papel do transplante de células estaminais autólogo ou alogénico na consolidação do tratamento ou como tratamento de salvamento (Ferry J, 2006).

5. CONCLUSÃO

Os linfomas não-Hodgkin agressivos são um grupo de doenças linfoproliferativas heterogéneas, caracterizados por evolução rápida e boa resposta às terapêuticas convencionais, sendo por isso considerados potencialmente curáveis.

Os linfomas de células B são os mais frequentes e originam-se a partir de células B normais em diferentes estádios de desenvolvimento. As translocações cromossómicas recíprocas têm um papel fundamental na patogênese dos linfomas de células B, embora sejam necessárias outras alterações genéticas e epigenéticas adicionais para que ocorra malignização. A partir de células B imaturas origina-se o linfoma linfoblástico de células B precursoras, das células da zona do Manto origina-se o linfoma de células do Manto e das células do centro germinativo e pós-centro germinativo o linfoma difuso de grandes células B, bem como o linfoma de Burkitt.

O avanço tecnológico das últimas décadas tem permitido a caracterização clínica e molecular dos linfomas agressivos possibilitando a identificação de diferentes subtipos e identificando aqueles que dependem de uma determinada via de sinalização celular, possibilitando novas estratégias terapêuticas dirigidas, e com menor toxicidade.

A identificação de diferentes subtipos de linfomas agressivos permite também, com base nas suas características, identificar grupos de risco e critérios de prognóstico relevantes.

6. BIBLIOGRAFIA

Ana Isabel de Almeida Lopes (2009). Linfomas indolentes - Caracterização clínica e biológica. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina, FMUC.

Ana Maria Rocha Ribeiro (2012). Potencial terapêutico de inibidores do NF-kB no Linfoma Difuso de Grandes Células B. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina, FMUC.

Barnes J, *et al.* (2011). Evaluation of the addition of rituximab to CODOX-M/IVAC for Burkitt's lymphoma: a retrospective analysis. *Ann Oncol.*; 22:1859-1864.

Brady G, *et al.* (2007). Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. *J Clin Pathol*; 60:1397-1402.

Cho B (2011). The next step for Burkitt lymphoma. *Korean J Hematol*;46: 60-61.

Cho S, *et al.* (2011). Primary cutaneous B-cell lymphoblastic lymphoma in an elderly man. *Korean J Hematol*; 46: 283-286.

Das D (2011). Anaplastic large cell lymphoma: The evolution continues. *Journal of Cytology*; 28: 233-234.

Delsol G, *et al.* (2008). Anaplastic large cell lymphoma (ALCL), ALK-positive. In: *World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, *et al.*, eds), pp 312-316. Lyon, France: IARC.

Dictor M, *et al.* (2009). Strong lymphoid nuclear expression of *SOX11* transcription factor defines lymphoblastic neoplasms, mantle cell lymphoma and Burkitt's lymphoma. *haematologica*; 94: 1563-1568.

Dunleavy K, *et al.* (2009). Diagnosis and treatment of non-Hodgkin lymphoma (aggressive). In: Hematology, Basic Principles and Practice 5ed (Hoffman R, Benz E, Shattil S, Furie B, Silberstein L, McGlave P, Heslop H, eds), pp 1293-1302. Churchill Livingstone, Elsevier.

Ekström-Smedby K (2006). Epidemiology and etiology of non-Hodgkin lymphoma – a review. *Acta Oncológica*; 45:258-271.

Ferry J, (2006). Burkitt's Lymphoma: Clinicopathologic Features and Differential Diagnosis. *The Oncologist*; 11:375–383.

Fisher R, *et al.* (2004). Diffuse Aggressive Lymphoma. *American Society of Hematology*; 2004:221-236.

Gaulard P, *et al.* (2008). Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma In: World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, *et al.*, eds), pp 250-251. Lyon, France: IARC.

Gil C, *et al.* (2006). Linfoma pulmonar primário – a propósito de um caso clínico. *Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna*; 13:189-196.

Hachem A, Gartenhaus R (2005). Oncogenes as molecular targets in lymphoma. *Blood*; 106: 1911-1923.

Harris NL, Harold S, Coupland SE, Hummel M, Favera RD, Pasqualucci L & Chan WC (2001). New approaches to Lymphoma Diagnosis. *Hematology*; 194-220.

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.

Hoffbrand A.V., *et al.* (2008). Linfomas não-Hodgkin In: *Fundamentos em Hematologia*. 5ª edição; 213-225.

Jaffe E, Pittaluga S (2011). Aggressive B-Cell Lymphomas: A Review of New and Old Entities in the OMS Classification. *ASH Education Book Dec*; 1 : 506-514.

Johnson P, *et al.* (2008). Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma. ASH Education Book; 2008 : 349-358.

Jong D, Ponz O (2011). The molecular background of aggressive B cell lymphomas as a basis for targeted therapy. *Journal of Pathology*; 223:274-282.

José Eduardo Mendes (2012). The RAS/RAF and AKT/mTOR pathways as therapeutic targets in diffuse large B-cells lymphoma. *Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina, FMUC.*

Kluin P, *et al.* (2008). Primary diffuse large B-cell lymphoma of the CNS In: *World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, *et al.*, eds), pp 240–241. Lyon, France: IARC.

Kuby, Goldsby RA, Kindt TJ & Osborne BA eds (2002). *Kuby Imunologia* (4ª edição), pp: 269-300.

Küppers R (2005). Mechanisms of B-Cell lymphoma pathogenesis. *Nature reviews*; 5:251-262.

Kurita N, *et al.* (2011). A Highly Therapy-Resistant Case of B-Cell Lymphoma, Unclassifiable, with Features Intermediate between Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Burkitt Lymphoma Showing Strong BCL2 Staining, Otherwise Indistinguishable from Burkitt Lymphoma. *J Clin Exp Hematopathol*; 51: 37-42.

Kušec R (2002). Molecular and Genetic Mechanisms of Lymphomagenesis. *Croatian Medical Journal*; 43: 519-525.

Lars Vereecke, Rudi Beyaert and Geert van Loo (2009). The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) is a central regulator of immunopathology. *Trends in Immunology* Vol.30, No.8: 383-391.

Lenz G, *et al.* (2010) Aggressive Lymphomas. *The New England Journal of Medicine*; 362:1417-29).

Leoncini L, *et al.* (2005). Aggressive B-cell lymphomas: a review based on the workshop of the XI Meeting of the European Association for Haematopathology. *Histopathology*;46, 241-255).

Leoncini L, *et al.* (2008). Burkitt lymphoma In: World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, *et al.*, eds), pp 262-264. Lyon, France: IARC.

Longo DL (2011). Malignancies of lymphoid cells. In: Harrison's Principles of Internal Medicine (Braunwald E, *et al.*, ed), pp 919-935; New York: McGraw-Hill.

Lucas D, *et al.* (2001). Ewing Sarcoma vs Lymphoblastic Lymphoma A Comparative Immunohistochemical Study. *Am J Clin Pathol* 2001;115:11-17.

Maitra A, *et al.* (2001). Precursor B-Cell Lymphoblastic Lymphoma A Study of Nine Cases Lacking Blood and Bone Marrow Involvement and Review of the Literature. *Am J Clin Pathol*; 115:868-875.

Medeiros L, *et al.* (2007). Anaplastic Large Cell Lymphoma. *Am J Clin Pathol*; 127: 707-722.

Meijer C, *et al.* (2008). Primary cutaneous LDGC-B, leg type In: World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, *et al.*, eds), pp 242. Lyon, France: IARC.

Miles R, *et al.* (2012). Risk factors and treatment of childhood and adolescent Burkitt lymphoma/leukaemia. *Br J Haematol.*; 10: 1365-2141.

Morschhauser *et al.*, (2010) Targeting molecular pathways - Diffuse Large B cell Lymphoma, Education Program for the 15th Congress of European Hematology Association 24(1): 118-123.

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

Nakamura S, *et al.* (2008). Intravascular large B-cell lymphoma In: World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, *et al.*,eds), pp 252-253. Lyon, France: IARC.

Neto A, *et al.* (2006). Estratificação de risco em linfoma difuso de grandes células B. Revista brasileira de hematologia e hemoterapia; 28(4):296-300.

Njie R, *et al.* (2009). The effects of acute malaria on Epstein-Barr Virus (EBV) Load and EBV-Specific T Cell Immunity in Gambian Children. JID; 199: 31-38.

Oliveira, Ana Catarina Rodrigues, Sinalização Celular Mediada pelo Receptor Flt3 e Proteínas Ras como Alvos Terapêuticos no Tratamento da Síndrome Mielodisplásica, Tese de Mestrado, Departamento de Zoologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2008.

Oschlies I, *et al.* (2011). Clinical, pathological and genetic features of primary mediastinal large B-cell lymphomas and mediastinal gray zone lymphomas in children. Haematological; 96: 262-268.

Paes R, *et al.* (2002). Classificação da Organização Mundial de Saúde para as neoplasias dos tecidos hematopoiético e linfóide: proposta de padronização terminológica em língua portuguesa do grupo de hematopatologia da Sociedade Brasileira de Patologia. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial; 38: 237-239.

Parcells B. W., Ikeda A. K., Simms-Waldrip T., Moore T. B. & K. M. Sakamoto (2006). FMS-Like Tyrosine Kinase 3 in Normal Hematopoiesis and Acute Myeloid Leukemia. Stem Cells 24: 1174-1184.

Patte C, *et al.* (2007). Non-Hodgkin Lymphoma (Bleyer A, Barr R,ed), pp127-149; New York: Springer.

Pileri S, *et al.* (2000). The pathologist's view point. Part II- aggressive lymphomas. Haematologica; 85:1308-1321.

Seok Y, *et al.* (2012). CD5-negative Blastoid Variant Mantle Cell Lymphoma with Complex CCND1/IGH and C-MYC Aberrations. *Ann Lab Med*; 32:95-98.

Seto M (2004), Genetic and epigenetic factors involved in B-cell lymphomagenesis. *Cancer Sci*; 95:704-710.

Shimizu T, *et al.* (2011). A case of primary effusion lymphoma effectively treated by oral corticosteroid therapy, *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi.*; 49:981-985.

Small D (2006) *FLT3 Mutations: Biology and Treatment*. *Hematology* 2: 178:184.

Steere J, *et al.* (2006). Large B-Cell Lymphoma Masquerading As Acute Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*; 24:1950 -1951.

Stein H, *et al.* (2008). Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified In: *World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, *et al.*,eds), pp 233–237. Lyon, France: IARC.

Stirewalt D. & J. Radich (2003). The Role of FLT3 in Haematopoietic Malignancies. *Cancer*. 3: 650-665.

Sumba P, *et al.* (2010). Microgeographic variations in Burkitt's lymphoma incidence correlate with differences in malnutrition, malaria and Epstein–Barr virus. *British Journal of Cancer*; 103: 1736-1741.

Swerdlow SH, *et al.* (2008). Mantle cell lymphoma. In: *World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, *et al.*,eds), pp 229–232. Lyon, France: IARC.

Swinnen L (2006). Early treatment intensification for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Current Opinion in Oncology*; 18:415-416.

Thomas D, *et al.* (2011). Burkitt Lymphoma and Atypical Burkitt or Burkitt-like Lymphoma: Should These be Treated as Different Diseases?. *Curr Hematol Malig Rep*; 6: 58-66.

Tomita N (2011). BCL2 and C-MYC Dual-Hit Lymphoma/Leukemia. J Clin Exp Hematopathol; 51: 7-12.

Tsang R, *et al.* (2001). Management of localized (stage I and II) clinically aggressive lymphomas. Ann Hematol; 80:B66-B72.

Wolf-Peeter C, *et al.* (2008). T cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma In: World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, *et al.*,eds), pp 238–239. Lyon, France: IARC.

Wu D, *et al.* (2010). “Double-Hit” Mature B-cell Lymphomas Show a Common Immunophenotype by Flow Cytometry The Includes Decreased CD20 Expression. Am J Clin Pathol 134: 258-265.

Yang W, Listinsky C (2005). Aggressive B-cell lymphomas. Advances in Experimental Medicine and Biology; 563: 125-134.

Zelenetz A, Abramson J, Advani R, *et al.*,(2011). Non-Hodgkin’s Lymphomas. Clinical Practice Guidelines in Oncology. JNCCN–Journal of the National Comprehensive Cancer Network , Vol 9, n° 5: 484-560.

Zeng W, *et al.* (2012). Cyclin D1-negative Blastoid Mantle Cell Lymphoma Identified by SOX11 Expression. Am J Surg Pathol.; 36: 214-219.