



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas

Roberta Soares Faccion

“EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À RESISTÊNCIA À  
APOPTOSE EM LINFOMAS DIFUSOS DE GRANDES CÉLULAS B:  
Implicações Clínicas”

Dissertação de Mestrado apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de  
Mestre em Ciências Morfológicas

Rio de Janeiro  
Março de 2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas

Roberta Soares Faccion

“EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À RESISTÊNCIA À  
APOPTOSE EM LINFOMAS DIFUSOS DE GRANDES CÉLULAS B:  
Implicações Clínicas”

Dissertação de Mestrado apresentada no  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Morfológicas da Universidade Federal do Rio de  
Janeiro como parte dos requisitos para obtenção  
do grau de Mestre em Ciências Morfológicas

Orientadora: Raquel Ciuvalschi Maia, MD, PhD  
Laboratório de Hematologia Celular e Molecular –  
Hospital do Câncer I – Instituto Nacional de Câncer

Rio de Janeiro  
Março de 2009

FACCION, Roberta Soares

Expressão de proteínas relacionadas à resistência à apoptose em linfomas difusos de grandes células B: Implicações clínicas / Roberta Soares Faccion. Rio de Janeiro, 2009. 123f

Dissertação (Mestrado) – UFRJ/ Instituto de Ciências Biomédicas/ Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, 2009.

Orientadora: Raquel Ciuvalschi Maia

1. Linfoma difuso de grandes células B. 2. Subtipo centroblástico. 3. Resistência à apoptose. 4. Expressão de proteínas. 5. Resposta ao tratamento. I. Ciuvalschi Maia, Raquel (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas. III. Título

**“EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À RESISTÊNCIA À APOPTOSE  
EM LINFOMAS DIFUSOS DE GRANDES CÉLULAS B: Implicações Clínicas”**

**Roberta Soares Faccion**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Morfológicas

Aprovada em 10 de Março de 2009 pela banca examinadora composta pelos professores:

---

Prof. Raquel Ciuvalschi Maia  
(Serviço de Hematologia – HCI – INCA)  
(Orientadora)

---

Prof. Cerli Rocha Gattass  
(Programa de Imunologia – IBCCF – CCS  
– UFRJ) (Membro da banca)

---

Prof. Morgana Castelo Branco  
(Depto Histologia e Embriologia – ICB –  
CCS – UFRJ) (Presidente da banca)

---

Prof. Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek  
(Instituto de Bioquímica Médica – CCS –  
UFRJ) (Membro da banca)

---

Prof. Christina Maeda Takiya  
(Depto Histologia e Embriologia – ICB –  
CCS – UFRJ) (Revisora e suplente interna)

---

Prof. Robson de Queiroz Monteiro  
(Instituto de Bioquímica Médica – CCS –  
UFRJ) (Suplente externo)

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hematologia Celular e Molecular do Serviço de Hematologia – Hospital do Câncer I – Instituto Nacional de Câncer – sob orientação da professora Raquel Ciuvalschi Maia e contou com apoio financeiro da Fundação Swissbridge e do Ministério da Saúde/INCA.

A minha família, amigos e colegas, que me apóiam, incentivam e desafiam a uma busca constante por ser uma pessoa e uma pesquisadora melhor

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e chefe do Laboratório de Hematologia Celular e Molecular (LHCM) Raquel Ciuvalschi Maia, pela confiança depositada em mim e pela dedicação e incentivo conferidos ao meu trabalho, desde o levantamento de dados clínicos até o convite para participar de um estudo paralelo ao meu mestrado, passando pelo depósito em minhas mãos da responsabilidade de orientar um aluno de iniciação científica, pelas inúmeras trocas de emails, ligações e reuniões sobre os resultados e rumos, relacionados ou não ao projeto, e pelos bolos que (não concebo em qual momento) ela mesma faz e cordialmente leva para seus alunos.

Ao chefe da Divisão de Anatomia Patológica do INCA, Paulo Antônio Faria, e aos funcionários responsáveis pela imunohistoquímica da rotina diagnóstica, por cordialmente me receberem e me ensinarem a técnica.

À médica anatomopatologista Lidia Magalhães por ceder seus brevíssimos intervalos profissionais para contribuir com o meu trabalho não só realizando as análises dos tumores, mas também participando ativamente de discussões sobre os resultados.

À médica hematologista e pesquisadora Claudete Esteves Klumb pelas conversas em tom de aula sobre os linfomas.

Aos demais envolvidos no trabalho anterior sobre os linfomas, Sérgio Romano (médico anatomopatologista), Gélcio Mendes (médico do Serviço de Oncologia – INCA), Jane Dobbin (Chefe do Serviço de Hematologia – INCA) e Vivian Rumjanek (Chefe do Laboratório de Imunologia Tumoral do Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ), que com seus trabalhos tornaram o meu possível.

Aos professores e membros da banca, Prof. Morgana Castelo Branco (PCM – UFRJ), Prof. Christina Maeda Takiya (PCM – UFRJ), Prof. Cerli Rocha Gattass (IBCCF – UFRJ), Prof. Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek (IBqM – UFRJ), Prof. Robson de Queiroz Monteiro (IBqM – UFRJ), que gentilmente aceitaram participar da minha formação acadêmica e contribuir para melhorar o meu trabalho.

Aos amigos do LHCM, Alex, Ana C, Ana Cris, Bruno, Cristina, Débora, Diogo, Eliane, Felipe, Flavia, Flaviana, Gabriela, Giselle, Jolie, Karina, Marcela, Marcos, Paloma, Patrícia, Paula, Rafaela, Roberta 02, Roberta 03 e Victor pelo companheirismo e incentivo.

Ao aluno de Iniciação Científica Victor Freitas de Melo, por me ensinar a ensinar.

Ao Victor, à Paloma e à Flavia pelas contribuições nos resultados preliminares do meu projeto de doutorado.

À Gabriela, Giselle e Paloma pelas discussões científicas.

À Ana C pelo reconhecimento ao meu trabalho na apresentação em congresso nacional do seu projeto de mestrado.



Aos médicos Regina M. Ferreira, Marília Grabois, Theresinha Fonseca e José Antônio de Oliveira pela parceria no estudo paralelo ao meu mestrado, experiência enriquecedora que rendeu três apresentações em congressos e o artigo que estamos escrevendo.

À Regina M. Ferreira e ao Bioestatístico Prof. Pedro Carvalho, que me ajudaram com as análises estatísticas.

À Tânia, secretária do PCM, que com sua gentileza e prestatividade me ajudou e me guiou durante esses dois anos de mestrado para a execução de toda a burocracia envolvida neste processo.

A toda minha família, cujos nomes faço questão de citar, embora sejam muitos, devido à importância que tem na minha formação como ser consciente da realidade e cidadã e na construção dos meus valores, qualidades essenciais para a minha formação como pesquisadora, mas também por serem a minha base, o meu apoio, os meus maiores incentivadores e a minha vida; meus pais Cristina e José Eduardo, meu “pai-drastro” Fred, meus irmãos Pedro, Bruna e Marcela, meu cunhado Augusto, meus avós Roberto, Aparecida, José, Vilma e Cléa, meus tios Roberto, Adriana, Marcelo, Teresa, Claudia, Luiz, Vilma, Mathias e Ana, meus primos Rebecca, Natália, Gabriela, Gabriel, Igor, Eduarda, João, Francesca, Lucas e Beatriz, e, acima de tudo, minha filha Clara, um milagre na minha vida (Pasteur e Darwin que me perdoem), cujo sorriso é o maior incentivo e cuja existência é a maior alegria do mundo.

Aos meus amigos biomédicos, André, Anna, Livia, Mauricio, Nathalia, marcelinas, Barbara, Juliana, Leandra, Priscilla, Tatiana, capianos, Esther, Fernanda, Isabela, Monique, Paula, Bruna, Gabriel, Patrícia, Rafael, Thaís, Uilson, Wanessa, entre outros, pela amizade incondicional e atemporal, que me diverte e renova.

A todos os meus professores, desde a escola primária até o mestrado, por serem exemplos de dedicação, persistência, tolerância, inteligência, simplicidade e altruísmo e aos quais eu espero poder retribuir contribuindo, no momento apropriado, para a formação de outros pesquisadores e seres humanos.

“O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão para existir. É impossível não ficar apavorado ao contemplar os mistérios da eternidade, da vida, da maravilhosa estrutura da realidade. Já é o bastante tentar compreender um pouco deste mistério todos os dias. Nunca perca a sagrada curiosidade”

– Albert Einstein –

## RESUMO

Os Linfomas Difusos de Grandes Células B (LDGCB) são os linfomas não-Hodgkin (LNH) de alto grau de malignidade que ocorrem com maior frequência. Somente a metade dos pacientes é curada com o tratamento convencional. Atualmente o único parâmetro utilizado para prever a resposta ao tratamento e a sobrevida é o Índice Prognóstico Internacional (IPI). Por este motivo, a expressão de diversas proteínas que possam ser utilizadas como fatores preditivos biomoleculares tem sido analisadas com o objetivo de auxiliar no prognóstico dos pacientes. Estudos recentes sugerem que a expressão de proteínas envolvidas na resistência a apoptose tais como a XIAP, survivina, p53 e Bcl-2, e da proteína associada à proliferação celular ki-67 possam desempenhar importante papel no prognóstico dos LDGCB, mas suas implicações para os subtipos centroblastico e imunoblastico são desconhecidas. Com isso, o presente estudo teve como objetivos avaliar a expressão, a localização celular, a co-expressão e o impacto na resposta ao tratamento da expressão das proteínas XIAP, survivina p53, Bcl-2 e ki-67 nos LDGCB, com ênfase no subtipo centroblastico. Como resultado, foi observada a expressão de XIAP preferencialmente no núcleo e a de survivina preferencialmente no citoplasma das células tumorais. Não foi observada co-expressão das proteínas analisadas nos LDGCB e não houve correlação da expressão de XIAP, survivina, p53, Bcl-2 e ki-67 com a sobrevida livre de progressão (SLP) e com a sobrevida global (SG) em oito anos de acompanhamento clínico dos pacientes com LDGCB centroblastico. Com base nesses resultados, foi possível concluir que a expressão das proteínas XIAP, survivina, p53, Bcl-2 e ki-67, isoladamente, não tem impacto na SLP e na SG dos pacientes com LDGCB centroblastico, proporcionando melhor compreensão da biologia deste subtipo de LDGCB e fornecendo informações sobre a relevância dessas proteínas na resposta ao tratamento desta doença.

## ABSTRACT

Diffuse large B cell lymphomas (DLBCL) are the most frequently occurring high grade non-Hodgkin lymphoma (NHL). Only half of the patients are cured with the standard treatment. Currently the only parameter used to predict treatment response and survival is the International Prognostic Index (IPI). For that reason, the expression of several proteins that might be used as predictive factors have been analyzed with the goal of helping establish the prognosis of the patients. Recent studies suggested that the expression of apoptosis resistance related proteins such as XIAP, Survivin p53 and Bcl-2, and the cell proliferation associated protein Ki-67 might play an important role in the prognostic of DLBCL patients, but the implications for the centroblastic and immunoblastic subtypes are unknown. Therefore, the present study aimed to evaluate the expression, subcellular localization, co-expression and treatment response impact of p53, Bcl-2, XIAP, Survivin and Ki-67 in DLBCL, especially in the centroblastic subtype. The observed results were that XIAP localized preferentially in the nucleus while Survivin localized preferentially in the cytoplasm of the tumoral cells. There was no correlation between the expression of XIAP, Survivin, p53, Bcl-2 and Ki-67 and progression free survival (PFS) and overall survival (OS) after an eight-year clinical follow up period of the centroblastic DLBCL patients. Taken together, these results lead to the conclusion that the expression of XIAP, Survivin, p53, Bcl-2 and Ki-67 in a isolated manner has no impact in PFS and OS of centroblástico DLBCL patients and provide a better understanding of this DLBCL subtype biology as well as valuable information about the relevancy of these proteins in treatment response of this disease.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquematização dos estágios de maturação do linfócito B após saírem da medula óssea (em preto) e os tumores (linfomas não-Hodgkin) correspondentes (em vermelho), com destaque para os linfomas difusos de grandes células B (LDGCB) (em azul).	20
Figura 2: Representação esquemática da anatomia de um linfonodo com destaque para a região cortical onde se desenvolve o centro germinativo.	23
Figura 3: Variantes mais comuns dos LDGCB e suas contrapartidas normais.	25
Figura 4: Representação esquemática do mecanismo apoptótico ressaltando sua conservação nas espécies animais de nematodos ( <i>C. elegans</i> ), insetos ( <i>D. melanogaster</i> ) e mamíferos.	27
Figura 5: Características morfológicas da apoptose.	27
Figura 6: Representação esquemática das principais vias de sinalização da apoptose. São elas as chamadas via extrínseca (ou via de receptor de morte) e via intrínseca (ou via mitocondrial).	28
Figura 7: Representação esquemática do mecanismo de ação de alguns dos membros da família Bcl-2.	33
Figura 8: Vias ativadas por p53 que levam à apoptose. Embora autoregulada via indução de seu repressor mdm2 (a), mediante dano celular irreparável, p53 ativa diversas vias relacionadas à apoptose.	38
Figura 9: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 76 pacientes com LDGCB estudados. PS: Probabilidade de sobrevida. A censura para SLP foi a recaída e para a SG foi o óbito.	54
Figura 10: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 63 pacientes com LDGCB com relação aos subtipos histológicos centroblastico versus imunoblastico.	56
Figura 11: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centroblastico tratados com CHOP com relação ao estadiamento.	58
Figura 12: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centroblastico tratados com CHOP com relação ao gênero.	59

Figura 13: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centroblastico tratados com CHOP com relação à etnia.	60
Figura 14: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centroblastico tratados com CHOP com relação à idade estratificando-se em dois grupos.	62
Figura 15: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centroblastico tratados com CHOP com relação à idade estratificando-se em três grupos.	63
Figura 16: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centroblastico tratados com CHOP com relação ao nível de LDH.	64
Figura 17: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centroblastico tratados com CHOP com relação ao IPI.	65
Figura 18: Detecção por imunohistoquímica da expressão de XIAP no núcleo (a) e de survivina no citoplasma (b) das células de LDGCB.	69
Figura 19: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centroblastico tratados com CHOP.	73
Figura 20: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centroblastico tratados com CHOP positivos ou negativos para expressão de XIAP.	74
Figura 21: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centroblastico tratados com CHOP positivos ou negativos para expressão de survivina.	75
Figura 22: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centroblastico tratados com CHOP positivos ou negativos para expressão de p53.	76
Figura 23: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses)	

para os 58 pacientes com LDGCB centrobástico tratados com CHOP positivos ou negativos para expressão de Bcl-2.	77
Figura 24: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centrobástico tratados com CHOP positivos ou negativos para expressão de ki-67.	78
Figura 25: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centrobástico tratados com CHOP positivos ou negativos para a expressão de XIAP, com ponto de corte em 20% das células tumorais positivas.	81
Figura 26: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centrobástico tratados com CHOP positivos ou negativos para a expressão de XIAP, com três grupos de expressão.	82
Figura 27: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centrobástico tratados com CHOP positivos ou negativos para a expressão de ki-67, com ponto de corte em >20% das células tumorais positivas.	85
Figura 28: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centrobástico tratados com CHOP positivos ou negativos para a expressão de ki-67, com ponto de corte em >60% das células tumorais positivas.	86
Figura 29: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centrobástico tratados com CHOP positivos ou negativos para a expressão de ki-67, com três grupos de expressão.	87
Figura 30: Representação esquemática do linfonodo durante a formação e maturação do centro germinativo, com destaque para as diferenças entre os microambientes pelos quais o linfócito passa durante sua maturação como centroblasto e imunoblasto.	104

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Frequência dos dados clínicos e demográficos avaliados na série de 76 casos de LDGCB em estudo.	53
Tabela 2: Acompanhamento clínico e resposta ao tratamento dos diferentes grupos de LDGCB analisados.	55
Tabela 3: Impacto das características clínicas e demográficas na SLP e na SG dos 58 pacientes com LDGCB centroblástico tratados com CHOP.	57
Tabela 4: Análise multivariada pelo modelo de regressão de Cox do impacto dos fatores clínicos e demográficos na sobrevida livre de progressão e da sobrevida global dos 58 pacientes com LDGCB centroblástico analisados.	66
Tabela 5: Distribuição dos 76 casos de LDGCB com relação à expressão das proteínas analisadas.	67
Tabela 6: Distribuição dos 58 casos de LDGCB centroblástico tratados com CHOP com relação à expressão das proteínas analisadas.	67
Tabela 7: Comparação da expressão das proteínas XIAP, survivina, p53, Bcl-2 e ki-67 nos 69 casos de LDGCB centroblásticos em estudo.	71
Tabela 8: Correlação da expressão das proteínas XIAP, survivina, p53, Bcl-2 e ki-67 com a SLP nos 58 casos de LDGCB centroblásticos tratados com CHOP.	79
Tabela 9: Correlação da expressão das proteínas XIAP, survivina, p53, Bcl-2 e ki-67 com a SG nos 58 casos de LDGCB centroblásticos tratados com CHOP.	79
Tabela 10: Amostras de LDGCB centroblástico positivos para XIAP.	80
Tabela 11: Amostras de LDGCB centroblástico positivos para ki-67.	84



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu$ L	microlitro
Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
Apaf-1	<i>Apoptotic Protease Activating-Factor 1</i>
Apo3L	Ligante de Apo3
ATP	<i>Adenosine-5'-triphosphate</i> ou adenosina-5'-trifosfato
Bcl-2	<i>B Cell Lymphoma 2</i>
BH	<i>Bcl-2 Homology regions</i>
BIR	<i>Baculoviral IAP Repeat</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BSA	Albumina sérica bovina fração V
CAD	<i>Caspase-Activated DNase</i>
CARD	<i>Caspase-Associated Recruitment Domain</i>
Caspase	<i>Cysteine-aspartic acid protease</i>
CHOP	Ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona
DAB	Tetracloro 3,3 diaminobenzidina
DISC	<i>Death receptor-Induced Signaling Complex</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAc	DNA complementar
DR	<i>Death Receptor</i> (ou receptor de morte)
EBV	Vírus Epstein-Barr
EP	Erro padrão
FADD	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
FasL	Ligante do receptor Fas
FHA	<i>Forkhead-associated</i>
GTP	<i>Guanosine-5'-triphosphate</i> ou guanosina-5'-trifosfato
HCI	Hospital do Câncer I
HDM2	<i>Human Double Minute-2</i>
HH	Hematoxilina de Harris
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HRP	Horseshoe peroxidase
IAPs	Proteínas inibidoras da apoptose
ICAD	<i>Inhibitor of Caspase-Activated DNase</i>
Ig	Imunoglobulina
IPI	Índice Prognóstico Internacional
kDa	Kilo Dalton
LDGCB	Linfoma Difuso de Grande Células B
LDH	Desidrogenase láctica
LHCM	Laboratório de Hematologia Celular e Molecular
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLC	Leucemia Linfóide Crônica
LNH	Linfoma não-Hodgkin
LSAB	<i>Linked Streptavidin-Biotin</i>
mL	Mililitro
Ng	Nanogramas
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro

Ng	Nanogramas
Obs	Observação
P.A.	Para análise
PUMA	<i>p53 Upregulated Modulator of Apoptosis</i>
REAL	<i>Revised European-American classification of Lymphoid neoplasia</i>
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença
SLP	Sobrevida livre de progressão
TBS	Tampão Tris Salino
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF-R	Receptor do Fator de Necrose Tumoral
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
XIAP	<i>X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	19
1.1 LINFOMAS NÃO-HODGKIN – CONCEITUAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO	19
1.1.1 Linfomas Difusos de Grandes Células B	20
1.2 APOPTOSE	26
1.2.1 Bcl-2	31
1.2.2 p53	35
1.2.3 Proteínas Inibidoras da Apoptose	38
1.3 KI-67	42
<b>2 OBJETIVOS</b>	46
2.1 OBJETIVO GERAL	46
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	47
3.1 AMOSTRAS DE PACIENTES	47
3.2 AVALIAÇÃO DOS DADOS CLÍNICOS	47
3.3 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DAS IAPS	48
3.4 OBTENÇÃO DE DADOS LABORATORIAIS DE ESTUDO ANTERIOR	50
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
<b>4 RESULTADOS</b>	52
4.1 DADOS CLÍNICOS, DEMOGRÁFICOS E DE RESPOSTA AO TRATAMENTO DOS PACIENTES COM LDGCB	52
4.2 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS XIAP, SURVIVINA, P53, BCL-2 e KI-67 NAS CÉLULAS DE LDGCB	66
4.3 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DAS PROTEÍNAS XIAP E SURVIVINA NOS LDGCB	68
4.4 CO-EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS XIAP, SURVIVINA, P53, BCL2 e KI-67 NOS LDGCB	70
4.5 CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS XIAP, SURVIVINA, P53, BCL2 e KI-67 COM A RESPOSTA AO TRATAMENTO NOS LDGCB CENTROBLÁSTICOS	72
<b>5 DISCUSSÃO</b>	88
<b>6 CONCLUSÃO</b>	106
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	107
<b>ANEXO: FIGURA 18 EXPANDIDA</b>	116

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 LINFOMAS NÃO-HODGKIN – CONCEITUAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO

Os linfomas não Hodgkin (LNH) constituem um grupo extremamente heterogêneo de neoplasias, podendo se originar de células B ou T, em diferentes estágios de maturação, com diferentes características de patogênese e padrões de alterações moleculares. Dentro desse grande grupo, os linfomas difusos de grandes células B (LDGCB) representam um tipo de LNH com comportamento clínico agressivo mais freqüente (40% dos casos) e os que apresentam menor taxa de resposta ao tratamento convencional (Hennessy *et al.*, 2004; Ansell e Armitage, 2005; Hoffman *et al.*, 2005; Ng, 2007).

A partir da classificação REAL (*revised European-American classification of lymphoid neoplasia*) introduzida na clínica em 1994 (e adotada pela Organização mundial da saúde a partir de 1997 (Harris *et al.*, 1999) as neoplasias linfóides foram nomeadas de acordo com o estágio de diferenciação do tumor. De acordo com esta classificação, os LNH englobam as neoplasias linfóides originárias de linfócitos maduros (Figura 1). Assim, os LNH se diferenciam de neoplasias linfóides originárias de precursores de linfócitos, como as leucemias linfoblásticas agudas (LLA), mas incluem as leucemias linfóides crônicas (LLC), que possuem características típicas de linfócitos maduros (Hennessy *et al.*, 2004; Hoffman *et al.*, 2005).

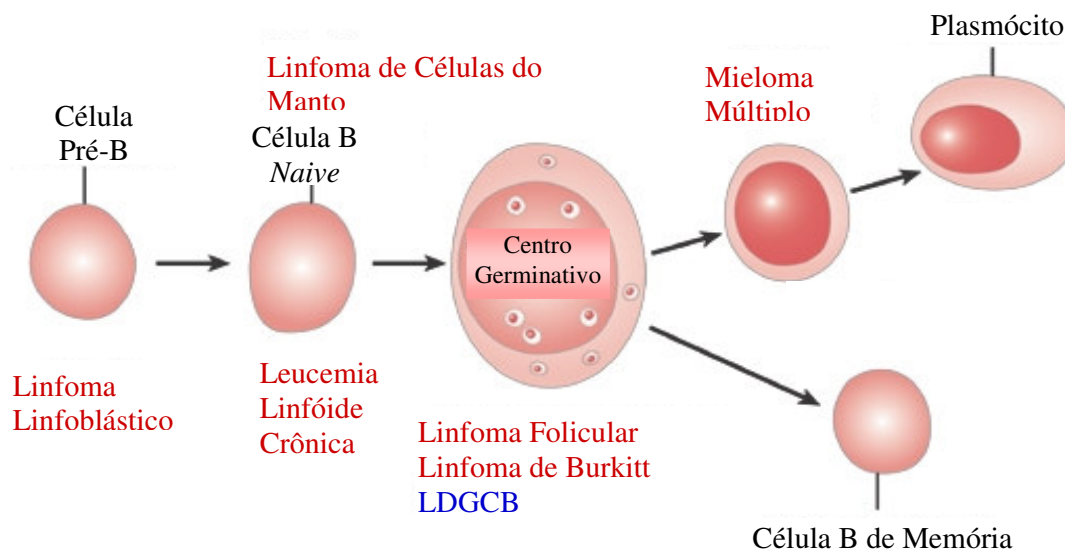


Figura 1: Esquemática dos estágios de maturação do linfócito B após saírem da medula óssea (em preto) e os tumores (linfomas não-Hodgkin) correspondentes (em vermelho), com destaque para os linfomas difusos de grandes células B (LDGCB) (em azul). Adaptado de (Hoffman *et al.*, 2005).

### 1.1.1 Linfomas Difusos de Grandes Células B

Os LDGCB constituem o subgrupo dos LNH mais heterogêneo em termos de morfologia, apresentação clínica e resposta ao tratamento. Mediante o tratamento com o protocolo terapêutico denominado CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona), 75% dos pacientes atingem a remissão completa. No entanto, a taxa de recaída é elevada e apenas 50% alcançam sobrevividas de cinco anos (Hennessy *et al.*, 2004; Ansell e Armitage, 2005; Hoffman *et al.*, 2005; Ng, 2007).

Os LNH são avaliados clinicamente de acordo com os locais de acometimento da doença. O estadiamento de Ann Arbor classifica os LNH nos estágios I, II, III, e IV. O estágio I corresponde ao comprometimento de apenas um linfonodo ou sítio extranodal, o estágio II corresponde ao comprometimento de dois linfonodos no mesmo lado do diafragma ou envolvimento localizado de um órgão ou sítio extranodal, o estágio III corresponde ao comprometimento de ambos os lados do diafragma ou envolvimento localizado de um órgão

ou sítio extranodal ou do baço e o estágio IV corresponde ao comprometimento difuso ou disseminado de um ou mais órgãos extranodais, com ou sem comprometimento de linfonodos (Hennessy *et al.*, 2004; Ansell e Armitage, 2005; Hoffman *et al.*, 2005; Ng, 2007).

Em razão da diversidade de subtipos dos LNH e das suas várias formas de apresentação clínica, um grupo de pesquisadores de dezesseis instituições na Europa, Canadá e Estados Unidos, desenvolveu um modelo preditivo de prognóstico denominado IPI (*International Prognostic Index*). Este modelo foi baseado em um estudo que compreendeu mais de 2000 pacientes tratados com esquemas contendo antraciclina. O IPI identificou cinco fatores de risco independentes associados com a sobrevida: idade (menor ou maior que 60 anos), estágio do tumor (estágio I ou II versus III ou IV), o número de sítios extranodais da doença (zero ou 1 versus maior que 1), *performance status* (zero ou 1 versus maior que 1) e nível de desidrogenase láctica (LDH) (menor ou maior que o nível normal). Os grupos de risco foram definidos como: baixo risco (0 ou 1); risco baixo-intermediário (2); risco alto-intermediário (3) ou alto risco (4 ou 5). Nesse estudo (**A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project**, 1993), foi observado que estes quatro grupos apresentaram taxas diferentes e significativas do ponto de vista estatístico com relação à resposta completa, sobrevida livre de doença (SLD) e sobrevida global (SG) (**A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project**, 1993; Hennessy *et al.*, 2004; Ansell e Armitage, 2005; Hoffman *et al.*, 2005; Ng, 2007).

A partir da classificação WHO (*World Health Organization*) de 2001 (Jaffe *et al.*, 2001), diversas variantes dos LNH foram reclassificadas como entidades a parte aos LDGCB, em função de suas especificidades na patogênese, nas características clínicas, nas alterações moleculares ou epidemiológicas. Alguns exemplos são os raros: linfoma de grandes células B

mediastinal, linfoma de grandes células B intravascular (com raro acometimento de linfonodos), linfoma primário de efusões (associado a HIV, Vírus Epstein-Barr – EBV – e Herpesvírus tipo 8) e linfoma plasmoblástico (associado ao HIV e ao EBV). Por outro lado, os subtipos mais freqüentes, o centroblástico e o imunoblástico, permaneceram sendo classificados apenas como variantes dos LDGCB e não como doenças diferentes (Hoffman *et al.*, 2005).

A grande maioria dos casos de LDGCB é classificada como a variante centroblástica, em oposição à imunoblástica. Embora não se conheça sua origem celular de forma precisa, estima-se que haja uma correlação com o estágio de maturação dos linfócitos B no período em que transitam pelos linfonodos (Dunn-Walters *et al.*, 2001; Hennessy *et al.*, 2004; Hoffman *et al.*, 2005). Durante a maturação normal dos linfócitos B nos linfonodos, eles são apresentados a antígenos (Ag) pelas células dendríticas presentes no folículo. Os linfócitos cujas Imunoglobulinas (Ig) possuem afinidade pelo Ag são ativados e passam a proliferar, constituindo o centro germinativo, onde passam também pelos processos de hipermutação somática, no qual ocorrem mutações pontuais no gene da Ig que permitem pequenas alterações na especificidade da Ig de cada clone, e de troca de classe da Ig (Figura 2).

Desta forma, os clones que vão surgindo cujas Ig possuem alta afinidade ao antígeno apresentado pelos linfócitos T da zona marginal são selecionados positivamente, estimulados a proliferar e se diferenciar e encaminhados para o sangue periférico onde secretaram anticorpos ou permanecem marginais ao centro germinativo e se tornam células de memória. Por outro lado, a grande maioria não é selecionada e todos estes têm o processo apoptótico ativado, morrendo ali mesmo, e seus restos são fagocitados por macrófagos residentes (Figura 2) (Guzman-Rojas *et al.*, 2002; Hennessy *et al.*, 2004; Hoffman *et al.*, 2005; Park e Choi, 2005; Klein e Dalla-Favera, 2008).

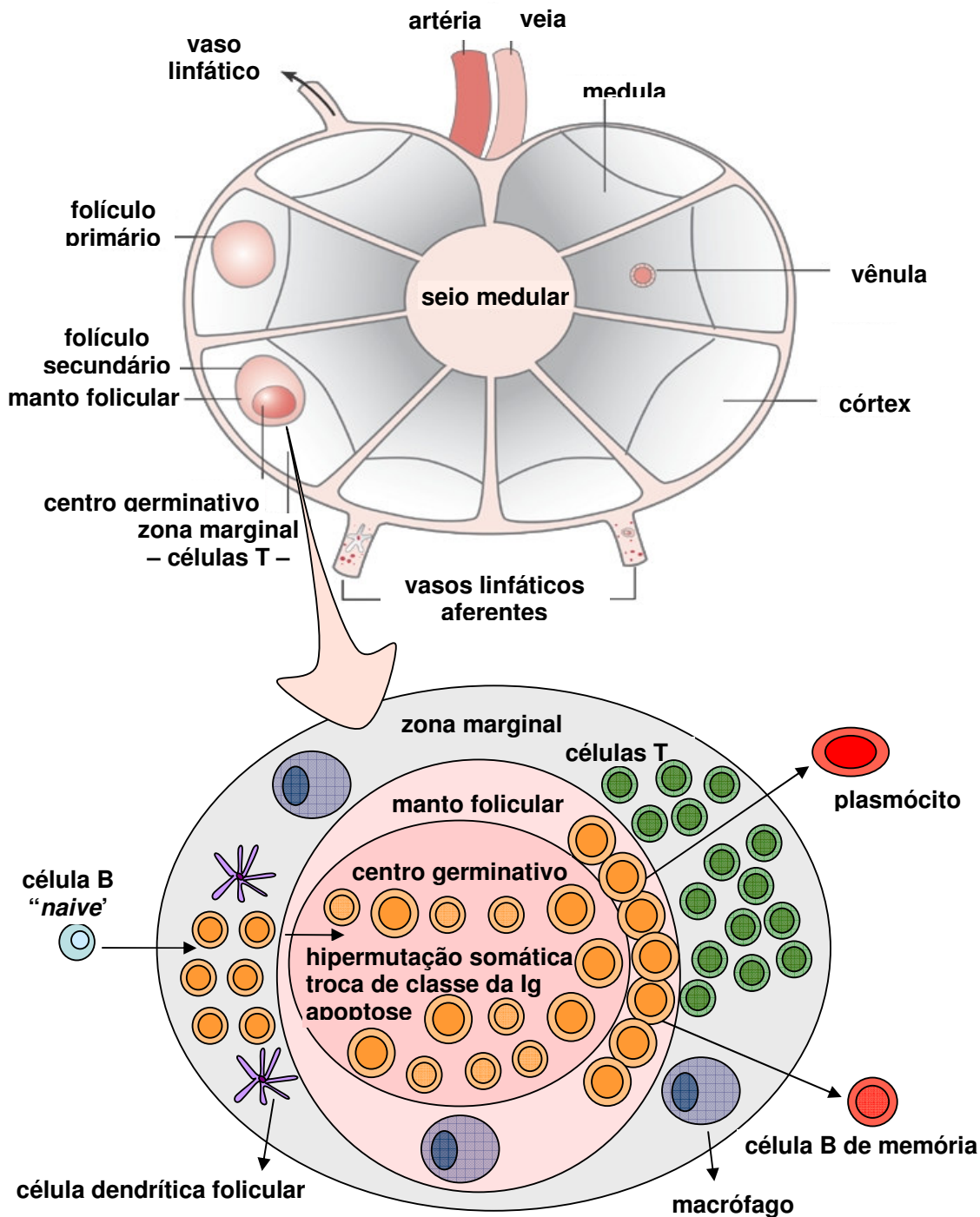


Figura 2: Representação esquemática da anatomia de um linfonodo com destaque para a região cortical onde se desenvolve o centro germinativo. Nesta região, as células B "naive" reativas aos antígenos apresentados pelas células dendríticas foliculares proliferam compondo o centro germinativo, onde os novos linfócitos B sofrem os processos de hipermutação somática e troca de classe de Ig. Apenas os que apresentam alta afinidade ao antígeno em questão recebem sinais de sobrevivência e os demais entram em apoptose. As células B selecionadas positivamente pelo reconhecimento ao antígeno apresentado pelos linfócitos T da zona marginal se acumulam ao redor do centro germinativo e são conduzidos ao sangue periférico para o combate à infecção (plasmócitos) ou são mantidas no linfonodo como células B de memória.



Além disso, foi observado que os linfócitos em passagem pelo centro germinativo têm um perfil de expressão gênica proliferativo e pró-apoptótico. São chamados de centroblastos (Figura 3a) e acredita-se que de um desses clones se origine o LDGCB na sua variante centroblástica (Guzman-Rojas *et al.*, 2002; Hoffman *et al.*, 2005; Klein e Dalla-Favera, 2008) (Figura 3b). Em contrapartida, os linfócitos positivamente selecionados são recrutados para a produção e liberação de anticorpos no sangue periférico, têm um perfil de expressão gênica anti-apoptótico (os que se tornam células de memória vivem por muitos anos) e apresentam superexpressão de Ig. São chamados de imunoblastos (Figura 3c) e acredita-se que de um desses clones se origine o LDGCB na sua variante imunoblástica (Figura 3d) (Guzman-Rojas *et al.*, 2002; Hoffman *et al.*, 2005; Klein e Dalla-Favera, 2008).

A discriminação entre estes dois subtipos de LDGCB é feita essencialmente pela morfologia das células tumorais (Figura 1). Inclusive, um dos motivos que levaram à inclusão de ambos os subtipos em uma mesma classificação foi a subjetividade da classificação morfológica. Mas talvez o principal motivo tenha sido a ausência de estudos conclusivos sobre as diferenças entre os subtipos centroblástico e imunoblástico no tocante a resposta ao tratamento (Harris *et al.*, 1999). Por outro lado, hoje em dia o recurso da imunofenotipagem vem se consolidando como uma ferramenta importante na discriminação dos subtipos e variantes de LDGCB, quando a morfologia deixa dúvidas (Pileri *et al.*, 2002; De Leval e Harris, 2003). Além disso, diversos estudos com longos períodos de acompanhamento clínico dos pacientes mostraram que o subtipo imunoblástico apresenta um pior prognóstico do que o centroblástico, mediante o mesmo esquema de tratamento, embora nos primeiros dois anos a resposta ao tratamento possa ser semelhante (Engelhard *et al.*, 1997; Salar *et al.*, 1998; Baars *et al.*, 1999; Diebold *et al.*, 2002).

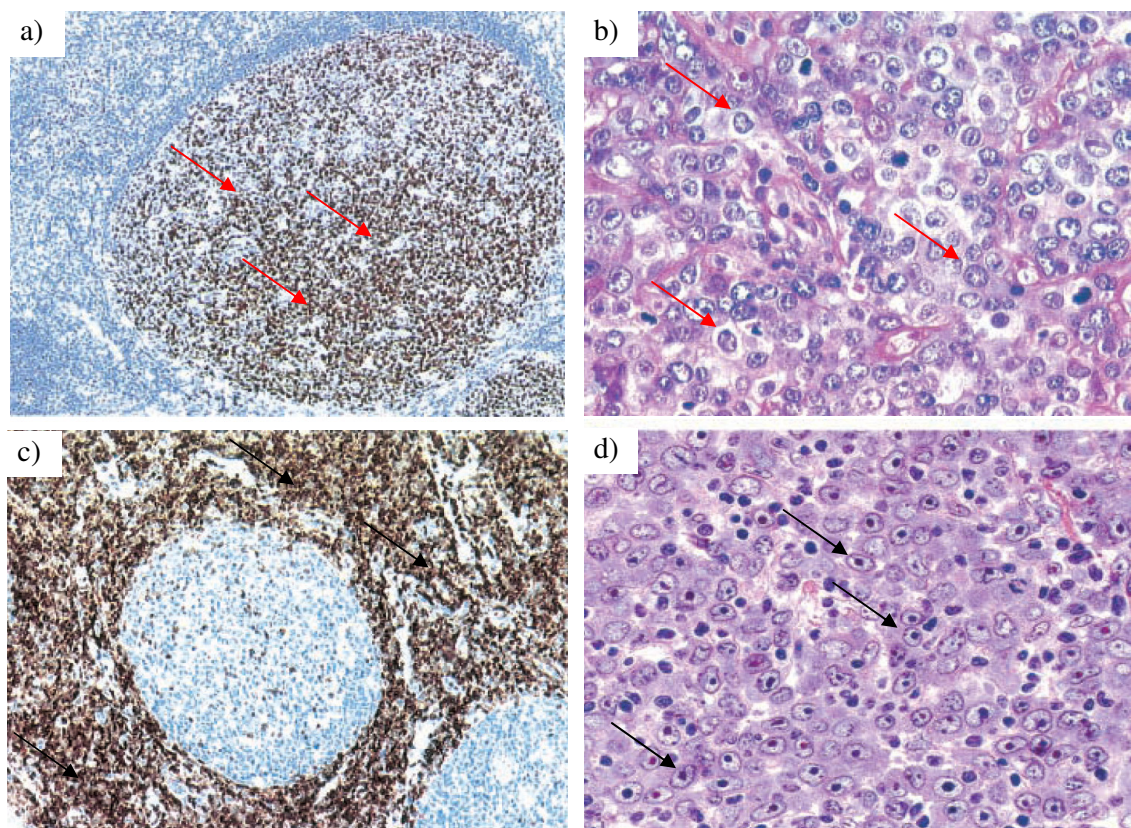


Figura 3: Variantes mais comuns dos LDGCB e suas contrapartidas normais. Centroblastos normais apresentam um perfil de expressão gênica proliferativo (a). Deles acredita-se que se origine o LDGCB na sua variante centroblástica (b). Por outro lado, imunoblastos normais apresentam um perfil de expressão gênica anti-apoptótico (c). Deles acredita-se que se origine o LDGCB na sua variante imunoblástica (d). Coloração marrom da expressão de Bcl-6 (a) e Bcl-2 (b) detectada pelo método imunohistoquímico de imunoperoxidase e coloração com Hematoxilina-Eosina de um tumor centroblástico (c) e de um imunoblástico (d). Seta vermelha: centroblasto; seta preta: imunoblasto. Adaptado de (De Leval e Harris, 2003).

Devido à heterogeneidade de respostas ao tratamento e à baixa taxa de cura observada nos pacientes com LDGCB, torna-se importante identificar fatores biológicos que tenham importância prognóstica e que possam ajudar a compreender a patogênese e o curso da doença. Neste contexto, nos últimos anos tem se observado que diversos mecanismos que levam à perda da regulação da apoptose e do ciclo celular nos LDGCB estão envolvidos na patogênese da doença. Dentre eles, foram observadas alterações nas vias de p53 e Bcl-2 e na expressão das proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) (Bai *et al.*, 2005; Akyurek *et al.*, 2006). No entanto, o impacto dessas alterações na resposta ao tratamento no contexto do subtipo morfológico é desconhecido.

## 1.2 APOPTOSE

Acredita-se que durante o processo evolutivo os organismos multicelulares apareceram concomitantemente ao desenvolvimento de mecanismos controladores de morte celular. O “altruísmo” de uma célula que “se suicida” perante a detecção de uma ameaça ao conjunto do organismo é observado em diversas situações fisiológicas. Algumas destas situações são a morfogênese dos tecidos durante o desenvolvimento embrionário, a resposta a uma infecção viral, a detecção de um dano irreparável no DNA, a exposição a alto estresse oxidativo ou a quimioterápicos, a privação de sinais de sobrevivência, como fatores de crescimento, citocinas e hormônios, e uma série de outras circunstâncias na manutenção da homeostase. O processo de morte celular programada é conservado em todos os animais estudados até o momento, de cnidários a mamíferos (Figura 4), e também está presente em plantas, o que denota sua extrema importância para o sucesso evolutivo dos organismos multicelulares (Figura 4) (Ameisen, 2002; Bai *et al.*, 2005; Vermeulen *et al.*, 2005).

Ao fenótipo de morte celular programada mais comumente observado denominou-se “apoptose”. O termo vem de “queda”, em relação à queda das folhas das árvores no outono, o que remete ao “altruísmo” da célula que morre para permitir o sucesso do organismo (Ameisen, 2002). Morfologicamente, a apoptose envolve alterações características como encolhimento da célula, mudança de conformação com manutenção parcial da impermeabilidade da membrana celular, permeabilização da membrana externa da mitocôndria, condensação e fragmentação da cromatina, fragmentação do DNA genômico, modificações no citoesqueleto e segmentação da célula nos chamados corpúsculos apoptóticos (Figura 5) (Ameisen, 2002; Kroemer *et al.*, 2005; Vermeulen *et al.*, 2005; Galluzzi *et al.*, 2007).

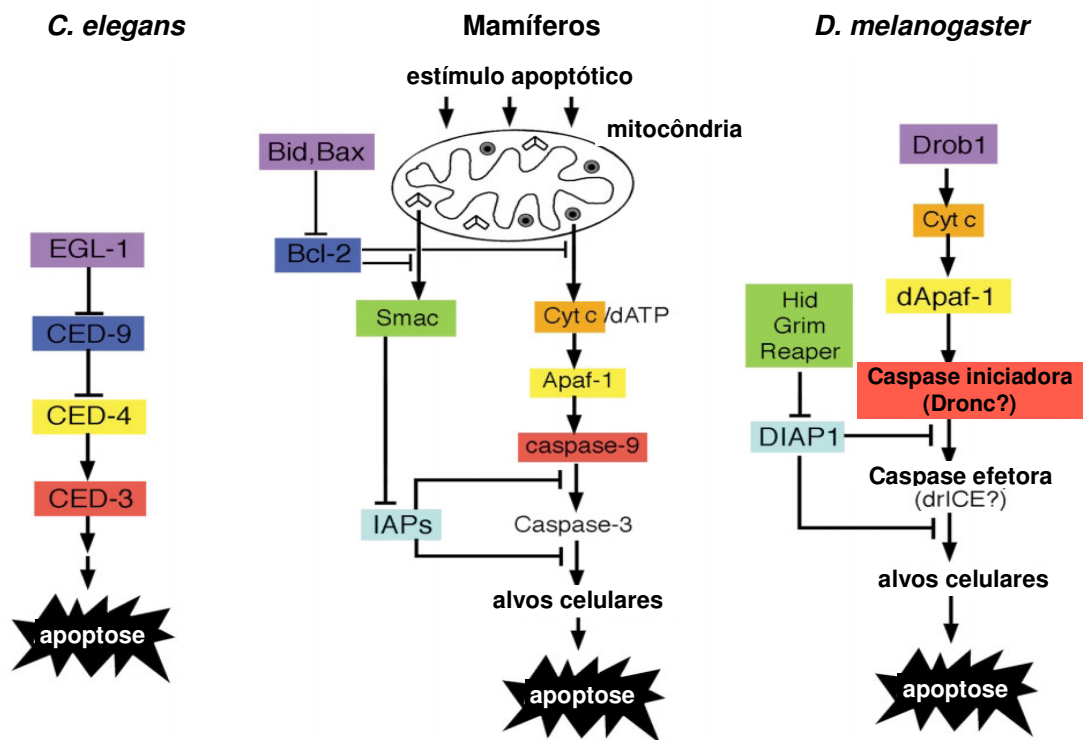


Figura 4: Representação esquemática do mecanismo apoptótico ressaltando sua conservação nas espécies animais de nematodos (*C. elegans*), insetos (*D. melanogaster*) e mamíferos. Proteínas homólogas entre as espécies estão representadas pela mesma cor.

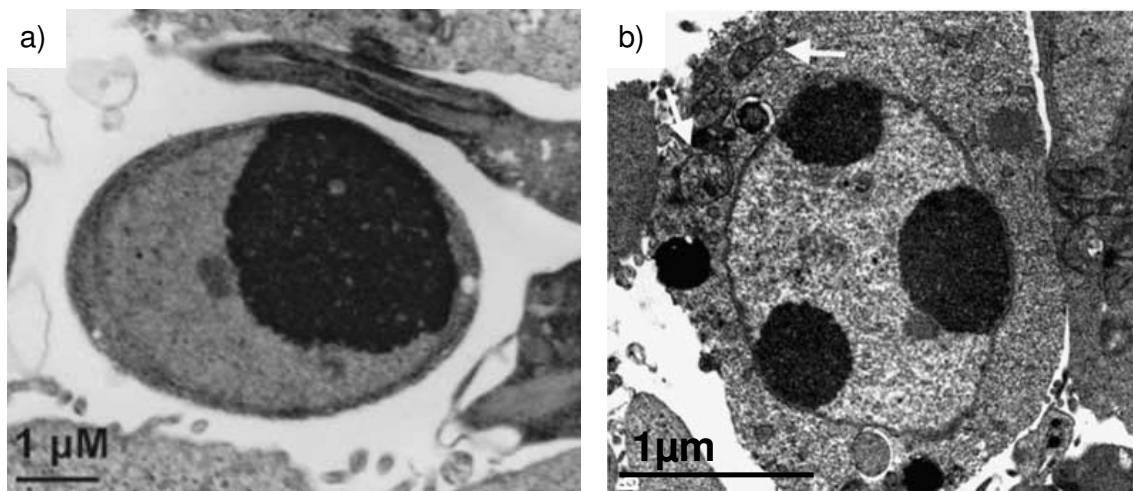


Figura 5: Características morfológicas da apoptose. Célula de carcinoma de não-pequenas células de pulmão em apoptose exibindo condensação nuclear e encolhimento celular (a) e célula epitelial em apoptose exibindo fragmentação da cromatina e manutenção da integridade da mitocôndria (seta branca) (b). Adaptado de (Kroemer *et al.*, 2005; Galluzzi *et al.*, 2007).



Na via extrínseca, ou via de receptor de morte, mediada por citocinas, a célula recebe o comando social ou externo de morrer. Esta via é iniciada pela ligação de um ligante da família do Fator de Necrose Tumoral (TNF), como TNFa, FasL, Apo3L e TRAIL, ao respectivo receptor (TNF-R, Fas/CD95, receptores da família DR, entre outros), ativando-o. A ativação destes receptores leva a homotrimerização e conseqüente recrutamento de proteínas adaptadoras, como FADD para Fas, que, juntamente à procaspase-8, compõem um complexo proteolítico chamado DISC (*Death receptor-Induced Signaling Complex*), no qual a procaspase-8 é autoclivada para sua forma ativa caspase-8, que por sua vez, vai clivar as procaspases -3, -6 e -7, ativando-as (Figura 6) (Ameisen, 2002; Bai *et al.*, 2005; Vermeulen *et al.*, 2005).

A maioria dos quimioterápicos empregados no tratamento do câncer, incluindo os utilizados no protocolo terapêutico dos LDGCB, de modo geral leva a ativação da via intrínseca da apoptose (Hoffman *et al.*, 2005). Na via intrínseca, ou via mitocondrial, a célula detecta algum dano ou agressão incorrigível em si própria, como uma infecção viral, detecção de um dano irreparável no DNA, privação de sinais de sobrevivência, exposição a alto estresse oxidativo ou a quimioterápicos. Estes sinais ativam a via intrínseca do processo apoptótico que é iniciada pela perda do potencial de membrana, com conseqüente permeabilização da membrana externa da mitocôndria por membros da família Bcl-2 e liberação de Citocromo c do espaço intramembranar da mitocôndria para o citoplasma, juntamente com outros fatores pró-apoptóticos. No citoplasma, Citocromo c ativa a proteína adaptadora Apaf-1 (*Apoptotic Protease Activating-Factor 1*), que recruta procaspase-9, formando o “DISC mitocondrial” ou “apoptossoma” na presença de ATP. Neste contexto, procaspase-9 é autoclivada e passa a clivar as procaspases -3, -6 e -7, ativando-as (Figura 6) (Ameisen, 2002; Bai *et al.*, 2005; Vermeulen *et al.*, 2005; Elmore, 2007).

Sabe-se que uma via pode amplificar a outra e que existem células em que a quantidade de caspase-8 é suficiente para ativar a apoptose via receptor de morte e células em que essa quantidade não é suficiente e a via mitocondrial funciona como um amplificador do sinal da via extrínseca. Realizando a integração das duas vias, a proteína Bid, membro da família Bcl-2, é clivada e ativada pela caspase-8 e se transloca para a mitocôndria, ativando a via mitocondrial (Figura 6) (Ameisen, 2002; Bai *et al.*, 2005; Vermeulen *et al.*, 2005).

As vias extrínseca e intrínseca convergem para a ativação de cisteíno-proteases da família das caspases (Figura 6). As caspases são enzimas que contêm resíduos de cisteína em seus sítios ativos e clivam substratos especificamente em ligações de resíduos de ácido aspártico com o resíduo diretamente N-terminal a ele. Já foram descritas quatorze caspases em mamíferos, sendo que nem todas estão relacionadas diretamente a apoptose; algumas estão envolvidas na maturação de citocinas pró-inflamatórias (Hengartner, 2000; Slee *et al.*, 2001; Ameisen, 2002; Bai *et al.*, 2005; Vermeulen *et al.*, 2005; Elmore, 2007).

As caspases que conduzem o processo apoptótico estão presentes nas células normais como enzimas inativas, ou zimogênios, as chamadas procaspases, que são compostas de três domínios, o domínio N-terminal, que é clivado da procaspase durante sua ativação, e os domínios p10 e p20, que compõem a caspase ativada. Mediante o estímulo apoptótico, as caspases chamadas “iniciadoras” são autoativadas através da interação com outras proteínas, como no caso da procaspase-8 com as proteínas do DISC, e da procaspase-9 com as proteínas do apoptossoma. Já as chamadas caspases “efetoras”, caspases-3, -6 e -7, são subsequentemente ativadas pela clivagem de seus zimogênios pelas caspase-8 e caspase-9 (Hengartner, 2000; Vermeulen *et al.*, 2005; Elmore, 2007).

Uma vez ativadas, as caspases -3, -6 e -7, reconhecem e clivam uma variedade de substratos protéicos, inativando-os na maioria dos casos ou promovendo sua ativação pela remoção de domínios de regulação negativa. Em última instância, a atividade das caspases -3,

-6 e -7 resulta nas alterações morfológicas observadas durante a apoptose e na concretização do processo apoptótico (Hengartner, 2000; Vermeulen *et al.*, 2005; Elmore, 2007). Um dos substratos das caspases é a subunidade que regula negativamente a atividade da enzima que cliva o DNA. Com a remoção do ICAD (*Inhibitor of Caspase-Activated DNase*), a subunidade catalítica CAD (*caspase-Activated DNase*), fica livre para atuar na clivagem do DNA entre os nucleossomos, resultando na sua fragmentação em segmentos múltiplos de 180 pares de bases (Liu *et al.*, 1997; Enari *et al.*, 1998; Sakahira *et al.*, 1998; Nagata, 2000). Além disso, as caspases -3, -6 e -7, também contribuem para a destruição do núcleo, pela clivagem de lamínas nucleares, e para a perda do formato da célula, pela clivagem de proteínas de citoesqueleto como fodrinas e gelsolinas. (Hengartner, 2000; Ameisen, 2002; Bai *et al.*, 2005; Vermeulen *et al.*, 2005; Elmore, 2007).

Dada a importância dos mecanismos de morte celular programada para o desenvolvimento, a homeostase, e a prevenção de tumores, o destino das células está constantemente sob o controle de um balanço entre a expressão e a atividade de proteínas anti e pró-apoptóticas. Além disso, o processo apoptótico pode ser modulado em diversas etapas, como na liberação do Citocromo c da mitocôndria pela família Bcl-2 e na ativação e atividade das caspases pelas Proteínas Inibidoras da Apoptose (IAPs) (Figura 6) (Ameisen, 2002; Bai *et al.*, 2005; Vermeulen *et al.*, 2005; Akyurek *et al.*, 2006; Elmore, 2007).

### 1.2.1 Bcl-2

A proteína Bcl-2, de 26 KDa, é uma proteína integral de membrana e foi o primeiro membro da família descrito. Seu gene foi inicialmente identificado no ponto de quebra da translocação t(14;18) em um linfoma folicular de célula B humano. Desse modo, observou-se que a superexpressão da *B cell lymphoma 2* aumenta a resistência a apoptose nos linfócitos



mediante uma grande variedade de estímulos (Opferman e Korsmeyer, 2003; Hoffman *et al.*, 2005; Klener *et al.*, 2006).

As proteínas da família Bcl-2 desempenham um papel fundamental na decisão de comprometimento ou evasão da célula à apoptose. Através do controle da permeabilidade mitocondrial e, conseqüentemente da liberação do Citocromo c e demais fatores pró-apoptóticos acima descritos, algumas proteínas podem induzir a propagação e outras o bloqueio do estímulo apoptótico (Opferman e Korsmeyer, 2003; Bai *et al.*, 2005; Klener *et al.*, 2006; Elmore, 2007). Até hoje foram descritos 25 membros da família Bcl-2 incluindo os pró-apoptóticos Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik e Blk e os anti-apoptóticos Bcl-2, Bcl-x, Bcl-xL, Bcl-xS, Bcl-w, BAG. Essas proteínas possuem até quatro regiões de homologia a Bcl-2, BH1 a BH4 (*Bcl-2 Homology regions*), que tridimensionalmente constituem segmentos em  $\alpha$ -hélice (Gross *et al.*, 1999; Ameisen, 2002; Opferman e Korsmeyer, 2003; Bai *et al.*, 2005; Klener *et al.*, 2006; Elmore, 2007).

Os membros da família Bcl-2 podem ser classificadas de acordo com a homologia de suas BH às da Bcl-2. Os membros anti-apoptóticos Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 e A1 são altamente conservados, possuindo as quatro regiões BH, sendo que BH1, BH2 e BH3 formam uma estrutura capaz de se ligar a BH3 dos outros membros da família Bcl-2 (Gross *et al.*, 1999; Opferman e Korsmeyer, 2003; Bai *et al.*, 2005; Klener *et al.*, 2006; Elmore, 2007). Já os membros pró-apoptóticos podem ser categorizados pelo número de domínios BH que possuem. Desta forma, os “multidomain”, Bax, Bak e Bok, possuem BH1, BH2 e BH3, que também são capazes de formar a estrutura que se associa a BH3 dos outros membros da família, e os que possuem apenas BH3 (“*BH3 only*”), Bid, Bad, Bim, Bik, Noxa e PUMA, não apresentam homologia além deste chamado “domínio de morte mínimo” (Gross *et al.*, 1999; Opferman e Korsmeyer, 2003; Klener *et al.*, 2006; Elmore, 2007).

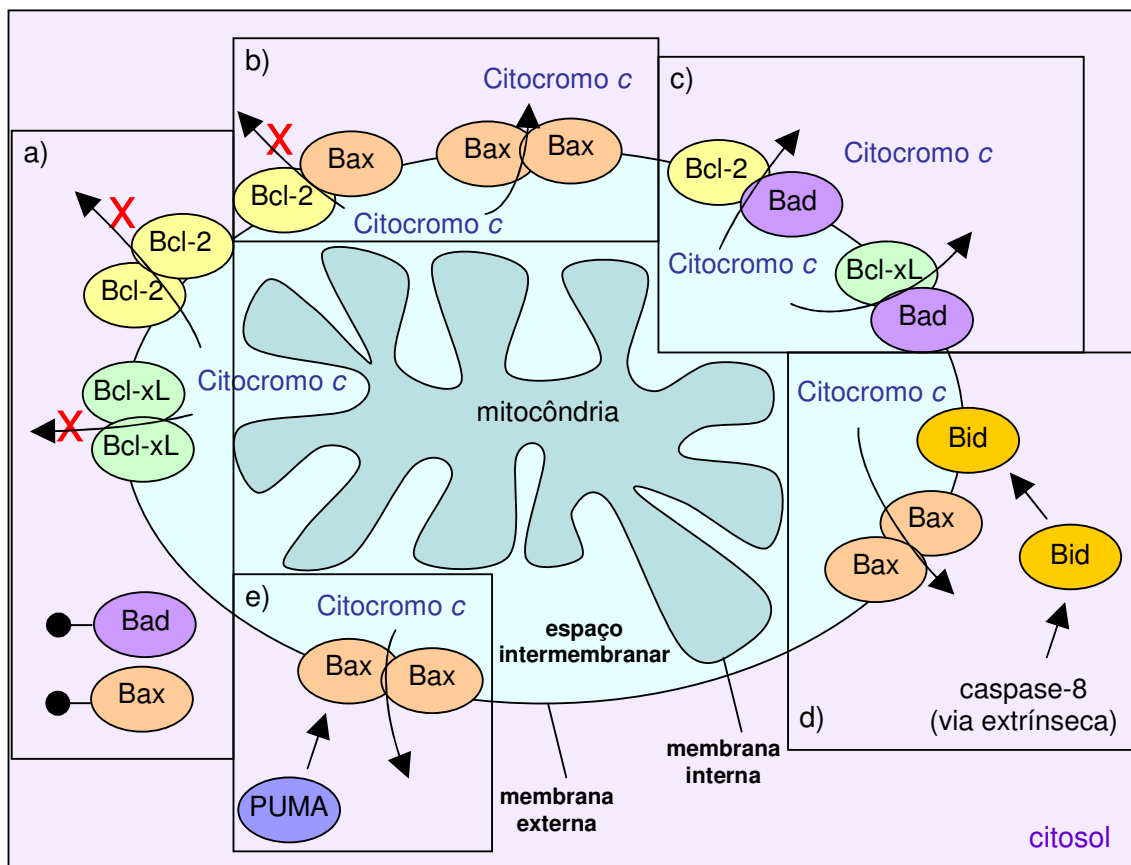


Figura 7: Representação esquemática do mecanismo de ação de alguns dos membros da família Bcl-2. Quando Bad e Bax encontram-se fosforiladas, ficam seqüestradas no citosol, permitindo a homodimerização de Bcl-2 e Bcl-xL, o que impede a liberação do Citocromo *c* do espaço intermembranar mitocondrial, inibindo a apoptose (a). Uma vez desfosforilada, Bax é translocada para a mitocôndria, onde pode se heterodimerizar com Bcl-2, mantendo o bloqueio à liberação de Citocromo *c*, ou se homodimerizar, permeabilizando a membrana externa da mitocôndria e permitindo a liberação de Citocromo *c* para o citosol e a ativação da via intrínseca da apoptose (b). Quando Bad está desfosforilada, também se transloca para a mitocôndria, onde é capaz de se associar tanto à Bcl-2 quanto à Bcl-xL, permitindo a liberação de Citocromo *c* e, assim, ativando a via intrínseca da apoptose (c). Em um mecanismo amplificador de sinal, a via intrínseca também pode ser ativada pela via extrínseca através da clivagem pela caspase-8 de Bid, que se transloca para a mitocôndria e ativa a via intrínseca via homodimerização de Bax, resultando na liberação de Citocromo *c* para o citosol (d). Outro mecanismo de ativação da via intrínseca é a atividade de PUMA que também leva a homodimerização de Bax, culminando na liberação de Citocromo *c* (e).

Na dinâmica da sinalização, a principal atuação da família Bcl-2 é através de homo ou heterodimerização. Observa-se, por exemplo, que dímeros de Bax promovem a apoptose, enquanto dímeros de Bax/Bcl-2 ou só de Bcl-2 inibem a apoptose. Além disso, Bad pode se dimerizar com Bcl-2 e Bcl-xL, neutralizando seu efeito protetor e assim favorecendo a

apoptose. Por outro lado, quando não estão associados à Bad, Bcl-2 e Bcl-xL impedem a liberação de Citocromo c e parecem também impedir a ativação de caspase-3 e caspase-9. Ademais, parece que a superexpressão de Bcl-2 leva a inibição da expressão de Bcl-xL, e vice-versa, indicando uma regulação recíproca entre Bcl-2 e Bcl-xL (Figura 7) (Gross *et al.*, 1999; Bai *et al.*, 2005).

Em células B normais, a expressão de Bcl-2 topograficamente se restringe às regiões marginais ao centro germinativo onde há células sobreviventes ao processo fisiológico de hipermutação somática (Figura 3) (Guzman-Rojas *et al.*, 2002; Hoffman *et al.*, 2005). Com relação ao LDGCB, sabe-se que aproximadamente um terço dos casos apresenta translocações que aloca o gene *bcl-2* a genes da imunoglobulina, a mais freqüente sendo a t(14;18), o que torna a proteína Bcl-2 expressa constitutivamente e em altos níveis. Além disso, parece haver uma associação entre a superexpressão de Bcl-2 e os casos em que houve transformação histológica. Ou seja, um linfoma folicular de baixo grau, dos quais 85% dos casos apresentam translocações que tornam o gene *bcl-2* constitutivamente expresso, poderia “evoluir” para um linfoma de alto grau como o LDGCB. Uma possível explicação para esta teoria seria a de que como a superexpressão de Bcl-2 é um fator que favorece a sobrevivência da célula tumoral, a ocorrência de mutações subseqüentes que transformam ainda mais a célula também seria favorecida (Hoffman *et al.*, 2005). Por outro lado, nos LDGCB a superexpressão de Bcl-2 nem sempre está associada à translocação t(14;18) (Barrans *et al.*, 2003). Nesse contexto, foi observado que ela também pode ser ocasionada pela amplificação ou ganho do cromossomo 18q, onde se localiza o gene *bcl-2* (Monni *et al.*, 1997). Outra possibilidade é que mutações na janela aberta de leitura do gene *bcl-2* alterem sua afinidade por fatores de modo a levar à sua superexpressão (Monni *et al.*, 1999).

Em termos de prognóstico, parece que a significância da expressão de Bcl-2 nos LDGCB está restrita aos pacientes com menos de 65 anos de idade (Maartense *et al.*, 2004).

Ainda assim, embora alguns grupos tenham obtido resultados controversos, foi observado um valor negativo da expressão de Bcl-2 e/ou da presença da translocação t(14;18) em LDGCB na maioria dos estudos (Kramer *et al.*, 1996; Monni *et al.*, 1997; Kramer *et al.*, 1998; Monni *et al.*, 1999; Barrans *et al.*, 2003; Maartense *et al.*, 2004). Entretanto, não se sabe o impacto na resposta ao tratamento da expressão de Bcl-2 especificamente nos LDGCB centroblasticos.

### 1.2.2 p53

A proteína de 53 KDa (p53) foi descrita em 1979 e inicialmente foi sugerido que teria um papel na transformação maligna de células normais (Lane e Crawford, 1979; Linzer e Levine, 1979). Dez anos mais tarde, foi observado que diversos tipos de tumor tinham mutações no seu gene, localizado no braço curto do cromossomo 17 na posição 17p13, e que a proteína selvagem era capaz de impedir a transformação maligna. Deste modo, foi possível concluir que a p53 é, na verdade, uma proteína supressora de tumores (Eliyahu *et al.*, 1989; Finlay *et al.*, 1989; Nigro *et al.*, 1989). Atualmente, sabe-se que cerca de metade dos tumores sólidos humanos apresentam mutações no gene *TP53*. Na outra metade, é freqüente a perda da regulação da atividade da p53 pelos fatores que a modulam ou pelo efeito de oncoproteínas virais (Staples *et al.*, 2008).

Além da p53, foram descritas outras proteínas com estrutura similar em vertebrados, a p63 e a p73. Foi observado que seus genes alvos são semelhantes aos da p53 e ambas tem função antitumoral. No entanto, nenhuma das duas apresenta o papel crucial da p53 na supressão de tumores (Vousden e Lane, 2007; Staples *et al.*, 2008).

A proteína p53 é um fator de transcrição praticamente indetectável em células normais cuja curta meia-vida é rigorosamente controlada através da ubiquitinação pela proteína HDM2 (*Human Double Minute-2*) (Figura 8a). Diversos mecanismos contribuem ainda para o

controle de sua ativação, como outras alterações pós-translacionais por quinases e acetilases, modulação de sua atividade transcricional por co-ativadores transcripcionais, entre outros (Bensaad e Vousden, 2007; Efeyan e Serrano, 2007; Vousden e Lane, 2007; Liu *et al.*, 2008; Meulmeester e Jochemsen, 2008; Riley *et al.*, 2008). No entanto, mediante qualquer tipo de estresse celular, sua degradação é bloqueada e a p53 fica livre para ativar e reprimir a transcrição de uma série de genes envolvidos primordialmente em parada do ciclo celular (de maneira reversível ou irreversível) e estímulo à apoptose, sendo considerada uma das proteínas mais importantes no controle do ciclo celular e da apoptose (Figura 8) (Bensaad e Vousden, 2007; Efeyan e Serrano, 2007; Vousden e Lane, 2007; Liu *et al.*, 2008; Meulmeester e Jochemsen, 2008; Riley *et al.*, 2008). Não obstante, cada tipo de estímulo estabiliza e ativa p53 por uma via diferente, o que contribui para seu engajamento na resposta seletiva ao tipo de estresse que a ativou (Vousden e Lane, 2007).

Contribuindo para sua atividade anti-tumoral, a p53 tem um papel importante e complexo na modulação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ROS). Por um lado, p53 pode contribuir para a indução de ROS e inibir a transcrição de genes antioxidantes, levando a célula a apoptose. Mas, por outro lado, p53 também pode ativar a transcrição de genes antioxidantes, mediante concentrações celulares mais baixas de ROS, o que parece ser crucial para a resposta celular a pequenos estresses que ocorrem durante o desenvolvimento e crescimento normais (Bensaad e Vousden, 2007; Vousden e Lane, 2007; Liu *et al.*, 2008).

No processo apoptótico, p53 controla, entre outras, a expressão da proteína PUMA (*P53 Upregulated Modulator of Apoptosis*) através da ativação de sua transcrição. Mediante a expressão de PUMA, Bax se transloca para dentro da mitocôndria, onde se multimeriza, facilitando a permeabilização da membrana externa da mitocôndria e permitindo a conseqüente liberação de Citocromo *c* (Figura 7e). Desta forma, embora sua expressão não

seja alterada pela p53, Bax também funciona como um importante mediador de p53 (Figura 8b) (Phillips e Luisi, 2000; Vousden e Lane, 2007; Meulmeester e Jochemsen, 2008; Riley *et al.*, 2008).

Outro gene envolvido na apoptose que é alvo de regulação pela p53 é o da proteína Bcl-2. Sabe-se que a ativação de ambos os promotores de *bcl-2* p1 e p2 pelo fator de transcrição da família POU Brn-3a é impedida pela p53, que é capaz de se ligar a sítios adjacentes ao de Brn-3a e interagir diretamente com ele. Sendo assim, a atividade da p53 reprime a expressão de Bcl-2, favorecendo a apoptose (Figura 8c) (Phillips e Luisi, 2000; Vousden e Lane, 2007; Meulmeester e Jochemsen, 2008; Riley *et al.*, 2008). Além disso, foi sugerido que a p53 poderia competir com Bax e Bak pela associação a Bcl-2 e Bcl-xL, permitindo que fiquem livres para atuar na permeabilização da membrana externa da mitocôndria e assim levando à apoptose (Figura 8d) (Meulmeester e Jochemsen, 2008).

Em paralelo, também já foi descrito um controle mútuo entre p53 e a IAP survivina. Por um lado, a p53 selvagem parece regular negativamente a expressão de survivina reprimindo a ativação de seu promotor diretamente, se ligando a ele e assim exercendo uma barreira física, ou indiretamente, ativando p21 e conseqüentemente levando a repressão de E2F, que seria um potencial ativador (Figura 8e) (Hoffman *et al.*, 2002), mas perde esta capacidade quando mutada (Mirza *et al.*, 2002). Por outro, à atividade da survivina foi associada uma menor expressão de p53, via inibição da clivagem de MDM2 pelas caspases (Wang *et al.*, 2004).

Foi sugerido que alterações nas vias de p53, p27 e Rb possam contribuir para um comportamento clínico mais agressivo dos LDGCB (Bai *et al.*, 2007). Ademais, nos linfomas foliculares a expressão de p53 parece ser capaz de predizer a transformação para LDGCB e está relacionada a uma pior sobrevida (Pennanen *et al.*, 2008). No entanto, a associação da detecção imunohistoquímica de p53 com a expressão de outras proteínas envolvidas na



um gene presente no DNA do baculovírus *Cydia pomonella*, sendo capaz de impedir a apoptose das células do inseto *Spodoptera frugiperda* infectadas (Crook *et al.*, 1993).

Os domínios BIR são seqüências de aproximadamente 70 aminoácidos que formam uma estrutura semelhante a um dedo de zinco com resíduos de histidina e cisteína. Sua principal função é a mediação de interações proteína-proteína. Inclusive, a presença de múltiplas cópias de domínios BIR em uma IAP aumenta sua afinidade pelas suas proteínas-alvo e a gama de proteínas com as quais a IAP pode interagir (Srinivasula e Ashwell, 2008). As IAPs contem até três domínios BIR na porção N-terminal, sendo que BIR1 está relacionado à interação com diversos mediadores de sinalização, inclusive com outras IAPs (Dohi *et al.*, 2004) e moléculas não relacionadas diretamente a apoptose (como ativadores de NF $\kappa$ B e TGF- $\beta$  (Lu *et al.*, 2007)), e BIR2 e BIR3 estão relacionados à ligação às caspases e a outras proteínas reguladoras da apoptose (como as moduladoras das IAPs Smac/DIABLO e Omi-HtrA2 (Srinivasula *et al.*, 2000; Shiozaki e Shi, 2004)).

Além de domínios BIR, as IAPs podem conter outras seqüências e regiões determinantes para sua atividade como domínios RING (*Really Interesting New Gene*) ou CARD (*Caspase-Associated Recruitment Domain*) na porção C-terminal. O domínio RING confere atividade ubiquitina-ligase (E3) e, uma vez em associação com uma enzima ativadora de ubiquitina (E1) e uma proteína conjugadora de ubiquitina (E2), catalisa a ubiquitinação (resultando na degradação via proteassoma) de proteínas-alvo como proteínas envolvidas na apoptose e das próprias IAPs (Srinivasula e Ashwell, 2008). Já o domínio CARD está presente na procaspase-9 e é essencial para sua associação direta a Apaf-1 e subsequente ativação (Ameisen, 2002; Vermeulen *et al.*, 2005; Elmore, 2007). No entanto, seu papel nas IAPs, embora relacionado à interação proteína-proteína, ainda não está bem compreendido (Lacasse *et al.*, 2008; Srinivasula e Ashwell, 2008).



Até o presente, foram descritas oito IAPs em mamíferos (XIAP, c-IAP1, c-IAP2, survivina, NIAP, ML-IAP, BRUCE e ILP2) além de diversas proteínas homólogas em invertebrados e vírus. Contendo 497 resíduos de aminoácidos, a *X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein* (XIAP) possui os três domínios BIR e um RING, e é a mais potente das IAPs, enquanto a survivina, com 142 resíduos, é a menor delas, sendo composta de um único domínio BIR (Srinivasula e Ashwell, 2008). Atualmente, sabe-se que as IAPs são capazes de impedir a apoptose por inibição direta ou indireta das caspases, dando tempo a célula para reparar o dano que ativou a via apoptótica e evitando que as células morram em resposta a danos que poderiam ser reparados (Deveraux *et al.*, 1997; Roy *et al.*, 1997; Deveraux *et al.*, 1998; O'connor *et al.*, 2000; Shin *et al.*, 2001; Ameisen, 2002; Vermeulen *et al.*, 2005; Elmore, 2007).

Vários estudos têm correlacionado a superexpressão da IAPs à resistência ao tratamento quimioterápico em diversos tipos tumorais (Datta *et al.*, 2000; Tamm *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2003). Nos últimos anos, a survivina tem sido apontada como um fator prognóstico promissor em diversos tipos de tumor e como um alvo terapêutico interessante uma vez que sua expressão é rara em tecidos adultos diferenciados (Pennati *et al.*, 2007; 2008). Além disso, sua localização subcelular parece determinar a resposta ao tratamento de modo que survivina localizada no citoplasma teria um efeito “citoprotetor” enquanto survivina localizada no núcleo apontaria para uma deficiência desta função. Sendo assim, a consequência da sua localização no prognóstico em última análise poderia se traduzir na predominância nuclear como sendo um fator favorável enquanto na citoplasmática como um desfavorável, embora existam exceções (Stauber *et al.*, 2007). Por outro lado, a survivina possui uma importante função no ciclo celular, inicialmente sugerida pela sua expressão em G2/M (Li *et al.*, 1998) e posteriormente relacionada à estabilização de microtúbulos para formação do fuso acromático e participação no “*chromosomal passenger complex*”,

promovendo a associação correta das proteínas deste complexo aos cinetócoros e assim promovendo o desenrolar apropriado da mitose (Lens e Medema, 2003; Vader *et al.*, 2006; Mita *et al.*, 2008). Por este motivo, sua localização nuclear favorece a proliferação celular, o que, embora não relacionada à apoptose, poderia igualmente conferir vantagens à progressão tumoral (Pennati *et al.*, 2007). Desta forma, é possível que o valor prognóstico da localização subcelular da survivina esteja relacionado a características intrínsecas da biologia de cada tipo de tumor e, por isso, varie entre os diversos tipos de tumor existentes, precisando ser determinado para cada um em particular.

Nas hemopatias malignas, maiores níveis de survivina foram relacionados a um pior prognóstico (Zaffaroni *et al.*, 2005). Outros autores mostraram ainda que, em linhagem celular de LNH, a expressão de survivina e a proliferação celular foram significativamente inibidas e a taxa de apoptose foi aumentada por oligonucleotídeo antisense para o RNAm da survivina (Ansell *et al.*, 2004). Este resultado sugere que esta IAP pode ser considerada um alvo terapêutico atrativo em linfomas agressivos, como os LDGCB.

Com relação à XIAP, embora seja uma proteína citoplasmática, em diversas neoplasias sua expressão é detectada no núcleo, o que leva ao questionamento dos mecanismos que regulam a sua compartimentalização e o possível impacto na patogênese e resposta ao tratamento do câncer (Akyurek *et al.*, 2006; Vischioni *et al.*, 2006; Lacasse *et al.*, 2008; Srinivasula e Ashwell, 2008). Recentemente, observou-se que a indução de apoptose mediante administração de quimioterápicos com mecanismos de ação diferentes é capaz de ativar sua clivagem, gerando um fragmento contendo seus domínios BIR3 e RING, que é então translocado para o núcleo, onde pode ser que desempenhe alguma função, ainda desconhecida (Nowak *et al.*, 2004).

Sobre a importância da expressão e localização subcelular das IAPs nos LDGCB há poucos dados na literatura. Alguns estudos com amostras de LDGCB esclarecem algumas

questões, mas deixaram outras em aberto. Em um deles, a expressão da proteína survivina foi analisada e se correlacionou com uma menor sobrevida global (Adida *et al.*, 2000). No entanto, este trabalho avaliou apenas o impacto da expressão da IAP survivina. Em outro, a expressão das IAPs XIAP, c-IAP1 e c-IAP2 foi detectada em diferentes frequências nas amostras analisadas (Akyurek *et al.*, 2006), sugerindo diferentes impactos dessas proteínas na patogênese dos LDGCB, embora essas moléculas sejam estruturalmente semelhantes. Contudo, o impacto prognóstico da expressão das IAPs nos LDGCB centrolblásticos ainda não foi avaliado. Além disso, não há estudos elucidando a relação da expressão das IAPs com outros mecanismos de resistência nos LDGCB centrolblásticos.

### 1.3 KI-67

A proteína conhecida como ki-67 é bastante peculiar e sua expressão é interpretada como indicadora da proliferação celular em diversas neoplasias, sistemas fisiológicos e de resposta a injúrias (Endl e Gerdes, 2000; Scholzen e Gerdes, 2000). A ki-67 foi inicialmente detectada pelo anticorpo monoclonal homônimo produzido pela imunização de camundongos com núcleos de uma linhagem celular de linfoma de Hodgkin, que reconhecia um antígeno nuclear presente exclusivamente em células em proliferação (Gerdes *et al.*, 1983). Logo em seguida, foi observado que o antígeno em questão estava presente durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2, M), ausente apenas em células quiescentes ou saindo de G0 para entrar em G1, o que consolidou sua aplicabilidade como uma importante ferramenta na determinação da fração de células em proliferação em populações normais e tumorais (Gerdes *et al.*, 1984). Hoje se sabe que o anticorpo em questão reconhece de fato uma proteína, cuja seqüência primária foi inicialmente estimada através do *DNAc* correspondente (Gerdes *et al.*, 1991; Schluter *et al.*, 1993). Como não demonstrou homologia por nenhum outro polipeptídeo

descrito nem havia sido identificada sua função, a proteína foi nomeada ki-67, em referência ao anticorpo que a identificou (Gerdes *et al.*, 1991). Além disso, duas isoformas da proteína são majoritariamente detectadas e possuem pesos moleculares estimados em 345 e 395 KDa. As isoformas, resultantes de *splicing* alternativo do RNAm, diferem pela presença ou ausência da região codificada pelo exon 7 do seu gene (Schluter *et al.*, 1993; Duchrow *et al.*, 1996; Scholzen e Gerdes, 2000).

Análises da estrutura primária demonstraram que a proteína ki-67 é uma grande proteína com dois sinais de localização nuclear e oito “sinais de localização nuclear bipartidos” em potencial, o que condiz com sua detecção exclusivamente no núcleo, diversos sítios de fosforilação potencialmente alvos das enzimas Proteína Kinase C, cdc2 Kinase, além de dois sítios consensos de tirosina kinase, dois sítios de ligação a ATP/GTP em potencial, e um domínio funcional, o FHA (*ForkHead-Associated domain*), que parece atuar em interações proteína-proteína, estando envolvido no controle dos *checkpoints* do ciclo celular (Hofmann e Bucher, 1995), embora seu mecanismo de funcionamento ainda não seja totalmente compreendido. No entanto, a característica mais notável da proteína ki-67 é a presença de uma região com 16 elementos repetidos codificada por apenas um exon e localizada na porção central de ambas as suas isoformas (Gerdes *et al.*, 1991; Schluter *et al.*, 1993; Duchrow *et al.*, 1996; Scholzen e Gerdes, 2000).

Até o presente, foram descritos homólogos da proteína ki-67 humana apenas em mamíferos, dentre eles roedores, rato-canguru (uma espécie marsupial), cachorro, cavalo, ovelha, bem como em outros primatas. Além disso, ainda não foram identificadas proteínas correspondentes à ki-67 humana em invertebrados amplamente estudados como *Xenopus* e *Caenorhabditis*, e há somente alguns anos foram desenvolvidos Acs contra os equivalentes de ki-67 em roedores. Deste modo, por muitos anos após o seu descobrimento, não existiam modelos experimentais que possibilitassem auxiliar no esclarecimento do papel da proteína

ki-67 na fisiologia celular. Além disso, seu o grande peso molecular e sua alta suscetibilidade a proteases dificulta ensaios bioquímicos em que a proteína precisa ser fixada e separada das demais (Endl e Gerdes, 2000; Scholzen e Gerdes, 2000).

Devido aos dados obtidos a partir da sua estrutura primária, também foi proposto que os Acs disponíveis talvez reconheçam um antígeno inacessível caso a proteína ki-67 sofra modificações pós-translacionais ou se associe a outras proteínas ou a ácidos nucleicos, modificações estas que podem resultar em alterações em sua conformação e/ou mascarar o antígeno. Foi observado, por exemplo, que na presença de íons de Cálcio, a intensidade da detecção da ki-67 é reduzida (Endl e Gerdes, 2000; Scholzen e Gerdes, 2000).

Por estes motivos, atualmente sua função ainda é pouco compreendida.

Com todas as limitações, o que se sabe quanto à sua expressão é que o aumento na sua intensidade de detecção observado durante a intérfase não pode ser explicado apenas pela sua síntese durante este período uma vez que sua meia vida é relativamente curta (em torno de 60-90 minutos). Além disso, em termos de localização celular, a ki-67 é detectada em associação a diversas estruturas nucleares em momentos diferentes do ciclo celular, o que pode estar relacionado à existência de diversas variantes de *splicing* ou a modificações pós-translacionais (Endl e Gerdes, 2000; Scholzen e Gerdes, 2000). Com relação a sua função, já foi possível observar que a injeção de anticorpos anti-ki-67 diminui a taxa de divisão celular em células murinas (Starborg *et al.*, 1996) e que o silenciamento do RNAm da ki-67 inibe a síntese de DNA, a proliferação e resulta no aumento da taxa de apoptose em células provenientes de vários tipos de tumor (Schluter *et al.*, 1993; Kausch *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008). Em conjunto com as circunstâncias de seu descobrimento, estes dados indicam que possui um papel importante na progressão e controle do ciclo celular (Endl e Gerdes, 2000; Scholzen e Gerdes, 2000).

Nos LNH, há estudos que sugerem que uma grande fração de células em proliferação resulta em uma pior resposta ao tratamento (Miller *et al.*, 1994). No entanto, outros estudos obtiveram um resultado oposto, sugerindo que uma grande fração de células em proliferação resulta em um melhor prognóstico (Wilson *et al.*, 1997). Além disso, neste estudo, uma baixa fração de células proliferando foi associado a uma alta expressão de Bcl-2, embora a expressão de Bcl-2 não tenha tido impacto no prognóstico.

Consistente com o primeiro caso dentre os LNH, nos linfomas foliculares, frações de células em proliferação (índice de proliferação) maiores do que 40% foram associadas a uma menor sobrevida (Martin *et al.*, 1995). Já nos linfomas de Burkitt, o índice de proliferação observado na quase totalidade dos casos é próximo a 100% e é utilizado como uma ferramenta para diferenciá-los dos LDGCB, nos quais o índice de proliferação observado na maioria dos casos é próximo ao dos linfomas foliculares (Jaffe *et al.*, 2001; Rosenwald e Ott, 2008).

No tocante à resposta ao tratamento, alguns estudos apontaram para um valor prognóstico negativo de altos índices de proliferação (Grogan *et al.*, 1988), enquanto outros observaram o oposto, como no caso dos LNH (Jerkeman *et al.*, 2004). No entanto, há poucos estudos correlacionando a expressão da proteína utilizada como indicadora de proliferação, ki-67, com a expressão de outras proteínas associadas à falha do tratamento e seu impacto no prognóstico dos LDGCB. Além disso, não há dados sobre o valor prognóstico da expressão de ki-67 especificamente nos LDGCB centrolásticos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o impacto prognóstico da expressão e da localização subcelular de proteínas envolvidas na resistência a apoptose em LDGCB centroblasticos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência de expressão das proteínas XIAP e survivina nas células de LDGCB;
- Determinar a localização subcelular de XIAP e survivina nos LDGCB;
- Verificar o padrão de co-expressão das proteínas XIAP, survivina, p53, Bcl-2 e ki-67 nos LDGCB;
- Correlacionar a expressão das proteínas XIAP, survivina, p53, Bcl-2 e ki-67, bem como a localização subcelular de XIAP e de survivina, com dados de resposta ao tratamento dos pacientes com LDGCB centroblasticos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRAS DE PACIENTES

As amostras dos pacientes (lâminas de blocos de parafina de exame histopatológico) foram obtidas através de parceria científica entre a Divisão de Anatomia Patológica e o Laboratório de Hematologia Celular e Molecular (LHCM). Todas as lâminas foram revistas por um médico patologista para confirmação do diagnóstico (feito com base nos critérios definidos pela classificação da Organização Mundial da Saúde (Jaffe *et al.*, 2001)). Os prontuários, de um total de 148 pacientes com LDGCB registrados no Serviço de Hematologia do INCA entre 1980 e 1996, foram revistos para coleta de informações demográficas e clínicas. Destes, 76 preencheram os critérios de inclusão para participação no estudo (idade superior a 18 anos e disponibilidade de dados de acompanhamento clínico, incluindo resposta terapêutica). Os dados demográficos (gênero, etnia e idade), as características clínicas na apresentação inicial da doença (subtipo morfológico, local de acometimento, estadiamento de Ann Arbor e IPI), a evolução e a resposta ao tratamento (sobrevida livre de progressão – SLP – e SG) foram obtidos por médicos dos Serviços de Oncologia e de Hematologia do Hospital do Câncer I (HCI), através da análise dos prontuários arquivados no arquivo médico do HCI.

#### 3.2 AVALIAÇÃO DOS DADOS CLÍNICOS

Foram determinados o estadiamento de Ann Arbor e o IPI. Os índices determinados pelo IPI foram discriminados em baixo risco (agrupando os pacientes com risco baixo e baixo-intermediário) e alto risco (agrupando os pacientes com risco alto-intermediário e alto).



Para avaliação de cada fator na resposta ao tratamento, foram adotados os parâmetros SLP e SG. A SLP foi determinada avaliando-se o período compreendido entre a resposta inicial ao tratamento até a recaída, progressão da doença ou conclusão do estudo. A SG foi determinada avaliando-se o período de tempo entre o diagnóstico até o último evento (óbito, perda de acompanhamento ou conclusão do estudo).

### 3.3 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DAS IAPS

Cortes histológicos (na espessura de três  $\mu\text{m}$ ) provenientes de material tumoral embocado em parafina e aderidos a lâminas foram utilizados para realização da detecção imunohistoquímica da expressão das IAPs survivina e XIAP, além de p53, Bcl-2 e Ki-67 (previamente realizados). Esta técnica foi adaptada do protocolo do serviço rotineiro de diagnóstico da DIPAT e foi padronizada no LHCM. Seu processo consistiu das seguintes etapas: desparafinização e reidratação, recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena, bloqueio de ligações inespecíficas, incubação com anticorpo primário, detecção da marcação, revelação com cromógeno, contracoloração com Hematoxilina de Harris e montagem das lâminas.

As amostras de tumor foram desparafinizadas através de imersão em banhos de xileno P.A. (pureza mínima 99% - Vetec<sup>®</sup>) (um de 5 minutos e mais dois de 10 minutos cada) e reidratadas através de imersão em banhos de etanol P.A. (pureza mínima 99,8% - Merck<sup>®</sup>) (quatro banhos, cada um com um minuto de duração), seguida de lavagem em água corrente por 5 minutos. Em seqüência, as amostras foram submetidas à recuperação antigênica em Tampão Citrato de Sódio 10 mM pH 6,0 por 30 minutos a 98 °C em *steamer* (Arno<sup>®</sup>) (survivina, XIAP e Bcl-2) ou em panela de pressão por 2 minutos cronometrados após o início da pressurização (p53 e ki-67). Após a recuperação antigênica, as amostras foram resfriadas

por 10 minutos a temperatura ambiente ainda imersas no tampão e depois lavadas por 5 minutos em água corrente. Após este processo, as amostras foram lavadas em Tampão Tris Salino (TBS) (0,05M Tris Base, 0,9% NaCl) pH 7.6 três vezes por 5 minutos. Para maximizar e homogeneizar o contato dos reagentes com as amostras, o contorno dos tecidos foi marcado com uma caneta cuja tinta hidrofóbica (PapPen – Dako®) delimita a área de aplicação e localização dos reagentes utilizados na técnica. Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena através da incubação das amostras com peróxido de hidrogênio 3% por 20 minutos. Após este processo, as amostras foram banhadas em água destilada e lavadas em TBS pH 7.6 três vezes por 5 minutos. Logo após, foi realizado um bloqueio para prevenir ligações inespecíficas através da incubação das amostras com uma solução de bloqueio contendo leite em pó desnatado a 2%, albumina sérica bovina fração V (BSA) a 2,5% e soro fetal bovino a 8% por 30 minutos. A seguir, removido o excesso da solução de bloqueio, as amostras foram incubadas com anticorpo primário anti-survivina 1:800 (S8191 – Sigma®), anti-XIAP 2,5 ng/μL (1:400) (X4503 – Sigma®), anti-p53 1:200 (clone DO7 – Dako®), anti-Bcl-2 1:100 (clone 124 Dako®) ou anti-ki-67 1:50 (MIB-1) a 4 °C *overnight*. Os anticorpos primários foram diluídos em uma solução contendo azida sódica a 0,18%, BSA a 0,1% em TBS. No controle negativo, apenas a solução diluente dos anticorpos foi aplicada no material.

Após a incubação com o anticorpo primário, as amostras foram banhadas em água destilada e lavadas em TBS pH 7.6 três vezes por 5 minutos. Em seguida, foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado a biotina (LSAB2<sup>+</sup> - Dako®) por 30 minutos, banhadas em água destilada e lavadas em TBS pH 7.6 três vezes por 5 minutos. Depois foram incubadas com o ligante de biotina, streptavidina, conjugada a uma peroxidase (HRP) por mais 30 minutos, banhadas em água destilada e lavadas em TBS pH 7.6 três vezes por 5 minutos. Em seqüência, para visualização da marcação, as amostras foram incubadas com o cromógeno tetracloro 3,3 diaminobenzidina (DAB) (substrato da HRP, convertido por ela em

um metabólito acastanhado) a 10 µL por mL de tampão diluente (1:100) por no máximo 2 minutos e lavadas em água corrente por 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram incubadas em Hematoxilina de Harris (HH) por 20 segundos para uma discreta contracoloração e lavadas em água corrente por mais 5 minutos. Por fim, as amostras foram desidratadas através de imersão em quatro banhos de etanol P.A. seguidos por quatro banhos de xileno P.A. por um minuto cada e à cada lâminas foi aderida uma lamínula com bálsamo de Damar, permitindo visualização em microscópio.

A quantificação da marcação foi feita por análise de 10-20 campos com aumento de 40 vezes em microscópio óptico. Inicialmente, foram considerados negativos os casos que não apresentaram marcação ou com percentual de células tumorais positivas inferior a 5% e positivos os que apresentaram marcação superior a 5%. Posteriormente, foram considerados pontos de corte alternativos para positividade para XIAP (20%) e Ki-67 (>20 e >60%). Além disso, foram definidas gradações com relação à intensidade da marcação acastanhada produzida pela metabolização do DAB: fracamente positivos (+), moderadamente positivos (++) ou intensamente positivos (+++). A análise foi realizada por um médico patologista sem conhecimento das características clínicas e demográficas dos pacientes. As fotografias foram feitas em um microscópio Nikon Eclipse E200 ligado a um sistema de digitalização *Digital Sight* conectado a um computador e as imagens foram captadas no programa NIS-Elements F 2.30.

### 3.4 OBTENÇÃO DE DADOS LABORATORIAIS DE ESTUDO ANTERIOR

A expressão de p53, Bcl-2 e ki-67 foi analisada através da revisão de lâminas com cortes histológicos do material tumoral aderidos submetidas à imunohistoquímica para

detecção dessas proteínas. O estudo realizado anteriormente incluiu o presente grupo de pacientes com LDGCB em uma série de pacientes com LNH (Maia *et al.*, 1998).

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações entre os grupos para cada característica demográfica e clínica foram realizadas através do teste de chi-quadrado. As curvas de sobrevida (SLP e SG) para os grupos de características demográficas, clínicas e de expressão das proteínas em estudo foram desenvolvidas pelo método de Kaplan-Meier. A comparação entre as curvas para cada característica foi realizada através de análise univariada com o teste de Log-rank. A análise multivariada para identificar os fatores prognósticos independentes foi realizada pelo modelo de riscos proporcionais de Cox. Utilizando-se um intervalo de confiança de 95%, as diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas no programa SPSS 17.0.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 DADOS CLÍNICOS, DEMOGRÁFICOS E DE RESPOSTA AO TRATAMENTO DOS PACIENTES COM LDGCB

Um total de 76 casos de LDGCB foi selecionado para o estudo. Com relação aos dados clínicos, 69 de 76 pacientes foram classificados como subtipo Centroblástico, 5 como Imunoblástico e em 2 casos não foi possível estabelecer a classificação morfológica ( $p < 0,001$ ). Quanto ao local de acometimento, em 42 casos o linfoma era nodal, em 14 era extranodal e em 20 havia comprometimento de múltiplos sítios ( $p < 0,001$ ). Para a variável estadiamento, foram observados 23/76 casos no estágio I, 23/76 no estágio II, 15/76 no estágio III e 15/76 no estágio IV. Embora tenha ocorrido maior frequência de pacientes com estágios mais disseminados da doença, não houve diferença significativa entre a frequência dos diferentes estágios de LDGCB ao diagnóstico ( $p = 0,338$ ). Com relação ao nível de LDH, houve maior frequência de pacientes com LDH até o limite máximo do nível normal (480 UI/L), denominada LDH normal (52/75), do que pacientes com LDH acima do nível normal, denominada LDH aumentada (23/75) ( $p = 0,001$ ). O IPI foi discriminado em alto (39/76) e baixo (37/76) e ambos apresentaram frequências semelhantes ( $p = 0,908$ ).

Com relação aos dados demográficos, a frequência dos gêneros foi de 47/76 para o masculino e 29/76 para o feminino. A maior prevalência do gênero masculino foi significativa ( $p = 0,047$ ). A frequência das etnias foi significativamente diferente com 54/80 de brancos e 22/80 de não-brancos ( $p < 0,001$ ). Com relação à idade, foram determinadas as categorias (1) pacientes com até 40 anos (11/76), (2) pacientes com 41 a 60 anos (34/76) e (3) pacientes com mais 60 anos (31/76). A menor frequência de pacientes com até 40 anos foi significativa

( $p=0,002$ ). A Tabela 1 mostra as frequências observadas dos dados clínicos e demográficos na série de LDGCB analisada.

Tabela 1: Frequência dos dados clínicos e demográficos avaliados na série de 76 casos de LDGCB em estudo.

	Número de Pacientes	<i>p.</i>
Subtipo morfológico:		
Centroblástico	69	
Imunoblástico	5	<b>&lt;0,001</b>
Não-classificados	2	
Local de acometimento*:		
Nodal	42	
Extranodal	14	<b>&lt;0,001</b>
Múltiplos sítios	20	
Estadiamento:		
Estágio I	23	
Estágio II	23	
Estágio III	15	0,338
Estágio IV	15	
LDH		
Normal	52	
Aumentada	23	<b>0,001</b>
IPI:		
Baixo	39	
Alto	37	0,908
Gênero:		
Feminino	29	
Masculino	47	<b>0,047</b>
Etnia:		
Branco	54	
Não-Branco	22	<b>&lt;0,001</b>
Idade:		
Até 40 anos	11	
41 a 60 anos	34	<b>0,002</b>
Acima de 60 anos	31	

\*na ocasião do diagnóstico; IPI= índice prognóstico internacional; a diferença foi considerada significativa quando  $p<0,05$ .

Com relação à resposta ao tratamento, os pacientes foram estratificados em grupos de acordo com o subtipo de LDGCB e o protocolo de tratamento ao qual foram submetidos. O tempo mediano de acompanhamento clínico (SG) dos 76 pacientes com LDGCB estudados foi de 23 meses (1-95). A mediana de SLP foi de 10,5 meses (0-95). A probabilidade de SLP em oito anos foi de 22,6% (EP=6,8%) e a de SG foi de 19,1% (EP=10,3%) (Figura 2 e Tabela 2).

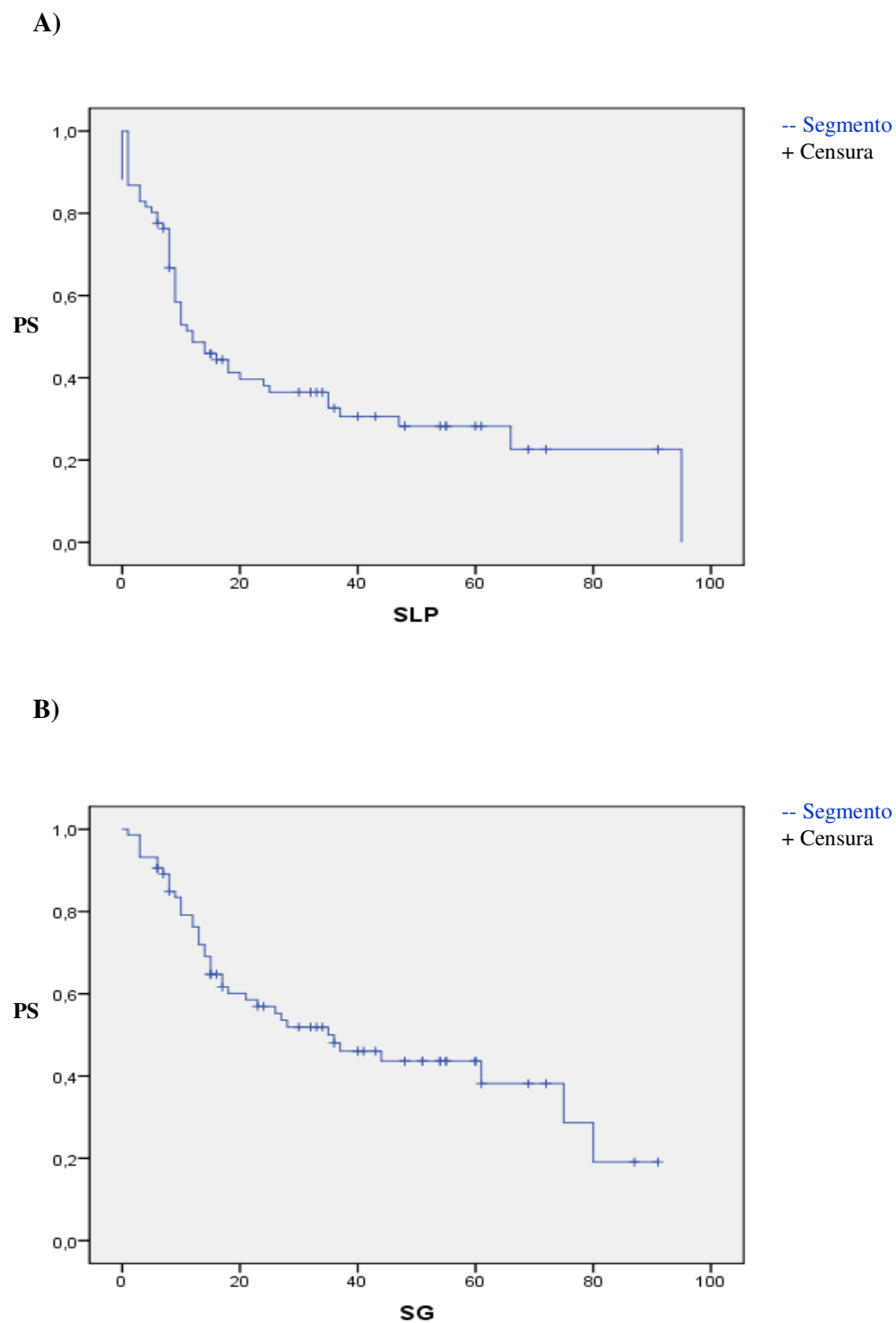


Tabela 2: Acompanhamento clínico e resposta ao tratamento dos diferentes grupos de LDGCB analisados.

Série	n	Mediana* (Intervalo)	SLP (%)	EP (%)	**p.=	Mediana* (Intervalo)	SG (%)	EP (%)	**p.=
Pacientes com LDGCB arrolados no estudo	76	10,5 (0-95)	22,6	6,8		23 (1-95)	19,1	10,3	
Pacientes com LDGCB tratados com CHOP	65	10,5 (0-91)	25,5	9,1		23 (1-91)	22,0	11,8	
Pacientes com LDGCB centroblastico tratados com CHOP	58	10,5 (0-91)	24,5	8,9		24,5 (3-91)	22,3	12,0	
Pacientes com LDGCB imunoblastico tratados com CHOP	5	9 (0-30)	20,0	17,9	0,253	23 (10-30)	20,0	17,9	0,066

n: número de casos da amostra; SLP: Sobrevida livre de progressão da doença; SG: Sobrevida global; EP: Erro padrão. \*tempo em meses. \*\*a diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

Excluindo dos 76 casos analisados os 11 que foram tratados com protocolos alternativos ao CHOP, obteve-se a resposta específica a este protocolo de tratamento. Assim, o tempo mediano de acompanhamento clínico (SG) dos 65 pacientes com LDGCB tratados com o protocolo CHOP foi de 23 meses (1-91). A mediana de SLP foi de 10,5 meses (0-91). A probabilidade de SLP em oito anos foi de 25,5% (EP=9,1%) e a de SG foi de 22,0% (EP=11,8%) (Tabela 2).

Estratificando os pacientes de acordo com o subtipo de LDGCB, dos 65 casos tratados com CHOP, dois casos em que não foi possível determinar o subtipo foram excluídos. Dos demais 63, 58 eram do subtipo centroblastico e cinco eram do subtipo imunoblastico. O tempo mediano de acompanhamento clínico (SG) dos 58 pacientes com LDGCB centroblastico tratados com CHOP foi de 24,5 meses (3-91). A mediana de SLP foi de 10,5 meses (0-91). A probabilidade de SLP em oito anos foi de 24,5% (EP=8,9%) e a de SG foi de 22,3% (EP=12%) (Tabela 2).

Para os cinco pacientes com LDGCB imunoblastico tratados com CHOP, o tempo mediano de acompanhamento clínico (SG) foi de 23 meses (10, 14, 23, 24 e 30 meses). A probabilidade de SLP foi de 20,0% (EP=17,9%) e a de SG foi de 20,0% (EP=17,9%) em um segmento de 30 meses. Embora a diferença entre a resposta ao tratamento dos subtipos de



LDGCB não tenha apresentado significância estatística com relação à SLP ( $p=0,253$ ) (Figura 3a), houve uma tendência no tocante a SG ( $p=0,066$ ) de que o subtipo centroblastico tivesse uma resposta melhor do que o imunoblástico (Figura 3b e Tabela 2).

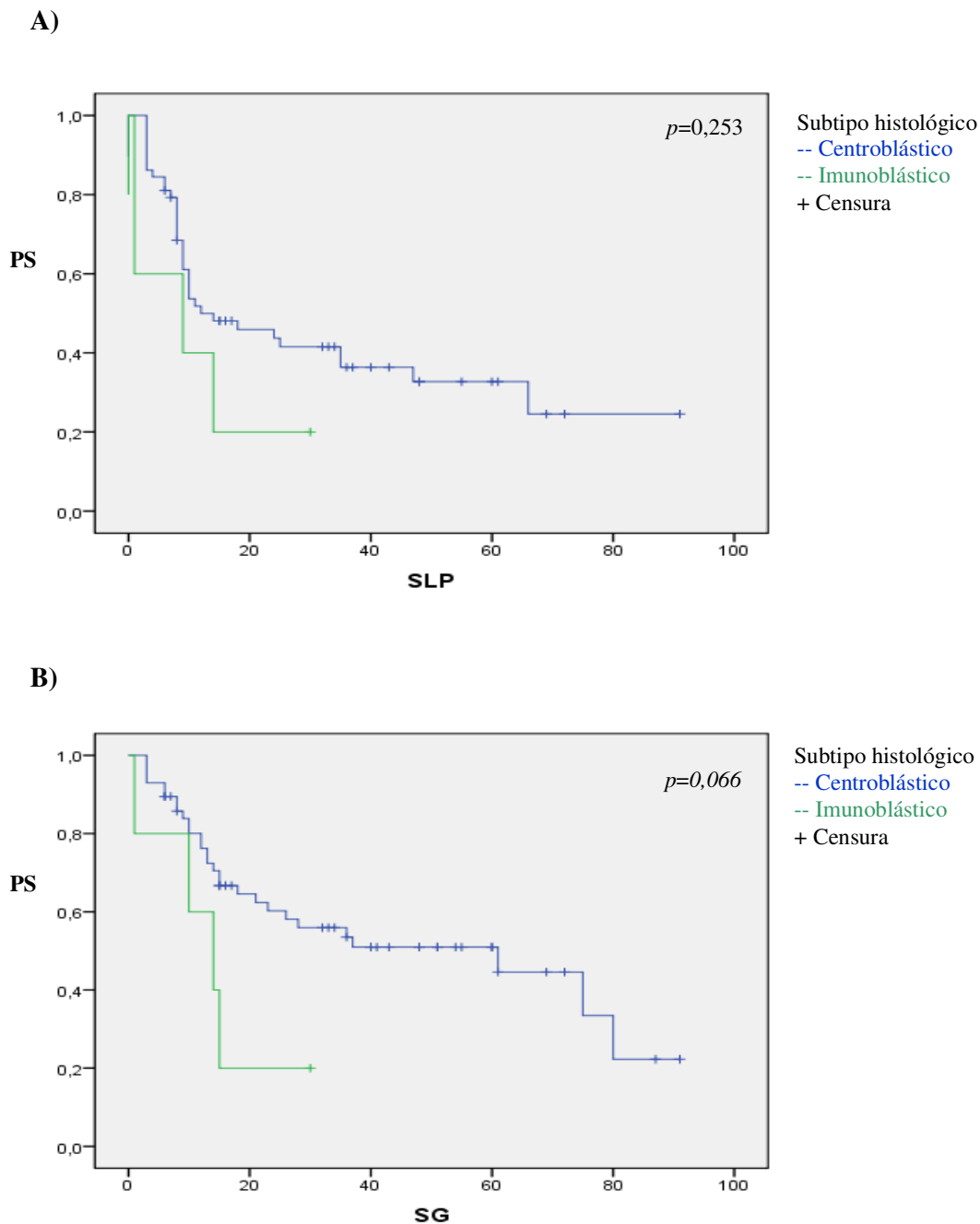


Figura 10: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 63 pacientes com LDGCB com relação aos subtipos histológicos centroblastico versus imunoblástico. PS: Probabilidade de sobrevida. A censura para SLP foi a recaída e para a SG foi o óbito. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

Em seguida, foi analisado o impacto das características clínicas e demográficas na SLP e na SG dos 58 pacientes com LDGCB centroblástico tratados com CHOP. Isoladamente, o estadiamento de Ann Arbor (SLP:  $p=0,317$ ; SG:  $p=0,722$ ) (Figura 4), o gênero (SLP:  $p=0,552$ ; SG:  $p=0,891$ ) (Figura 5) e a etnia (SLP:  $p=0,855$ ; SG:  $p=0,793$ ) (Figura 6) não tiveram impacto na resposta ao tratamento dos LDGCB analisados (Tabela 3).

Tabela 3: Impacto das características clínicas e demográficas na SLP e na SG dos 58 pacientes com LDGCB centroblástico tratados com CHOP.

	n	SLP (%)	EP (%)	* $p$ .=	SG (%)	EP (%)	* $p$ .=
Estadiamento:							
Estágio I	14	26,1	14,2		58,2	15,0	
Estágio II	21	42,1	11,5	0,327	51,6	11,7	0,722
Estágio III	11	0	14,2		0	15,0	
Estágio IV	11	0	11,7		0	17,3	
LDH:							
Normal	41	38,0	8,2		53,1	8,7	
Aumentada	17	0	11,9	0,187	0	13,4	0,078
Idade:							
Até 40 anos	8	37,5	17,1		50,0	17,7	
41 a 60 anos	27	42,3	14,3	<b>0,020</b>	31,9	23,2	0,070
Acima de 60 anos	22	6,3	6,1		0	14,3	
Idade:							
Até 60 anos	34	40,2	17,5		39	13	
Acima de 60 anos	22	6,3	6,1	<b>0,029</b>	0	14,3	<b>0,016</b>
Gênero:							
Masculino	32	15,4	11,7		0	19,3	
Feminino	24	36,9	12,1	0,552	40,2	13,0	0,891
Etnia:							
Branco	41	29,9	8,8		21,7	16,3	
Não-brancos	16	20,5	15,8	0,855	26,9	20,1	0,793
IPI							
Baixo	30	42,5	10,1		63,2	10,0	
Alto	27	0	9,4	0,064	0	11,0	<b>0,006</b>

n: número de casos da amostra; SLP: Sobrevida livre de progressão da doença; SG: Sobrevida global; EP: Erro padrão. LDH: desidrogenase láctica; IPI: índice de prognóstico internacional. \*a diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

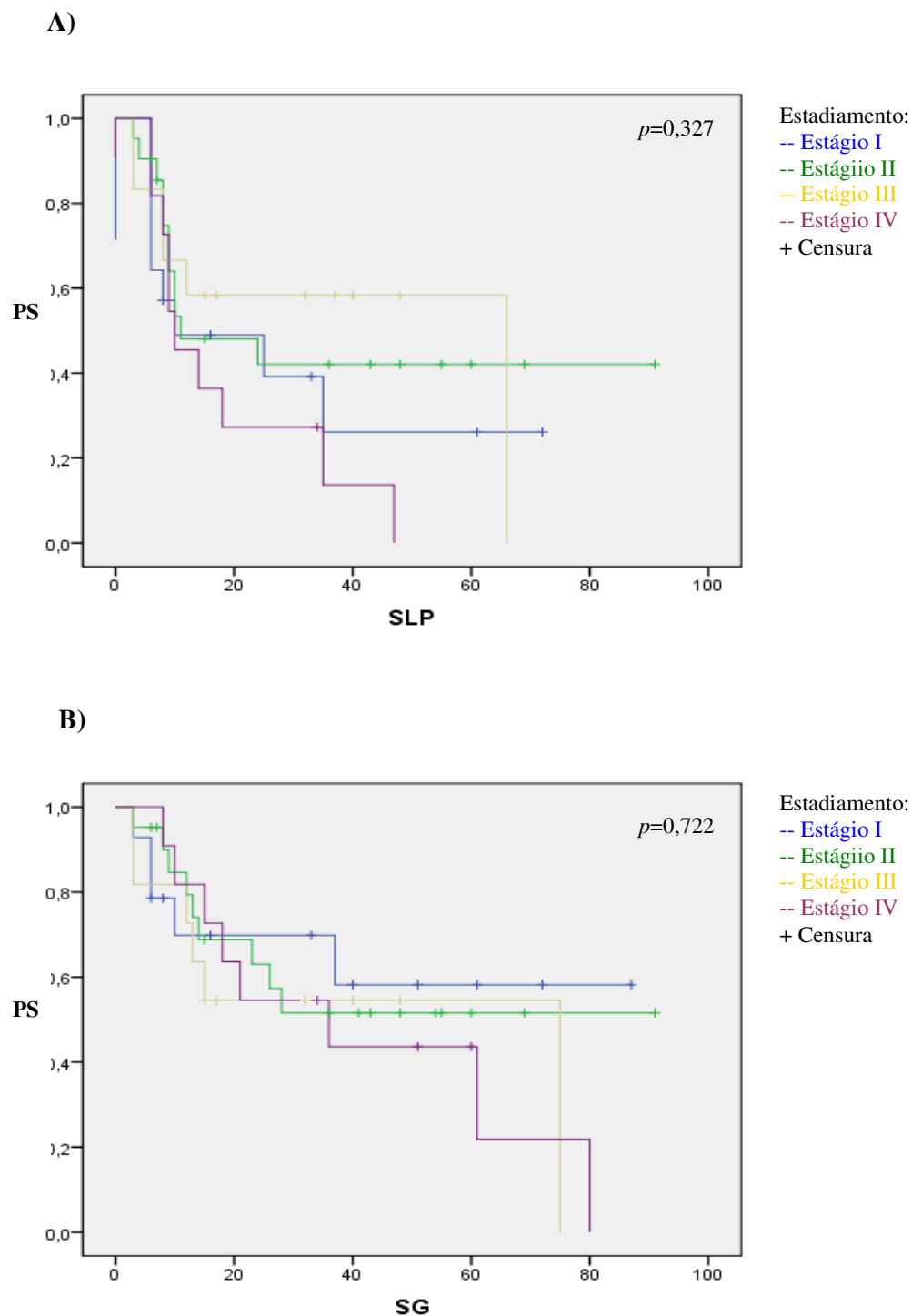


Figura 11: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centrolástico tratados com CHOP com relação ao estadiamento. PS: Probabilidade de sobrevida. A censura para SLP foi a recaída e para a SG foi o óbito. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

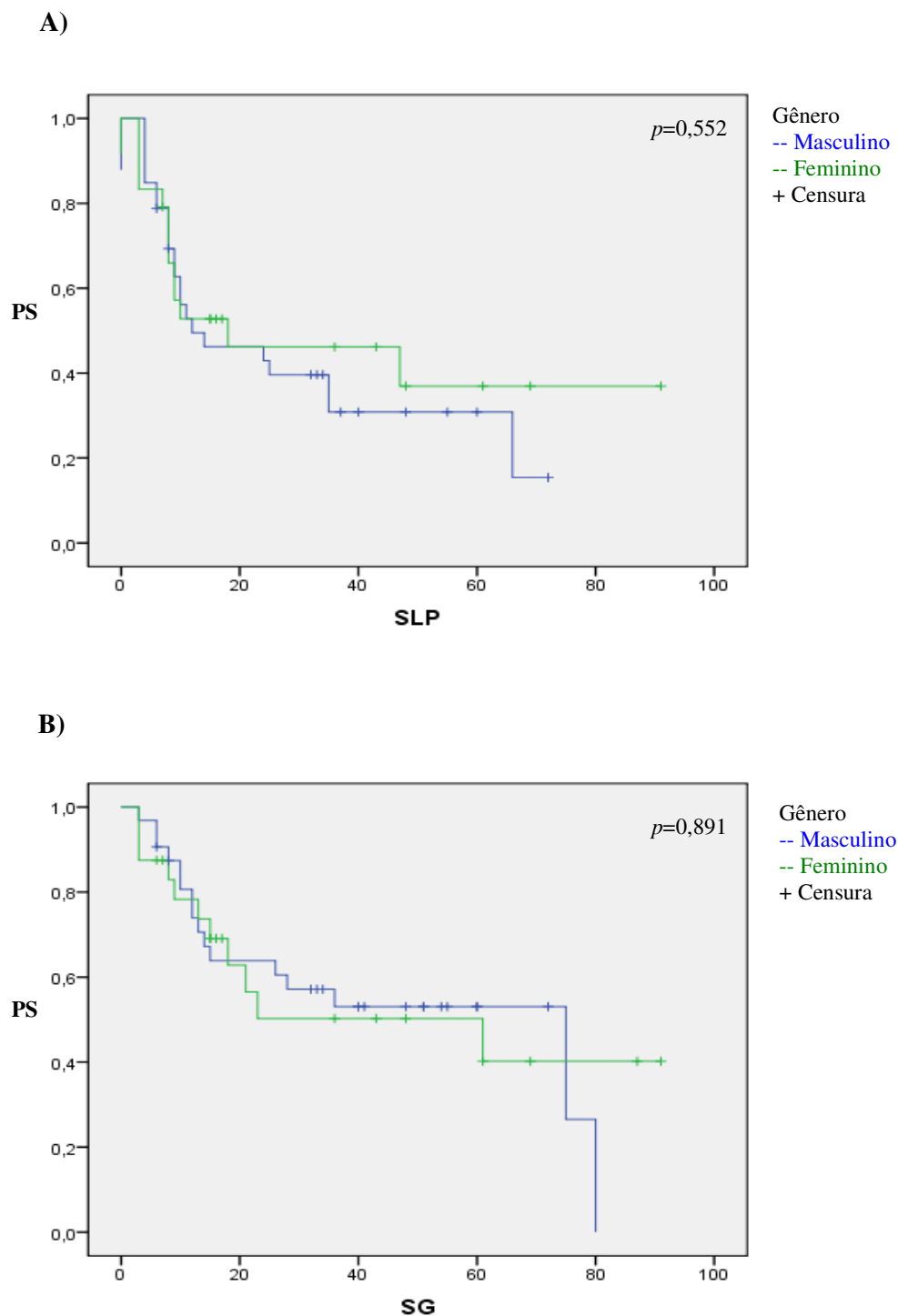


Figura 12: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centroblastico tratados com CHOP com relação ao gênero. PS: Probabilidade de sobrevida. A censura para SLP foi a recaída e para a SG foi o óbito. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

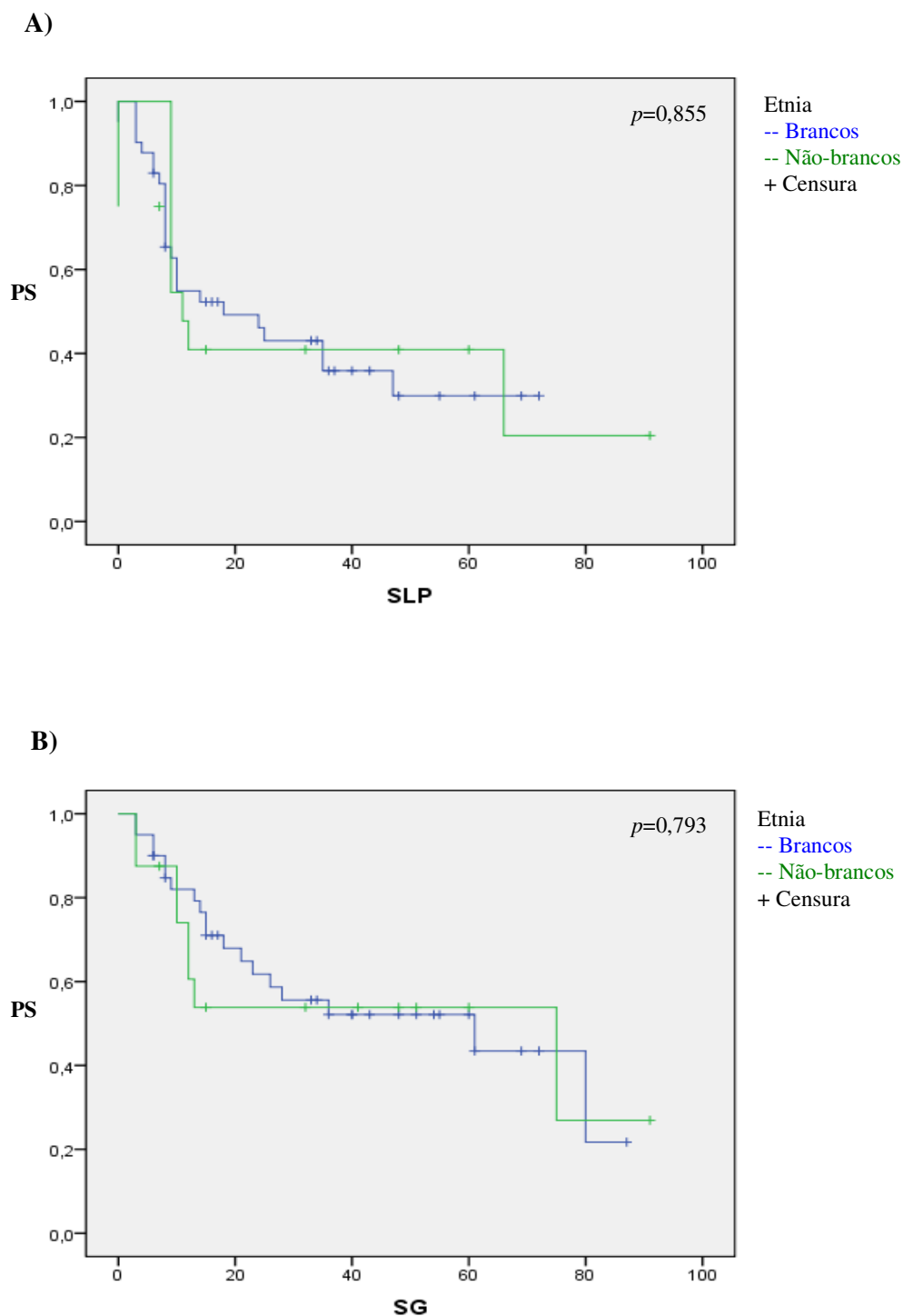
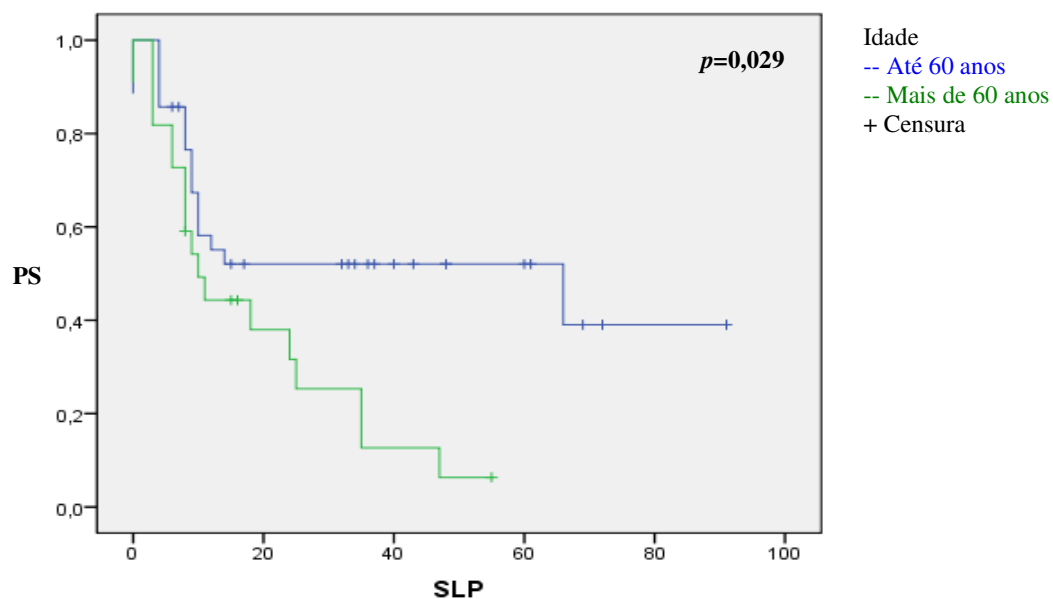


Figura 13: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centrolástico tratados com CHOP com relação à etnia. PS: Probabilidade de sobrevida. A censura para SLP foi a recaída e para a SG foi o óbito. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

Posteriormente, quando os pacientes foram estratificados em dois grupos com relação à idade, os pacientes acima de 60 anos apresentaram uma pior resposta ao tratamento (SLP: 6,3% EP=6,1% e SG: 0% EP= 14,3%) do que os com menos de 60 anos (SLP: 40,2% EP=17,5%  $p=0,029$  e SG: 39,0% EP=13,0%  $p=0,016$ ) (Tabela 3 e Figura 7). No entanto, quando separado o grupo com menos de 60 anos em pacientes com até 40 anos e pacientes entre 40 e 60 anos, a SLP dos dois grupos (SLP: 37,5 EP=17,1% e SLP: 42,3% EP=14,3%, respectivamente) se manteve significativamente discrepante do grupo com mais de 60 anos (SLP: 6,3% EP=6,1%  $p=0,020$ ) (Figura 8a), mas o impacto da idade na SG passou a aparecer apenas na forma de uma tendência ( $p=0,070$ ) (Tabela 3 e Figura 8b).

Já o nível de LDH não teve impacto na SLP (LDH normal: 38,0% EP=8,2%; LDH aumentada: 0% EP=11,9%;  $p=0,187$ ), mas houve uma tendência aos pacientes com nível normal obterem uma melhor SG do que os pacientes com LDH acima do normal (LDH normal: 51,3% EP=8,7%; LDH aumentada: 0% EP=13,4%;  $p=0,078$ ) (Tabela 3 e Figura 9). Com relação ao IPI, os pacientes com IPI baixo apresentaram melhor SG (IPI baixo: 63,2% EP=10,0%; IPI alto: 0% EP=11,0%;  $p=0,006$ ) e uma tendência a melhor SLP do que os pacientes com IPI alto (IPI baixo: 42,5% EP=10,1%; IPI alto: 0% EP=9,4%;  $p=0,064$ ) (Tabela 3 e Figura 10).

A)



B)

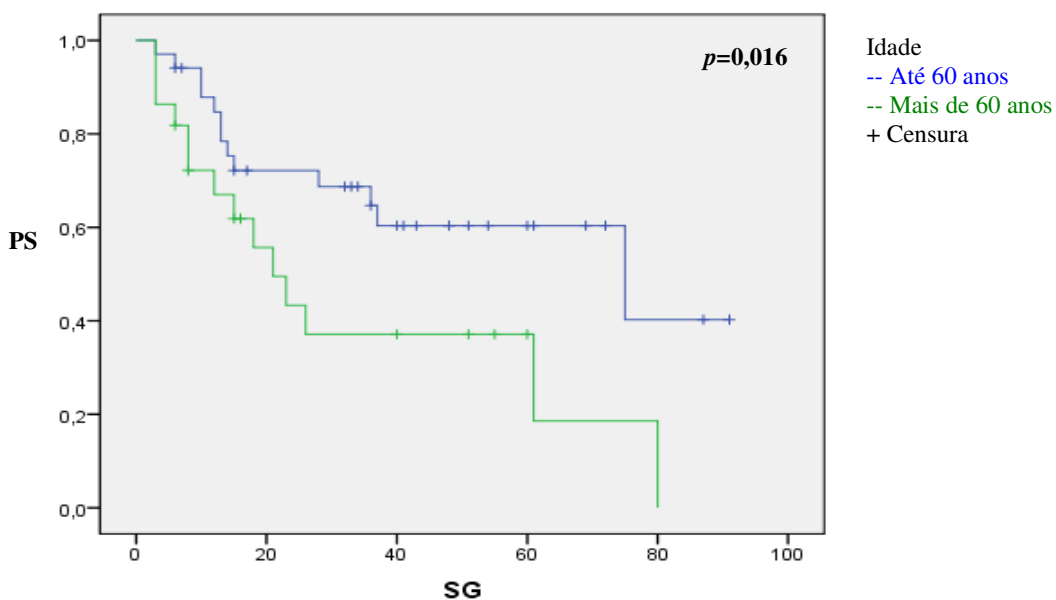
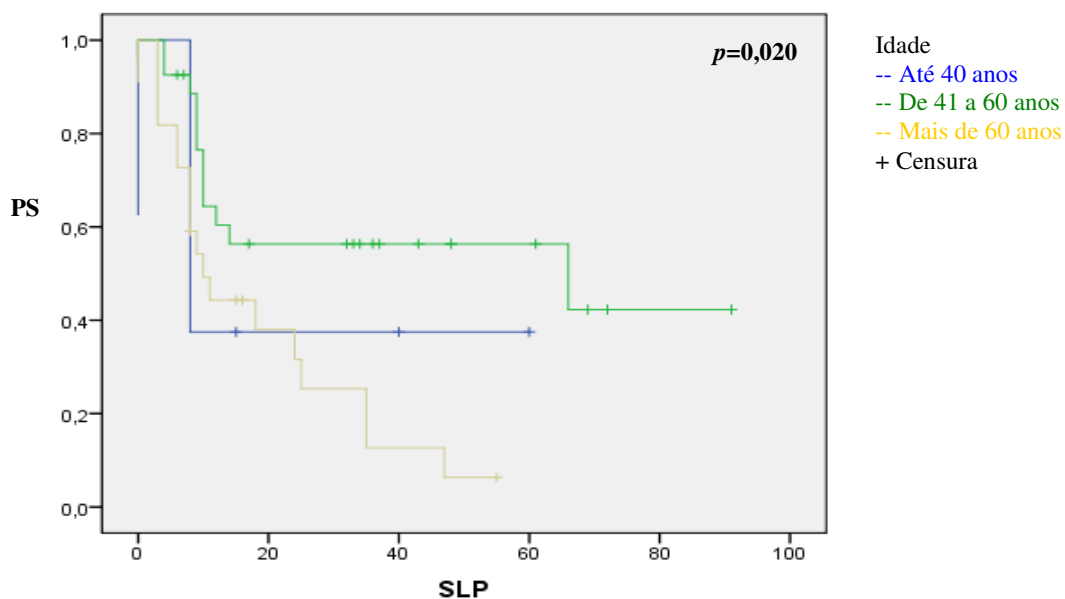


Figura 14: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centrolástico tratados com CHOP com relação à idade estratificando-se em dois grupos. PS: Probabilidade de sobrevida. A censura para SLP foi a recaída e para a SG foi o óbito. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

A)



B)

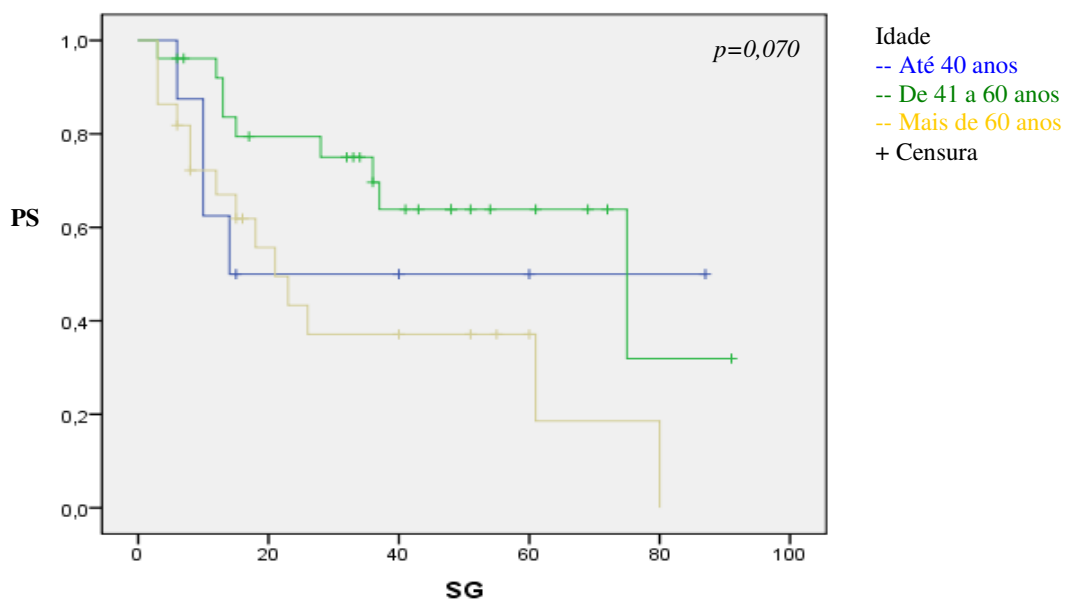
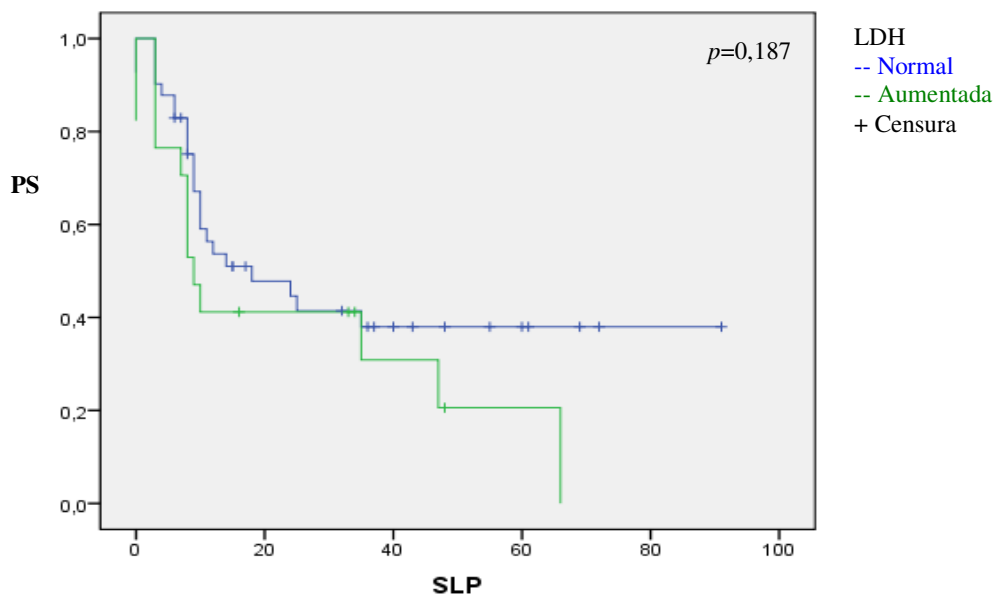


Figura 15: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centrolástico tratados com CHOP com relação à idade estratificando-se em três grupos. PS: Probabilidade de sobrevida. A censura para SLP foi a recaída e para a SG foi o óbito. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .



A)



B)

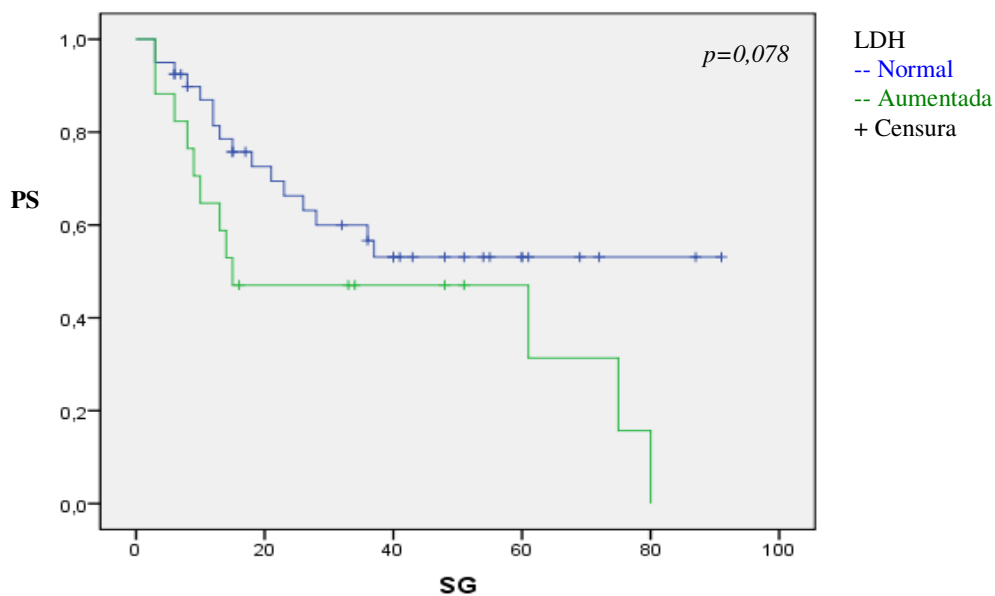
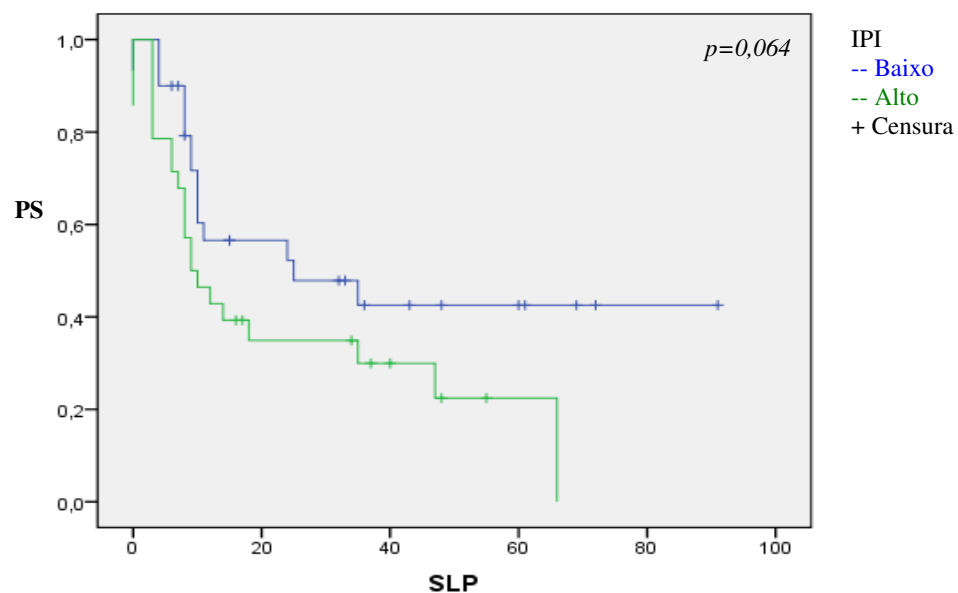


Figura 16: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centrolástico tratados com CHOP com relação ao nível de LDH. PS: Probabilidade de sobrevida. A censura para SLP foi a recaída e para a SG foi o óbito. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

A)



B)

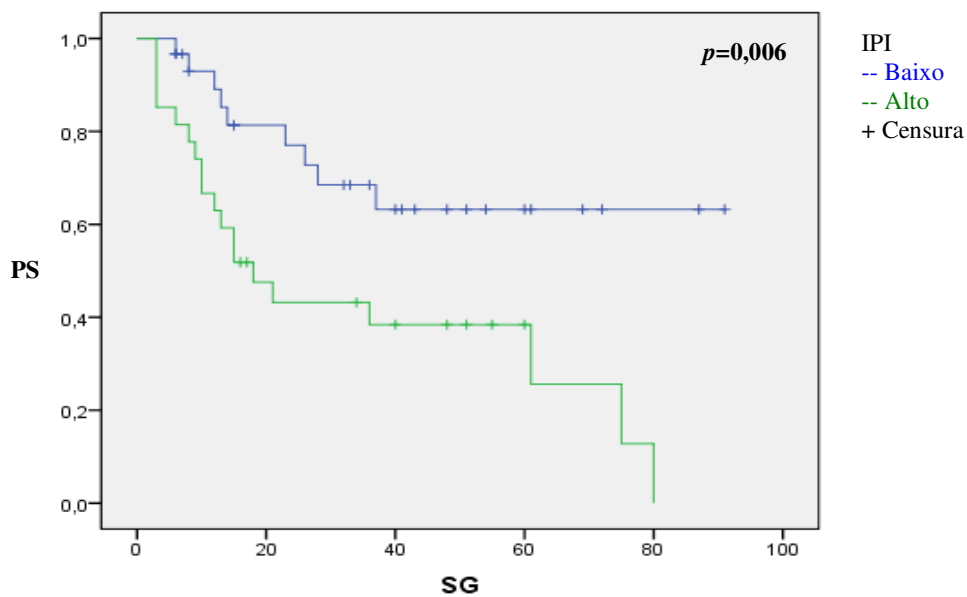


Figura 17: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centrolástico tratados com CHOP com relação ao IPI. PS: Probabilidade de sobrevida. A censura para SLP foi a recaída e para a SG foi o óbito. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

Por outro lado, na análise multivariada, a idade e o nível de LDH perderam o valor prognóstico apresentado quando os fatores foram analisados isoladamente ( $p=0,668$  e  $p=0,684$ ) e apenas o IPI teve impacto independente na SG dos 58 pacientes com LDGCB centrolástico analisados ( $p=0,014$ ) (Tabela 4).

Tabela 4: Análise multivariada pelo modelo de regressão de Cox do impacto dos fatores clínicos e demográficos na sobrevida livre de progressão e da sobrevida global dos 58 pacientes com LDGCB centrolástico analisados.

	Referência	Sobrevida Livre de Progressão			Sobrevida Global		
		RR	IC 95%	* $p=$	RR	IC 95%	* $p=$
Gênero:	Masculino						
	Feminino	0,853	0,414 - 1,755	0,665	1,123	0,482 - 2,619	0,787
Etnia	Branco						
	Não-brancos	0,530	0,216 - 1,298	0,165	0,664	0,247 - 1,784	0,417
Idade		1,010	0,981 - 1,040	0,498	1,007	0,973 - 1,042	0,688
Estadiamento	Estágio 1						
	Estágio 2	0,579	0,206 - 1,622	0,298	1,383	0,373 - 5,129	0,627
	Estágio 3	0,291	0,077 - 1,097	0,068	0,563	0,133 - 2,391	0,437
	Estágio 4	0,664	0,201 - 2,187	0,500	0,494	0,124 - 1,971	0,318
IPI	Baixo						
	Alto	0,401	0,132 - 1,221	0,108	0,185	0,048 - 0,715	<b>0,014</b>
LDH	Normal						
	Aumentada	0,946	0,392 - 2,285	0,902	1,232	0,451 - 3,362	0,684

RR: Risco relativo; IC: Intervalo de confiança; LDH: desidrogenase láctica; IPI: índice de prognóstico internacional. \*a diferença foi considerada significativa quando  $p<0,05$ .

#### 4.2 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS XIAP, SURVIVINA, P53, BCL-2 E KI-67 NAS CÉLULAS DE LDGCB

Os cortes histológicos com amostras do tumor foram analisados, para a expressão das proteínas XIAP, survivina, p53, Bcl-2 e ki-67 nas células tumorais. A expressão de todas as proteínas analisadas variou de completamente ausente a presente em quase todas das células tumorais. Com relação à intensidade da marcação, houve alguma variação entre os casos positivos para cada proteína (+ ou +++), mas, de modo geral, apresentou-se homogênea (++) . Para as análises iniciais, foram considerados positivos os casos em que mais de 5% das

células tumorais apresentaram expressão da proteína analisada. Em quatro casos, não foi possível determinar a expressão de p53 e Bcl-2 e em oito casos não foi possível determinar a expressão de ki-67. As freqüências de positividade para cada proteína foram: 31,6% dos casos para XIAP, 21% para survivina, 20,8% para p53, 12,5% para Bcl-2 e 58,8% para ki-67. Os resultados observados para cada proteína estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Distribuição dos 76 casos de LDGCB com relação à expressão das proteínas analisadas.

Proteína	Casos Positivos*	Casos Negativos	Casos Indeterminados	Freqüência de positividade
XIAP	24	52	0	31,6%
Survivina	16	60	0	21%
p53	15	57	4**	20,8%
Bcl-2	9	63	4**	12,5%
Ki-67	40	68	8**	58,8%

\*Foram considerados positivos os casos em que a expressão de determinada proteína foi detectada em mais de 5% das células tumorais. \*\*Em quatro casos, não foi possível avaliar a expressão de p53 e Bcl-2 e em oito, a de ki-67.

As freqüências de positividade de XIAP, survivina, p53, Bcl-2 e ki-67 também foram determinadas nos 58 casos de LDGCB centrolblásticos tratados com CHOP. As freqüências observadas foram de 32,8% dos casos para XIAP, 24,1% para survivina, 19,3% para p53, 12,3% para Bcl-2 e 63,6% para ki-67 (Tabela 6), de maneira semelhante às freqüências observadas na série de LDGCB completa (76 casos) (Tabela 5).

Tabela 6: Distribuição dos 58 casos de LDGCB centrolblástico tratados com CHOP com relação à expressão das proteínas analisadas.

Proteína	Casos Positivos*	Casos Negativos	Casos Indeterminados	Freqüência de positividade
XIAP	19	39	0	32,8%
Survivina	14	44	0	24,1%
p53	11	46	1**	19,3%
Bcl-2	7	50	1**	12,3%
Ki-67	35	20	3**	63,6%

\*Foram considerados positivos os casos em que a expressão de determinada proteína foi detectada em mais de 5% das células tumorais. \*\*Em um caso, não foi possível avaliar a expressão de p53 e Bcl-2 e em três, a de ki-67.

### 4.3 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DAS PROTEÍNAS XIAP E SURVIVINA NOS LDGCB

No tocante a localização subcelular a expressão de XIAP foi detectada exclusivamente no núcleo das células tumorais, nos 24 casos considerados positivos (Figura 11a). Em apenas dois casos, a expressão da XIAP foi detectada exclusivamente no citoplasma. Por outro lado, a expressão de survivina foi detectada exclusivamente no citoplasma nos 16 casos considerados positivos (Figura 11b). Em apenas uma amostra a expressão de survivina foi detectada exclusivamente no núcleo. As demais proteínas apresentaram o padrão esperado de expressão no núcleo (p53 e ki-67) ou no citoplasma (Bcl-2). No único caso onde a survivina foi detectada no núcleo, não se observou expressão de XIAP no citoplasma. Nos dois casos em que a XIAP foi detectada no citoplasma, não foi observada expressão de survivina no núcleo. Para fins de análise comparativa com os dados clínicos e demográficos, estes três casos foram considerados negativos para as respectivas proteínas cujo padrão de expressão diferiu do observado nos demais. Além disso, os casos em que não foi possível determinar a expressão de alguma proteína foram excluídos das análises relativas à proteína em questão.

Em paralelo, foi observado que a expressão de XIAP foi preponderante nas células maiores e menos diferenciadas (centroblastos) em relação às células menores e morfológicamente mais homogêneas (imunoblastos) (Figura 11a e 6e), mesmo entre as células do mesmo caso (Figura 11a). Por outro lado, o mesmo não foi observado com relação à expressão de survivina que, quando presente, era visualizada tanto nos centroblastos quanto nos imunoblastos tumorais (Figura 11b).

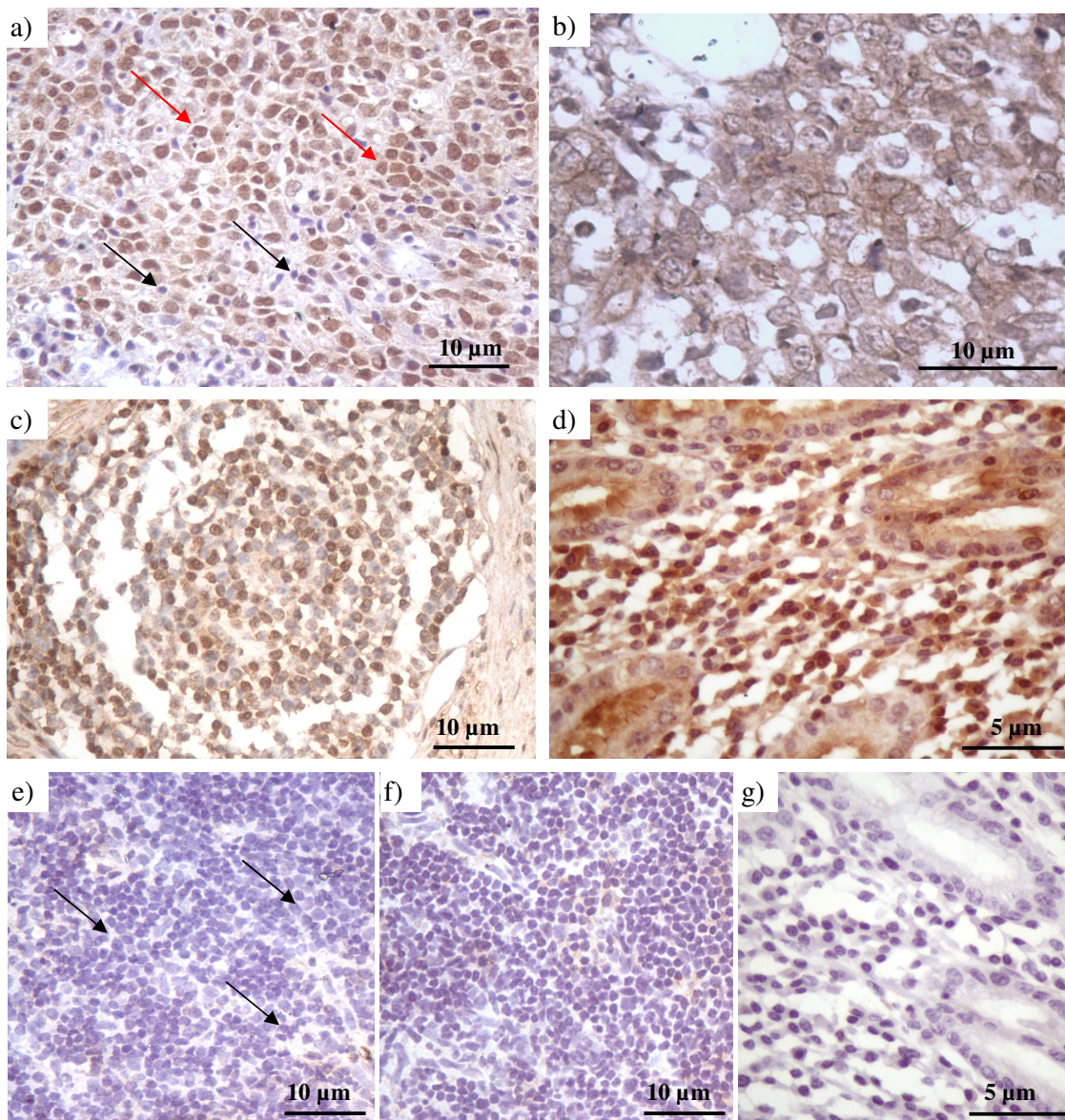


Figura 18: Detecção por imunohistoquímica da expressão de XIAP no núcleo (a) e de survivina no citoplasma (b) das células de LDGCB. Como controles positivos, foram utilizados cortes histológicos de mucosa estomacal sabidamente positiva para ambas as proteínas XIAP (c) e survivina (d). A aparência em termos de coloração de um tumor negativo para XIAP (e) ou para survivina (f) é semelhante à do controle negativo, em que o anticorpo foi omitido (g). Seta vermelha: centroblasto; seta preta: imunoblasto.

#### 4.4 CO-EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS XIAP, SURVIVINA, P53, BCL2 E KI-67 NOS LDGCB

Nos 69 casos de LDGCB centrolásticos estudados, foi analisado se as proteínas em estudo apresentaram padrões de co-expressão. Para isso, foi realizada uma sobreposição dos casos positivos (corte de positividade em 5% de células tumorais imunomarcadas) e negativos para cada duas proteínas. Não foi observado qualquer tipo de correlação na expressão de nenhuma dupla de proteínas. Por este motivo e devido à alocação de pequenos números de casos em cada casela, não se fez aplicável o uso do teste estatístico adequado para determinar a significância das correlações. A Tabela 7 exhibe o perfil de expressão de cada uma das proteínas analisadas para cada caso estudado, numerados em ordem de matrícula.

Tabela 7: Comparação da expressão das proteínas XIAP, survivina, p53, Bcl-2 e ki-67 nos 69 casos de LDGCB centrolásticos em estudo.

Número da Amostra	p53	Bcl2	MIB	XIAP	Survivina
1	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3	Negativo	Positivo		Negativo	Negativo
4	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
6				Negativo	Negativo
7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
8	Positivo	Negativo		Negativo	Negativo
9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
10	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
11	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
12	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
13	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
14	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
16	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
17	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
18	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
19	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
21	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
22				Negativo	Negativo
23	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
24	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
25	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
26	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
27	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
28	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
29	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
30	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
31	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
32	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
33	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
34	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
35	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
36	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
37	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
38	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
39	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
40	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
41	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
42	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
43	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
44	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
45	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
46	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
47	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
48	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
49	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
50	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
51	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
52	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
53	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
54	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
55	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
56	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
57	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
58	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
59	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
60	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
61	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
63	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
64	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
65	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
66	Positivo	Negativo		Negativo	Positivo
67	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
68	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
69	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Obs: Em branco os casos em que a expressão da proteína correspondente não pode ser determinada.



#### 4.5 CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS XIAP, SURVIVINA, P53, BCL2 E KI-67 COM A RESPOSTA AO TRATAMENTO NOS LDGCB CENTROBLÁSTICOS

Dos 76 casos analisados, 11 casos foram tratados com protocolos alternativos ao CHOP, cinco eram do subtipo imunoblástico e para dois casos não foi possível estabelecer a classificação morfológica. De modo a tornar o grupo analisado o mais homogêneo possível e assim evitar a interferência de fatores como diferentes tratamentos e padrões biológicos tumorais, a relação da expressão das proteínas XIAP, survivina, p53, Bcl-2 e ki-67 com a resposta ao tratamento, na figura dos parâmetros probabilidade de SLP e de SG em oito anos, foi investigada apenas nos 58 casos da variante centroblástica para os quais o protocolo CHOP foi empregado.

Foram confeccionadas as curvas de sobrevida (SLP e SG) do grupo de 58 pacientes (Figura 12), bem como as curvas dos diferentes grupos relacionados à expressão de cada uma das proteínas XIAP (Figura 13), survivina (Figura 14), p53 (Figura 15), Bcl-2 (Figura 16) e ki-67 (Figura 17), de acordo com o método de Kaplan-Meier. Além disso, foi empregado o teste de Log-rank para avaliar a significância da diferença entre as curvas dos grupos positivo e negativo para cada proteína. As correlações entre a expressão de cada proteína e a SLP e a SG estão exibidas respectivamente nas Tabelas 8 e 9.

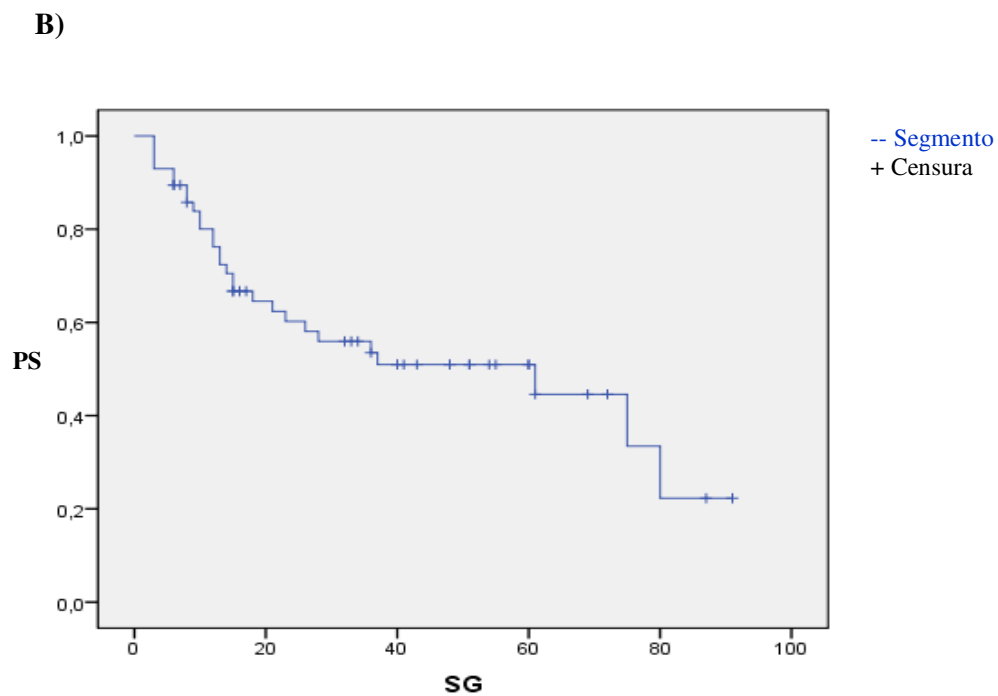
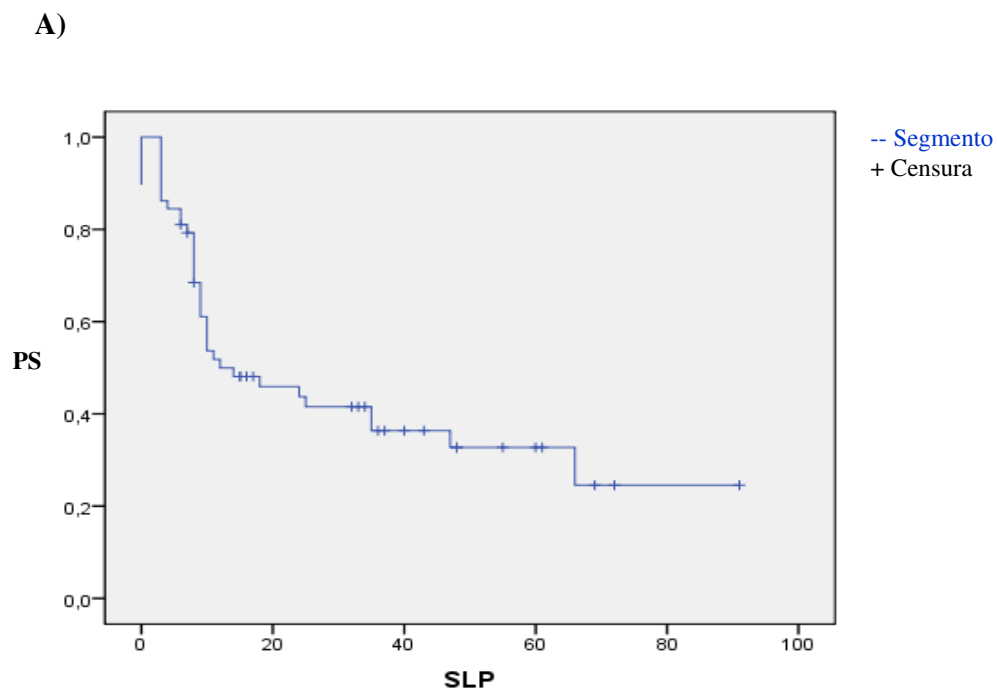


Figura 19: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centrolástico tratados com CHOP. PS: Probabilidade de sobrevida. A censura para SLP foi a recaída e para a SG foi o óbito.

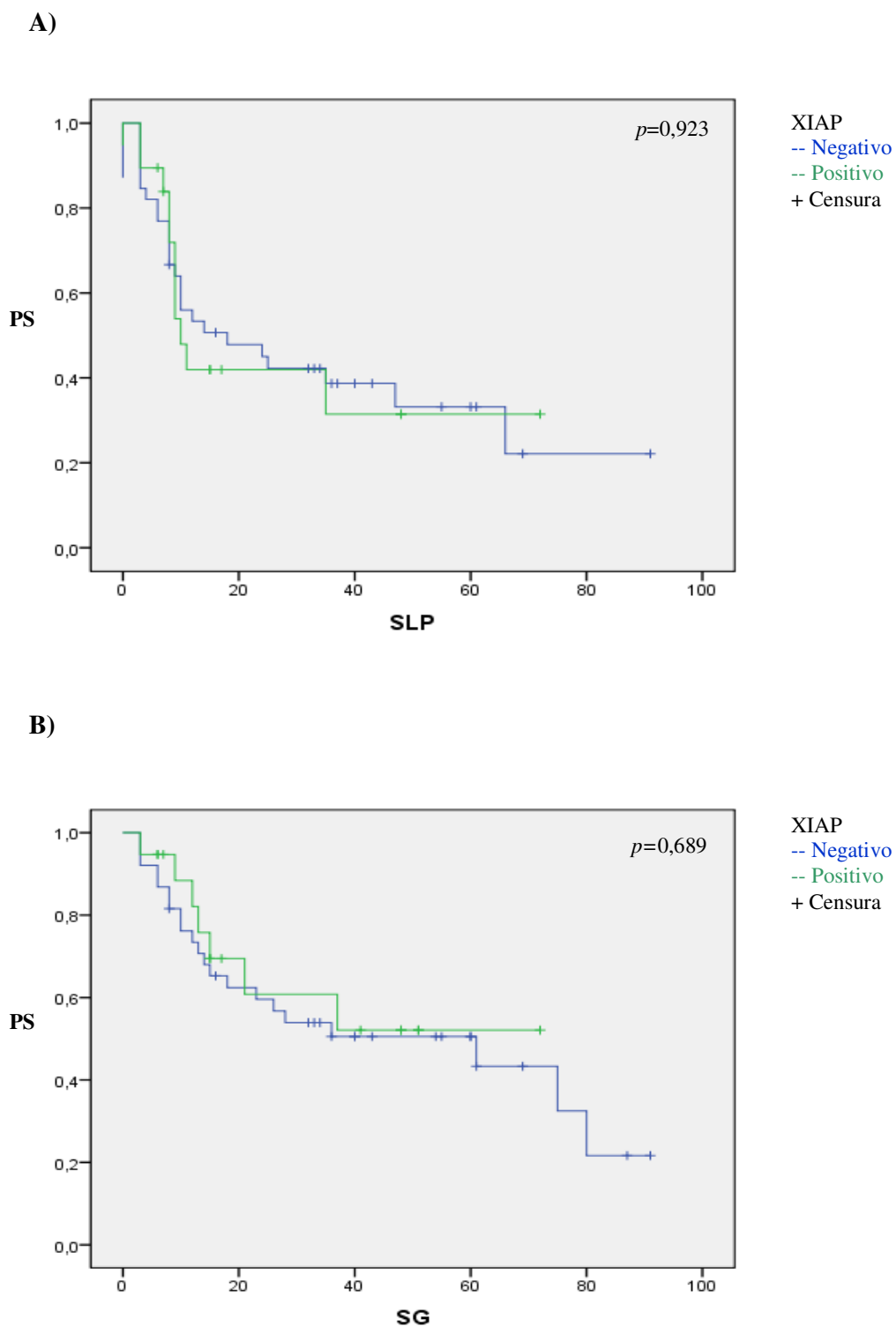


Figura 20: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centrolástico tratados com CHOP positivos ou negativos para expressão de XIAP. PS: Probabilidade de sobrevida. A censura para SLP foi a recaída e para a SG foi o óbito. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

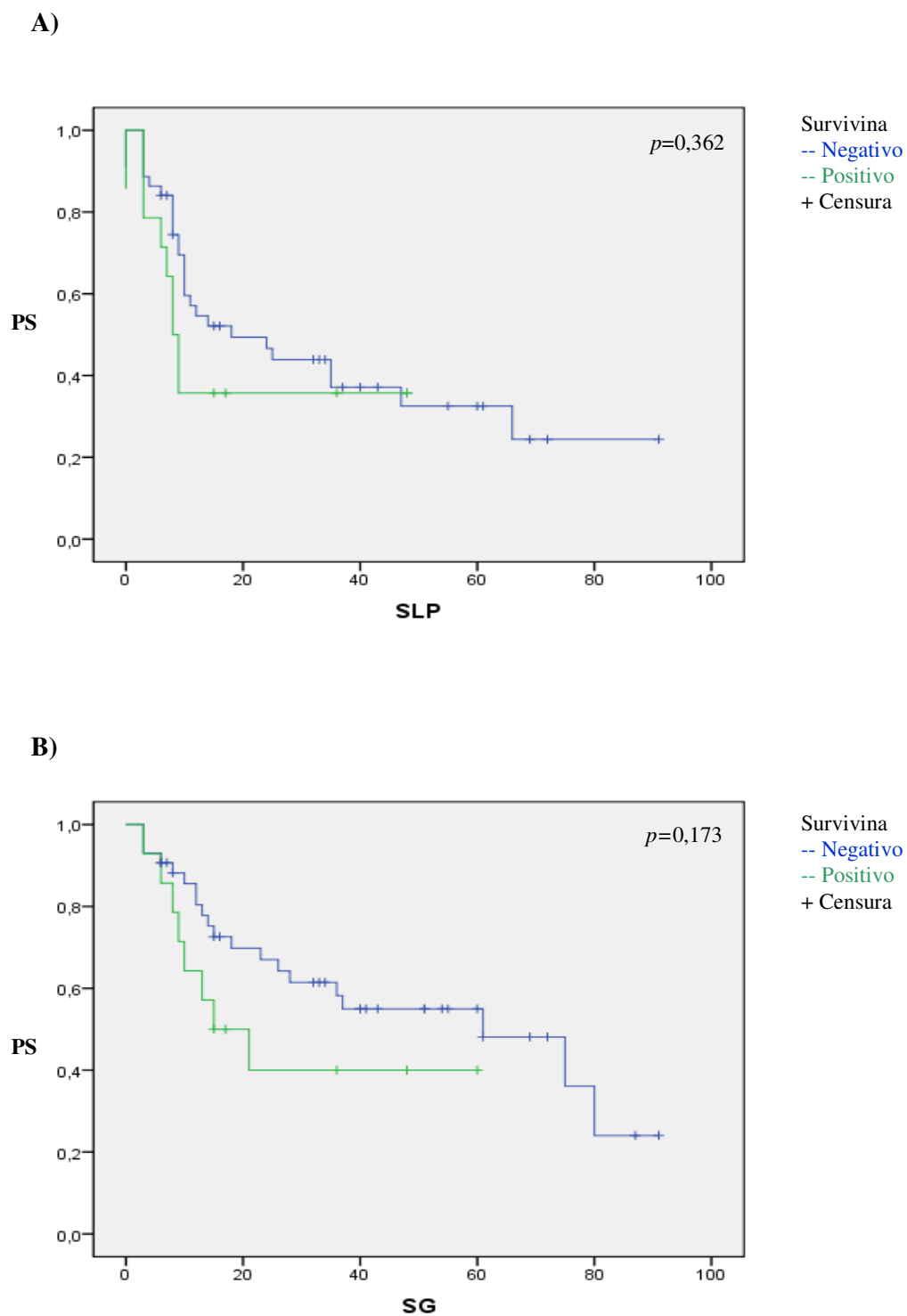


Figura 21: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centrolástico tratados com CHOP positivos ou negativos para expressão de survivina. PS: Probabilidade de sobrevida. A censura para SLP foi a recaída e para a SG foi o óbito. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

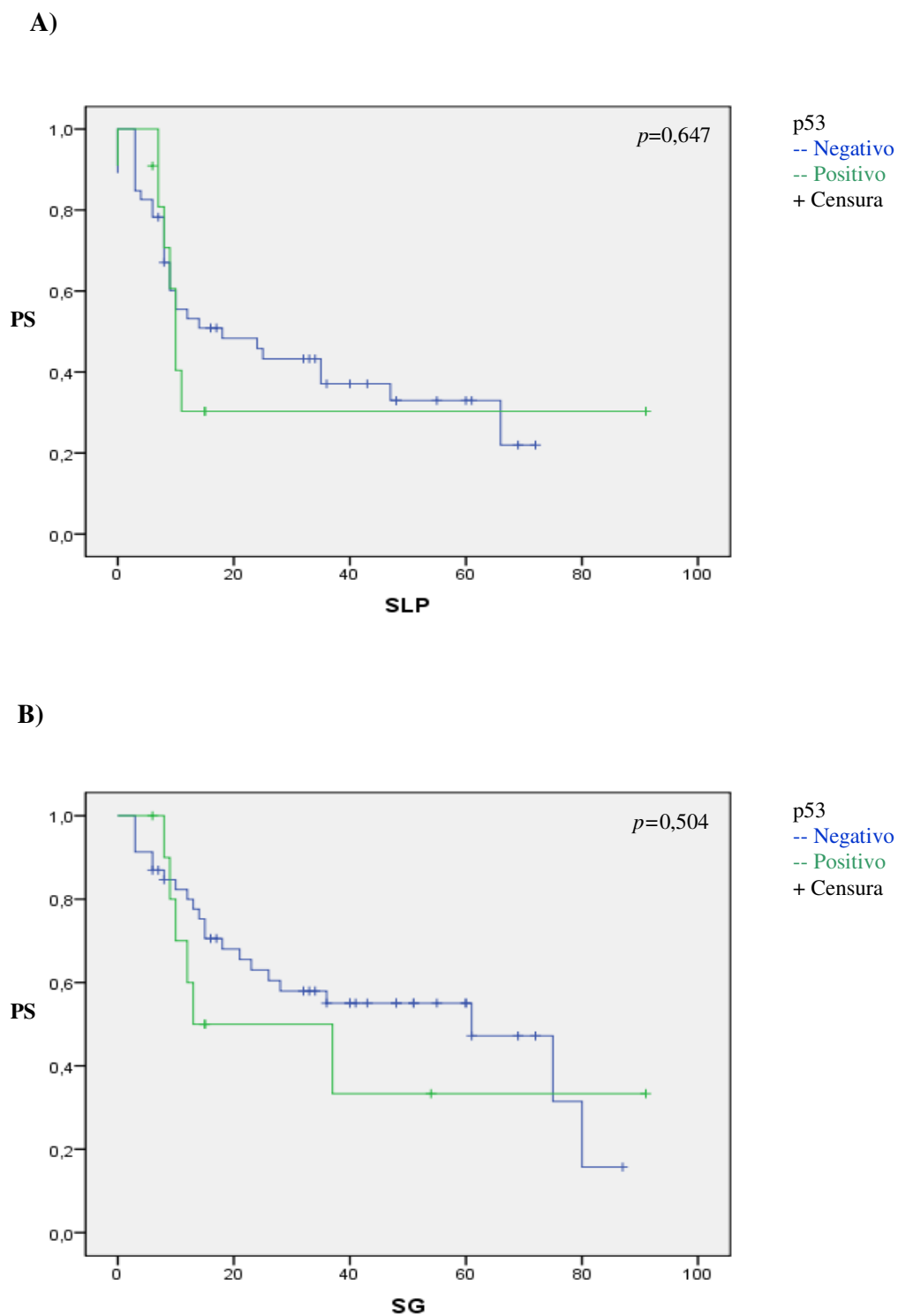
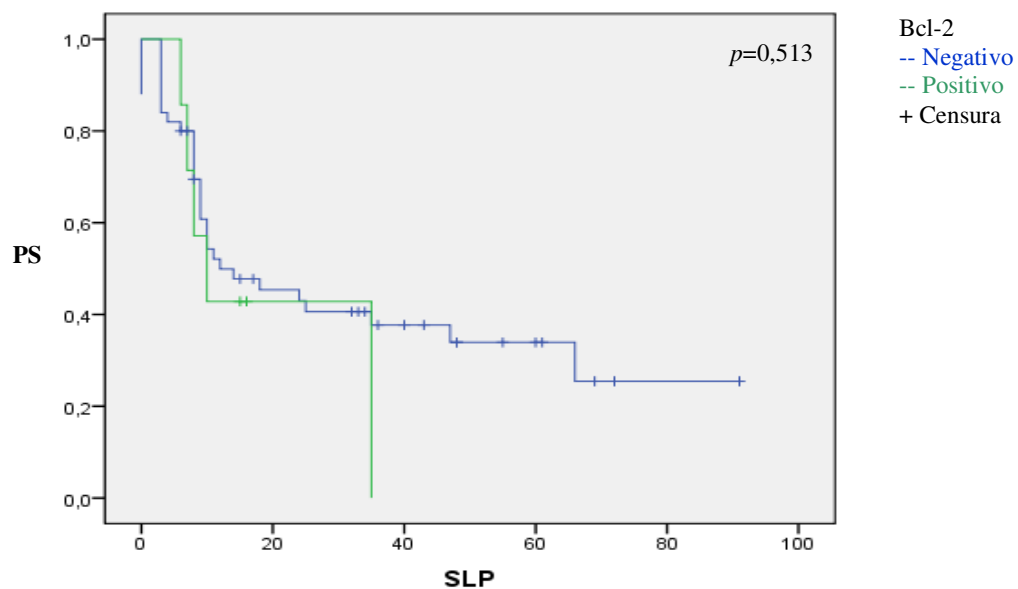


Figura 22: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centrolástico tratados com CHOP positivos ou negativos para expressão de p53. PS: Probabilidade de sobrevida. A censura para SLP foi a recaída e para a SG foi o óbito. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

A)



B)

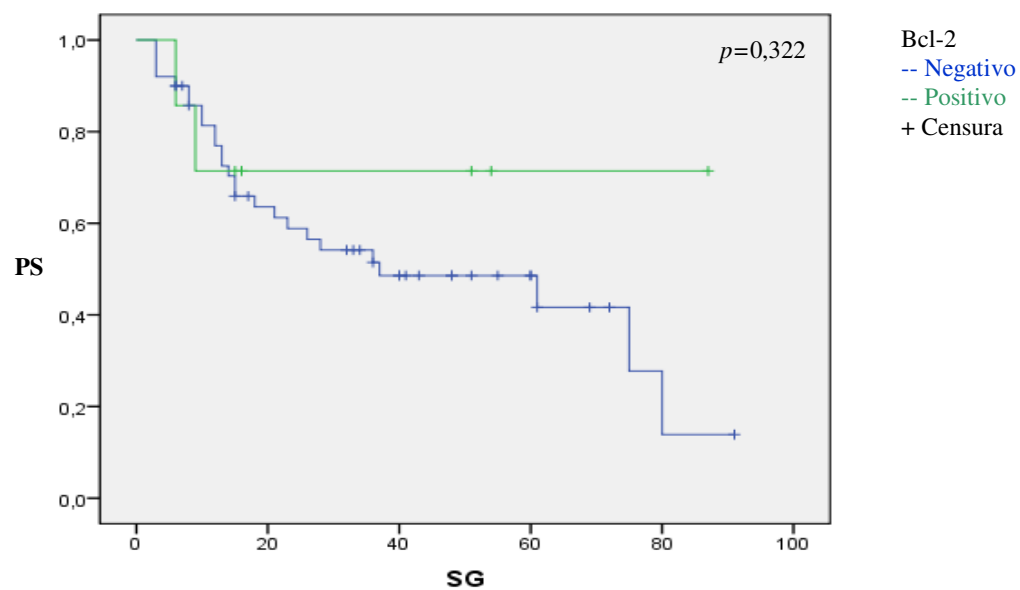
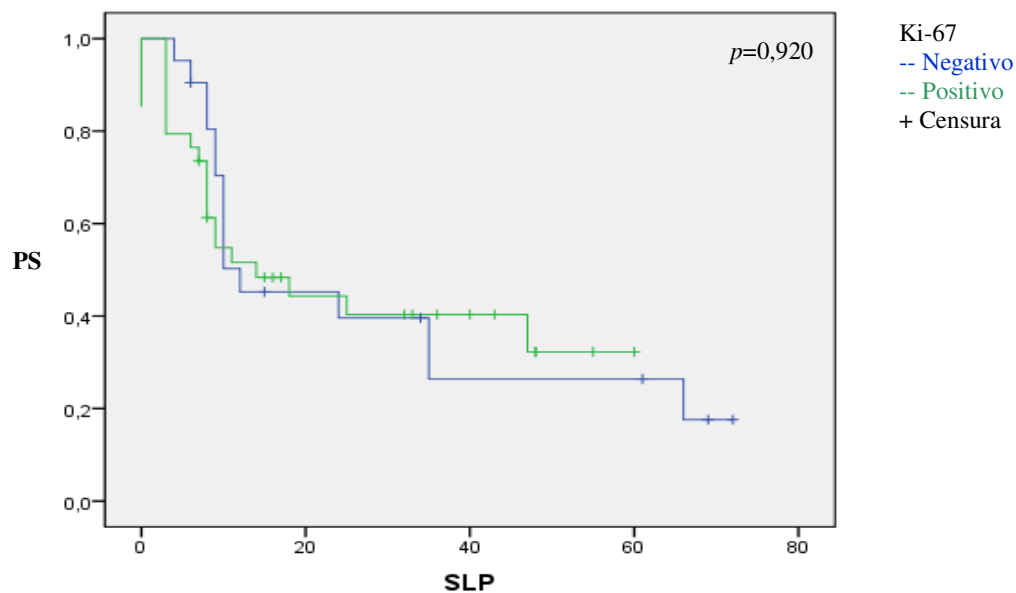


Figura 23: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centrolástico tratados com CHOP positivos ou negativos para expressão de Bcl-2. PS: Probabilidade de sobrevida. A censura para SLP foi a recaída e para a SG foi o óbito. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

A)



B)

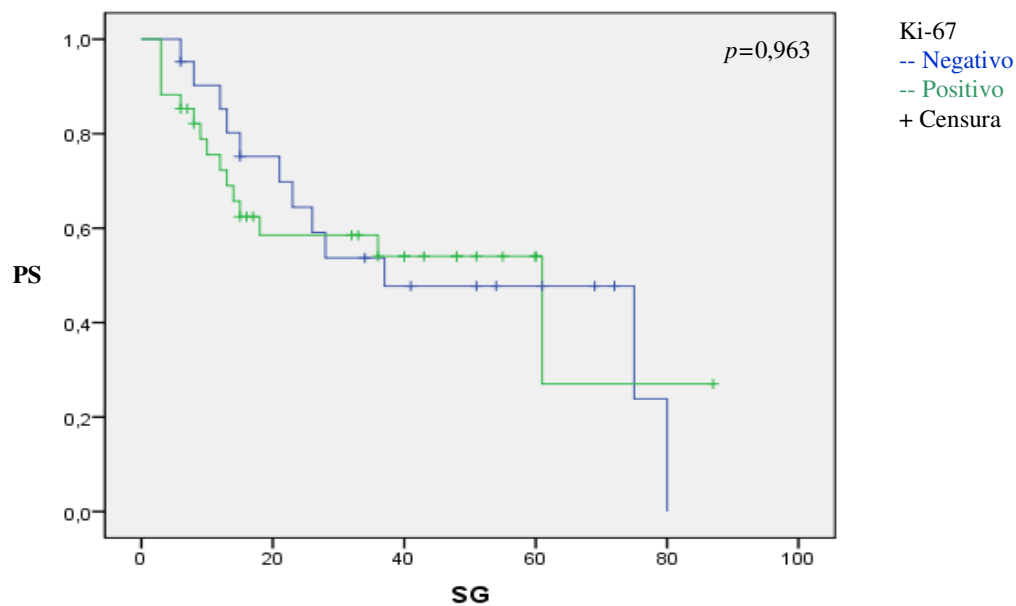


Figura 24: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centrolástico tratados com CHOP positivos ou negativos para expressão de ki-67. PS: Probabilidade de sobrevida. A censura para SLP foi a recaída e para a SG foi o óbito. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

Tabela 8: Correlação da expressão das proteínas XIAP, survivina, p53, Bcl-2 e ki-67 com a SLP nos 58 casos de LDGCB centrolblásticos tratados com CHOP.

	Probabilidade de SLP em oito anos				*p.=
	Casos positivos	Erro Padrão	Casos negativos	Erro Padrão	
XIAP	31,5%	12,8%	22,1%	10,7%	0,923
Survivina	50,0%	13,4%	24,4%	9,4%	0,362
p53	30,3%	14,6%	22,0%	10,4%	0,647
Bcl-2	0%	18,7%	25,4%	9,2%	0,513
Ki-67	32,2%	10,2%	17,6%	10,1%	0,920

\*Teste de Log-rank. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ . SLP: Sobrevida livre de progressão da doença.

Tabela 9: Correlação da expressão das proteínas XIAP, survivina, p53, Bcl-2 e ki-67 com a SG nos 58 casos de LDGCB centrolblásticos tratados com CHOP.

	Probabilidade de SG em oito anos				*p.=
	Casos positivos	Erro Padrão	Casos negativos	Erro Padrão	
XIAP	52,1%	13,7%	21,7%	11,9%	0,689
Survivina	40,0%	13,9%	24,1%	13,0%	0,173
p53	33,3%	17,2%	15,7%	13,3%	0,504
Bcl-2	71,4%	17,1%	13,9%	11,7%	0,322
Ki-67	27,0%	19,7%	0%	17,8%	0,963

\*Teste de Log-rank. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ . SG: Sobrevida global.

Como a expressão de nenhuma das proteínas analisadas se correlacionou com a SLP (Tabela 8) ou com a SG (Tabela 9) em oito anos para um valor de corte de positividade de 5% de células tumorais positivas, foram testadas maiores frações mínimas de células tumorais imunomarcadas para XIAP e ki-67 como valores de corte alternativos. Para isso, foram levados em consideração os padrões de distribuição de porcentagem de células positivas observados nos tumores para ambas as proteínas. No caso da survivina, da p53 e da Bcl-2, não foi possível testar um corte para positividade maior do que 5% das células tumorais imunomarcadas nem realizar análise com estratificação, pois os grupos ficariam com um número muito reduzido de casos, inviabilizando a análise estatística.



Para XIAP, foi testado um corte para positividade de 20% das células tumorais imunomarcadas (Tabela 10). As curvas de sobrevida para SLP e SG foram geradas. Quando classificada a expressão de XIAP como positiva apenas quando a partir de 20% das células tumorais apresentassem marcação ( $\geq 20\%$ ), não houve impacto na SLP (SLP negativos: 19,8% EP=9,7%; SLP positivos: 44,4% EP=16,6%;  $p=0,409$ ) e na SG (SG negativos: 21,9% EP=11,9%; SG positivos: 51,9% EP=17,6%;  $p=0,600$ ) (Figura 18). Além disso, quando estratificada a expressão de XIAP nos grupos (1) negativo, (2) XIAP 5-15% e (3) XIAP  $\geq 20\%$ , também não houve impacto na SLP (SLP grupo 1: 22,1% EP=10,7%; SLP grupo 2: 0% EP=17,3%; SG grupo 3: 44,4% EP=16,6%;  $p=0,398$ ) e na SG (SG grupo 1: 21,7% EP=11,9%; SG grupo 2: 59,3% EP=18,5%; SG grupo 3: 51,9% EP=17,6%;  $p=0,872$ ) (Figura 19).

Tabela 10: Amostras de LDGCB centrolástico positivos para XIAP.

Número da amostra	Porcentagem de células tumorais imunomarcadas para XIAP	Teste 1: Casos positivos para corte em 20%	Teste 2, Grupo 1: Casos positivos 5-15%	Teste 2, Grupo 2: Casos positivos 20-100%
3	25	x		x
11	20	x		x
13	70	x		x
24	40	x		x
25	15		x	
26	10		x	
28	50	x		x
29	10		x	
30	30	x		x
31	40	x		x
33	20	x		x
35	10		x	
37	20	x		x
40	8		x	
46	5		x	
49	40	x		x
54	10		x	
55	10		x	
58	15		x	

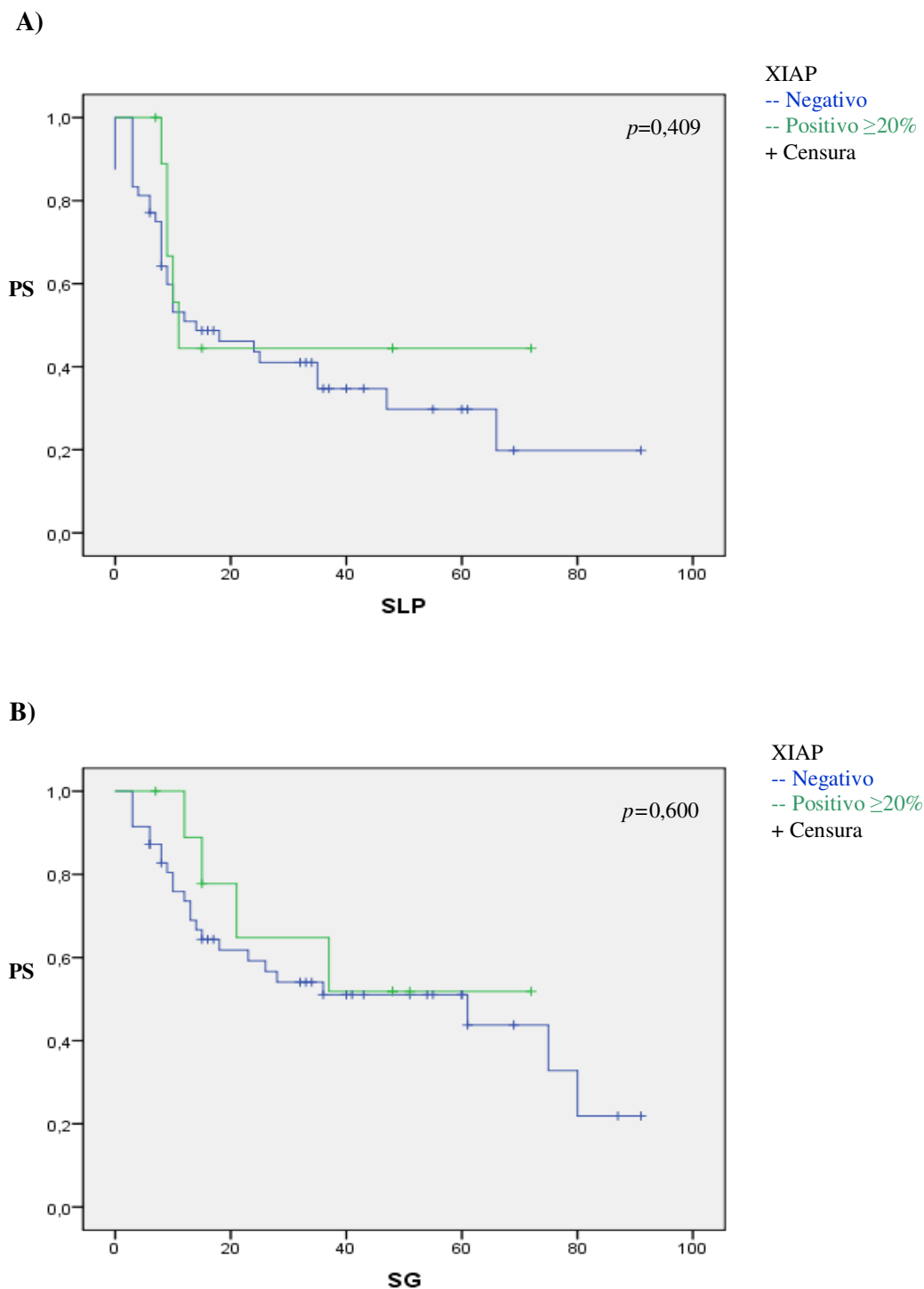
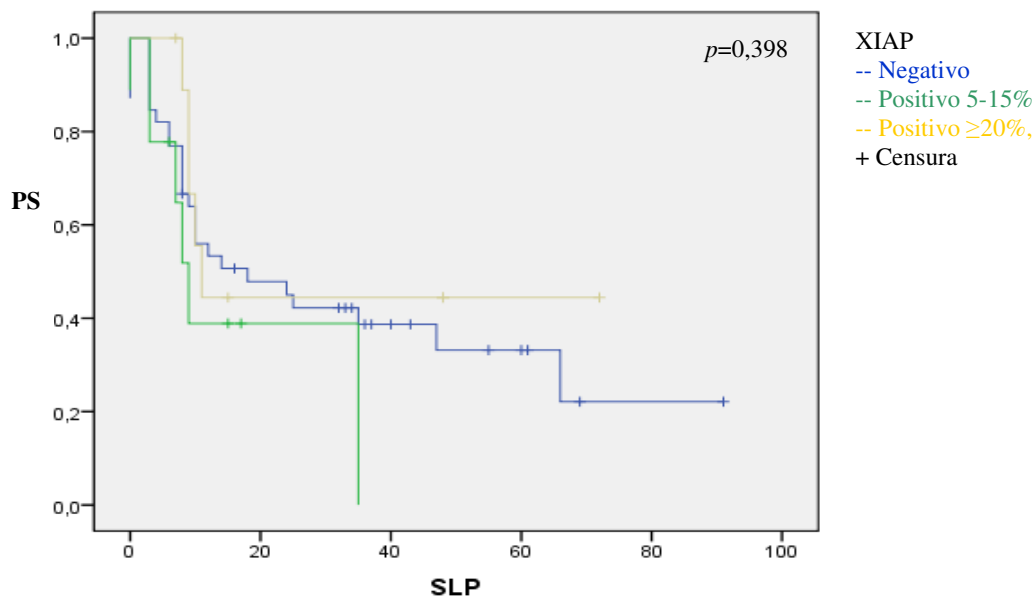


Figura 25: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centroblastico tratados com CHOP positivos ou negativos para a expressão de XIAP, com ponto de corte em 20% das células tumorais positivas. Nenhum dos grupos se destacou quanto à resposta ao tratamento. PS: Probabilidade de sobrevida. A censura para SLP foi a recaída e para a SG foi o óbito. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

A)



B)

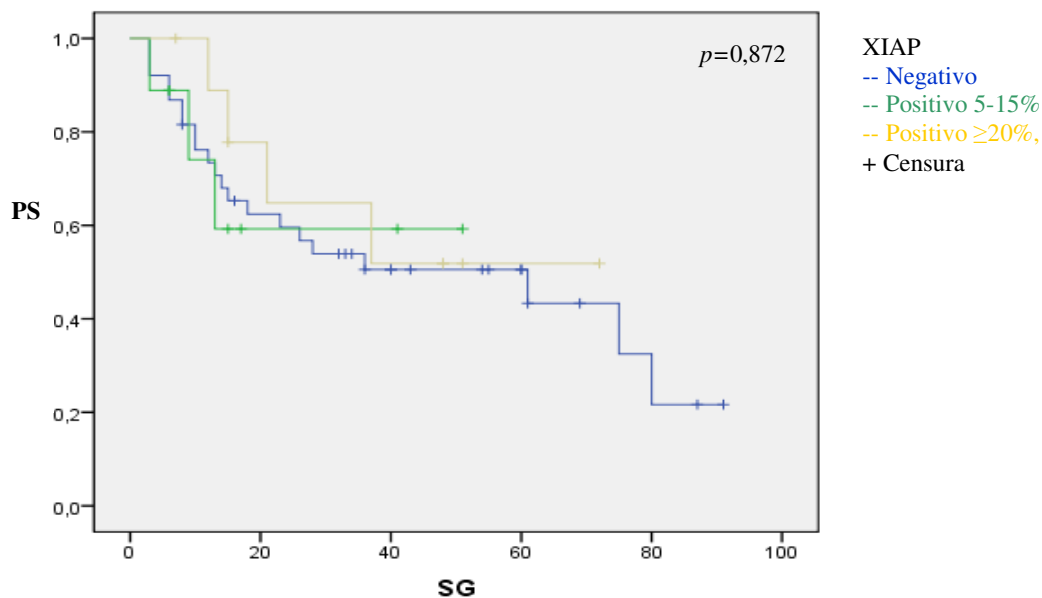


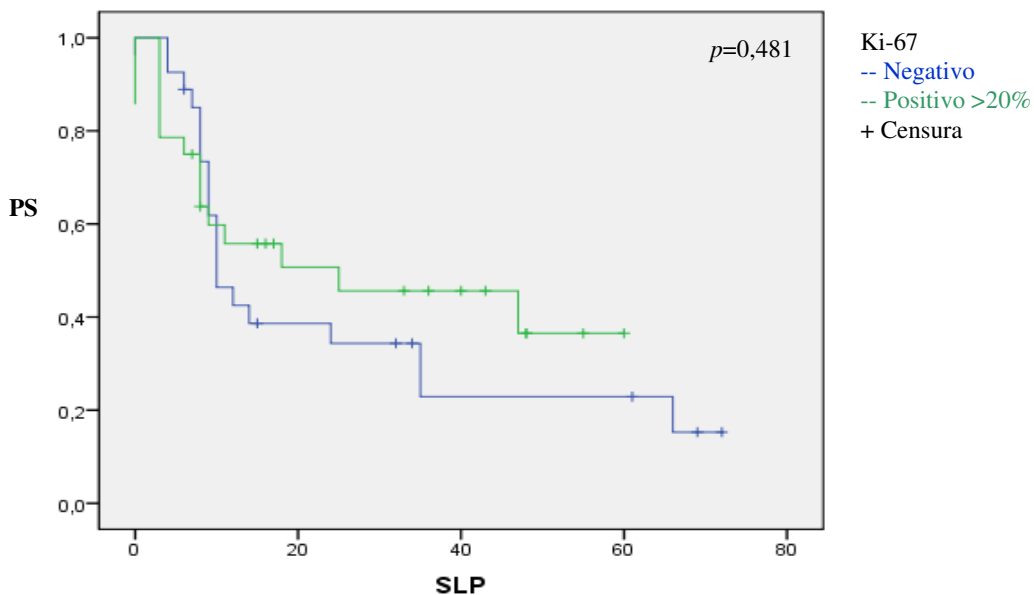
Figura 26: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centrolástico tratados com CHOP positivos ou negativos para a expressão de XIAP, com três grupos de expressão. Nenhum dos grupos se destacou quanto à resposta ao tratamento. PS: Probabilidade de sobrevida. A censura para SLP foi a recaída e para a SG foi o óbito. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

Para ki-67, foram testados cortes para positividade em >20% e >60% das células tumorais imunomarcadas (Tabela 11). As curvas de sobrevida para SLP e SG foram geradas. Quando classificada a expressão de ki-67 como positiva apenas se mais de 20% das células tumorais apresentassem marcação (>20%), não houve impacto na SLP (SLP negativos: 15,3% EP=8,7%; SLP positivos: 36,5% EP=11,5%;  $p=0,481$ ) e na SG (SG negativos: 0% EP=16,8%; SG positivos: 28,9% EP=21,0%;  $p=0,813$ ) (Figura 20). Quando classificada a expressão de ki-67 como positiva apenas se >60%, também não houve impacto na SLP (SLP negativos: 20,2% EP=9,7%; SLP positivos: 33,3% EP=19,2%;  $p=0,487$ ) e na SG (SG negativos: 14,7% EP=12,4%; SG positivos: 50,0% EP=20,4%;  $p=0,584$ ) (Figura 21). Além disso, quando estratificada a expressão de ki-67 nos grupos (1) ki-67  $\leq 20\%$  (negativo), (2) ki-67 20-60% e (3) ki-67 >60%, também não houve impacto na SLP (SLP grupo 1: 16,5% EP=9,4%; SLP grupo 2: 34,2% EP=12,9%; SLP grupo 3: 33,3% EP=19,2%;  $p=0,745$ ) e na SG (SG grupo 1: 0% EP=17,5%; SG grupo 2: 29,0% EP=21,2%; SG grupo 3: 50,0% EP=20,4%;  $p=0,853$ ) (Figura 22).

Tabela 11: Amostras de LDGCB centrolástico positivos para ki-67.

Número da amostra	Porcentagem de células tumorais imunomarcadas para ki-67	Teste 1: Casos positivos para corte em >20%	Teste 2: Casos positivos para corte em >60%	Teste 3: Grupo 2: 25-60% Grupo 3: 65-100%
1	30	x		2
8	30	x		2
11	5			
15	50	x		2
16	30	x		2
18	80	x	x	3
19	30	x		2
20	30	x		2
21	30	x		2
22	80	x	x	3
27	20			
28	70	x	x	3
29	20			
30	80	x	x	3
31	10			
32	40	x		2
33	50	x		2
34	50	x		2
37	40	x		2
38	30	x		2
40	20			
41	40	x		2
42	30	x		2
43	40	x		2
44	10			
45	50	x		2
47	40	x		2
48	50	x		2
49	40	x		2
50	50	x		2
52	15			
54	60	x		2
55	80	x	x	3
57	40	x		2
58	80	x	x	3

A)



B)

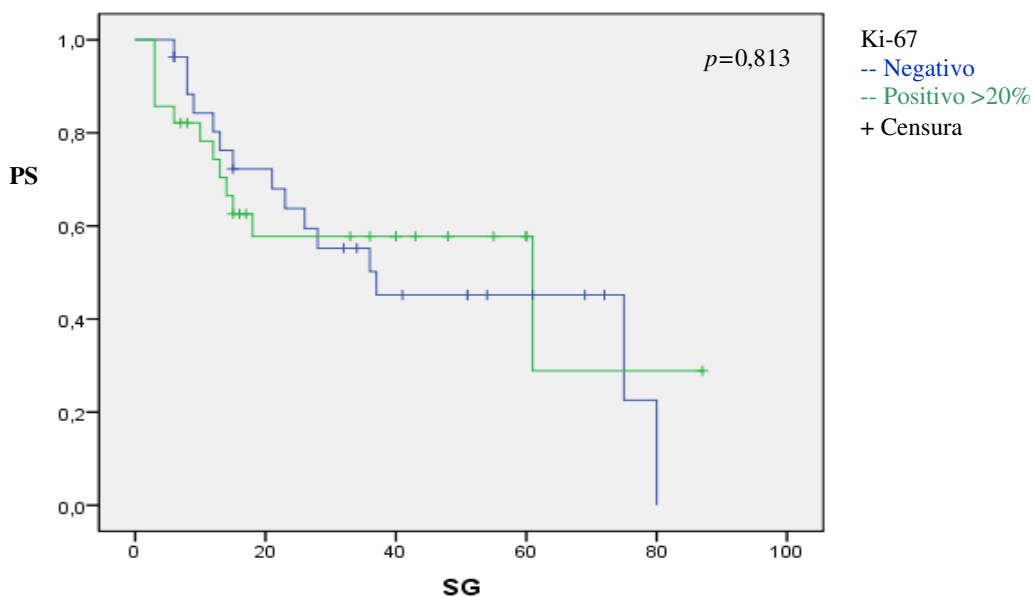
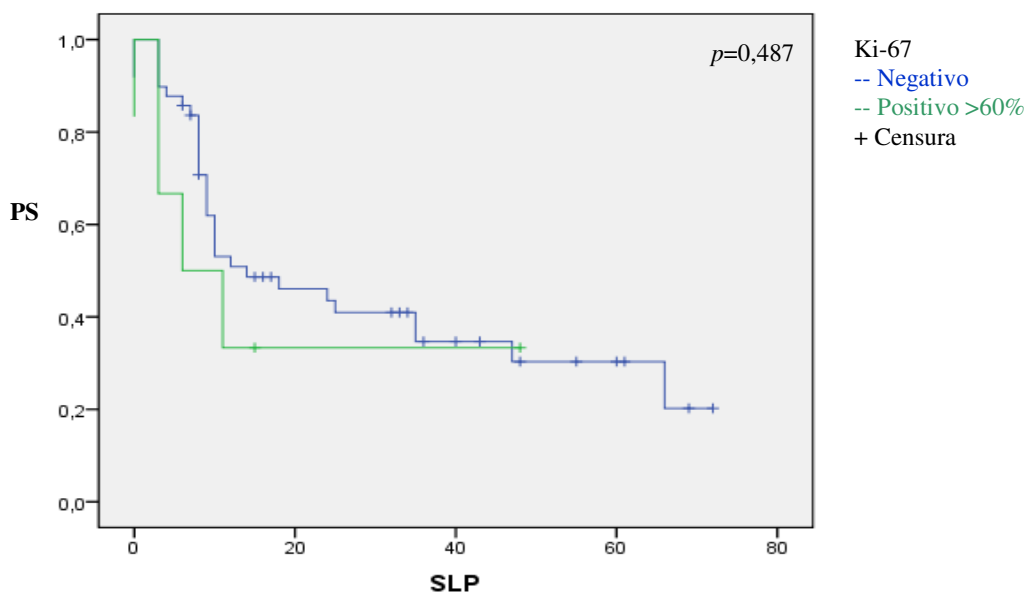


Figura 27: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centrolblástico tratados com CHOP positivos ou negativos para a expressão de ki-67, com ponto de corte em >20% das células tumorais positivas. Nenhum dos grupos se destacou quanto à resposta ao tratamento. PS: Probabilidade de sobrevida. A censura para SLP foi a recaída e para a SG foi o óbito. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

A)



B)

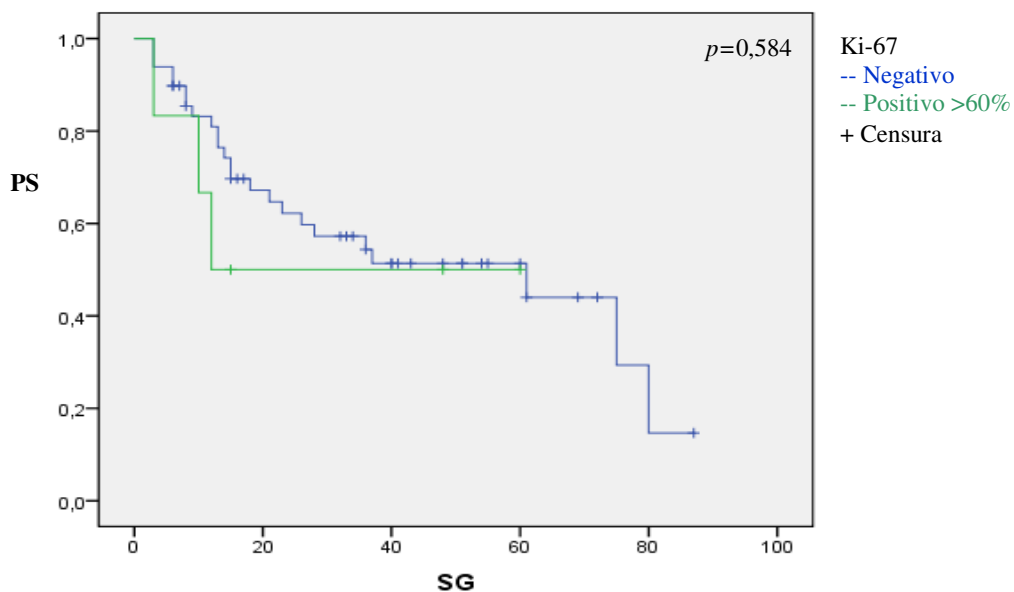
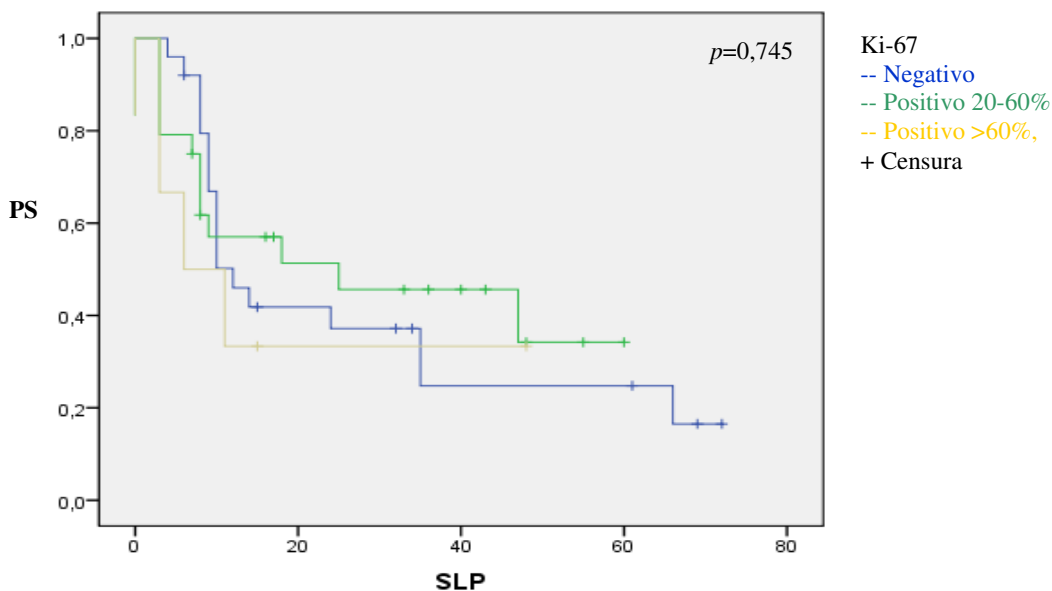


Figura 28: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centrolástico tratados com CHOP positivos ou negativos para a expressão de ki-67, com ponto de corte em >60% das células tumorais positivas. Nenhum dos grupos se destacou quanto à resposta ao tratamento. PS: Probabilidade de sobrevida. A censura para SLP foi a recaída e para a SG foi o óbito. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

A)



B)

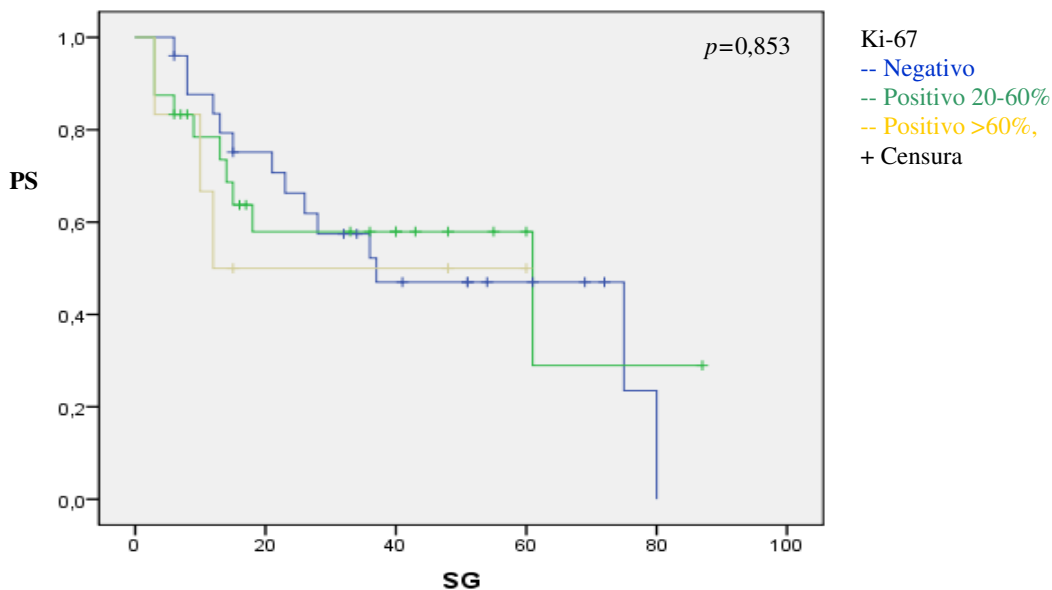


Figura 29: Curvas de Kaplan-Meier exibindo a probabilidade de sobrevida livre de progressão (SLP) (A) e sobrevida global (SG) (B) em oito anos (tempo em meses) para os 58 pacientes com LDGCB centrolástico tratados com CHOP positivos ou negativos para a expressão de ki-67, com três grupos de expressão. Nenhum dos grupos se destacou quanto à resposta ao tratamento. PS: Probabilidade de sobrevida. A censura para SLP foi a recaída e para a SG foi o óbito. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .



## 5 DISCUSSÃO

Os LDGCB são LNH altamente agressivos e heterogêneos em termos das bases moleculares de sua patogênese e evolução. Apenas metade dos pacientes é curada, sendo que a outra metade não responde ao tratamento com protocolo CHOP. Esse último grupo é refratário ao tratamento inicial ou apresenta recaída após atingir a remissão completa. Atualmente, o único parâmetro utilizado para prever a resposta ao tratamento e a sobrevivência dos pacientes com LDGCB é o IPI (Harris *et al.*, 1999; Jaffe *et al.*, 2001; Hoffman *et al.*, 2005). No entanto, devido à heterogeneidade de respostas e a alta taxa de falha ao tratamento, diversos marcadores biomoleculares tem sido analisados com o objetivo de auxiliar no prognóstico dos pacientes. Contudo, nenhum consenso foi encontrado sobre a expressão de genes e proteínas, até o presente momento, motivo pelo qual, a correlação da expressão de diversas proteínas com a resposta ao tratamento nos LDGCB tem sido pesquisada (Piris *et al.*, 1995; Kramer *et al.*, 1996; Kramer *et al.*, 1998; Adida *et al.*, 2000; Jerkeman *et al.*, 2004; Maartense *et al.*, 2004; Muris *et al.*, 2005; Lossos e Morgensztern, 2006; Young *et al.*, 2008). Nesse contexto, acredita-se que análise da expressão de proteínas envolvidas na resistência a apoptose e na proliferação celular nos LDGCB pode proporcionar melhor compreensão de sua biologia e fornecer informações sobre a relevância dessas proteínas na resposta ao tratamento nesta doença (Bai *et al.*, 2005; Akyurek *et al.*, 2006).

As proteínas Bcl-2, XIAP e survivina são importantes reguladores negativos da apoptose. Seja no passo ativador da via apoptótica intrínseca, mediante a liberação de Citocromo c da mitocôndria (família Bcl-2), seja nas etapas finais de atuação das caspases (família das IAPs), essas proteínas possuem um papel fisiológico crucial, evitando que a célula morra após estresses menores e contornáveis (Ameisen, 2002; Opferman e Korsmeyer, 2003; Vermeulen *et al.*, 2005; Elmore, 2007). Além disso, a proteína p53 é uma das proteínas

mais importantes da célula, parecendo ser responsável pela regulação da maioria dos processos celulares, especialmente o ciclo celular e a apoptose (Finlay *et al.*, 1989; Bensaad e Vousden, 2007; Efeyan e Serrano, 2007; Liu *et al.*, 2008; Meulmeester e Jochemsen, 2008; Riley *et al.*, 2008). Já a proteína ki-67 parece estar intimamente associada à mitose e por isso tem sido amplamente utilizada como uma ferramenta para determinar o índice de proliferação celular (porcentagem de células que apresentam expressão de ki-67) de populações tumorais e saudáveis (Gerdes *et al.*, 1983; Gerdes *et al.*, 1984; Gerdes *et al.*, 1991; Schluter *et al.*, 1993; Endl e Gerdes, 2000; Scholzen e Gerdes, 2000; Kausch *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008). Em associação a outros fatores ou isoladas, essas proteínas têm sido implicadas na patogênese e na resposta ao tratamento de diversos tipos de tumor, incluindo os LDGCB (Grogan *et al.*, 1988; Eliyahu *et al.*, 1989; Datta *et al.*, 2000; Llanos *et al.*, 2001; Notarbartolo *et al.*, 2002; Ansell *et al.*, 2004; Jerkeman *et al.*, 2004; Nowak *et al.*, 2004; Zaffaroni *et al.*, 2005; Kuo, 2007; Pennati *et al.*, 2007; Pennanen *et al.*, 2008; Pennati *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2008). No entanto, não há um consenso sobre o impacto de sua expressão nesses tumores, o que pode ser alcançado através de análises em que o período de acompanhamento clínico dos pacientes seja prolongado em relação ao período de cinco anos normalmente empregado.

Quando correlacionada a expressão de Bcl-2, p53 e ki-67 com a resposta ao tratamento nos LDGCB, resultados controversos foram obtidos (Grogan *et al.*, 1988; Piris *et al.*, 1995; Kramer *et al.*, 1996; Monni *et al.*, 1997; Kramer *et al.*, 1998; Monni *et al.*, 1999; Llanos *et al.*, 2001; Barrans *et al.*, 2003; Sohn *et al.*, 2003; Jerkeman *et al.*, 2004; Maartense *et al.*, 2004; Pennanen *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2008). Esses resultados indicam a possível influência da presença e/ou atividade de outras proteínas ou mecanismos celulares, que quando associados, passam a desempenhar um papel importante no prognóstico dos LDGCB. Assim, a partir da observação da expressão das IAPs XIAP e survivina em uma fração dos LDGCB (Adida *et al.*, 2000; Akyurek *et al.*, 2006), investigamos se a expressão dessas

proteínas se correlaciona com o prognóstico tendo impacto na SLP e ou na SG em um período prolongado de oito anos de seguimento dos pacientes com LDGCB.

No estudo atual uma série de 76 casos de LDGCB foi avaliada retrospectivamente para a expressão das proteínas envolvidas na resistência à apoptose p53, Bcl-2, XIAP e survivina e da proteína relacionada a proliferação celular ki-67 nas células tumorais obtidas através de biópsias. Mais especificamente, um pequeno fragmento tumoral foi emblocado em parafina, seccionado e analisado na forma de cortes histológicos e os resultados do estudo laboratorial foram correlacionados com a SLP e a SG em oito anos.

Os dados clínicos (local de acometimento, estadiamento de Ann Arbor e IPI), demográficos (gênero, etnia e idade) dos pacientes e o subtipo morfológico dos LDGCB foram coletados e analisados (Tabela 1). Com relação aos dados clínicos e ao subtipo morfológico, houve prevalência do subtipo centroblastico em relação ao subtipo imunoblastico ( $p < 0,001$ ), acometimento preferencial de linfonodos em relação aos sítios extranodais e múltiplos ( $p < 0,001$ ), foi observada maior frequência de casos com nível normal de LDH ( $p = 0,001$ ) e a distribuição de casos nos estágios de Ann Arbor ( $p = 0,338$ ) e nos índices do IPI foi semelhante ( $p = 0,908$ ). Estes dados estão de acordo com o reportado em outros estudos, em que a variante centroblastica é observada em torno de 90% dos casos e há prevalência dos estadiamentos I e II, embora o IPI leve em consideração outros fatores clínicos e demográficos e por isso apresente distribuição homogênea das frequências de seus índices (Llanos *et al.*, 2001; Hennessy *et al.*, 2004; Ansell e Armitage, 2005; Hoffman *et al.*, 2005; Ng, 2007).

Com relação aos dados demográficos, foi observada uma maior frequência de acometimento em homens do que em mulheres ( $p = 0,047$ ), o que está de acordo com a literatura, embora não existam dados sobre os mecanismos que levam ao favorecimento do gênero masculino à patogênese dos LDGCB (Hennessy *et al.*, 2004; Ansell e Armitage, 2005;

Hoffman *et al.*, 2005). Adicionalmente, foi observada maior prevalência de pacientes classificados como de etnia branca do que de não-brancos com esta doença ( $p<0,001$ ). Apesar de esta informação também estar de acordo com a epidemiologia da doença (Hoffman *et al.*, 2005; Ng, 2007), sabe-se que a população brasileira é extremamente miscigenada e, historicamente, os indivíduos de origem européia tiveram um favorecimento acadêmico e sócio-economicamente refletido no acesso aos serviços de saúde. Por outro lado, dada a subjetividade de discriminação étnica no contexto de nossa população e o fato de que quem relata a etnia do paciente no prontuário são os diversos médicos dos Serviços de Hematologia e de Oncologia, é possível que a diferença observada em nosso estudo, nesta questão em particular, tenha sido influenciada por fatores sociais, além dos biológicos.

Outro dado demográfico relevante foi a menor frequência de pacientes com LDGCB com idade inferior a de 40 anos quando comparada com a daqueles nas faixas etárias entre 40 e 60 anos e acima de 60 anos ( $p=0,002$ ). Este dado é coerente com a literatura, onde se observa que esta doença é mais frequente em pessoas de meia-idade e idosos (Hennessy *et al.*, 2004; Ansell e Armitage, 2005; Hoffman *et al.*, 2005; Ng, 2007). Além disso, como não houve prevalência do grupo mais idoso, nossos resultados referentes ao impacto da expressão das proteínas envolvidas na resistência a apoptose se tornam ainda mais consistentes já que o fator idade poderia ter um peso maior na SG em oito anos do que na SG em cinco anos, tempo de acompanhamento clínico analisado na maioria dos estudos.

Quando comparados o perfil de acompanhamento clínico e de resposta ao tratamento da série total de LDGCB (76 pacientes), da seleção dos 65 pacientes tratados com o protocolo convencional CHOP e do grupo de 58 pacientes com LDGCB centroblastico tratados com CHOP, os resultados observados foram semelhantes para tempo mínimo, máximo e mediano de acompanhamento clínico, SLP e SG (Tabela 2 e Figuras 2 e 3). No entanto, quando confrontado no grupo de LDGCB tratados com CHOP os centroblasticos e os imunoblasticos,

embora não tenha havido diferença significativa entre as curvas de SLP, houve uma tendência ao grupo imunoblástico apresentar uma pior SG ( $p=0,066$ ) (Tabela 2 e Figura 3). Neste caso, nosso resultado pode não ter apresentado significância estatística em razão do alto erro padrão observado tanto no cálculo da SLP quanto no da SG do grupo imunoblástico decorrente do pequeno número de amostras neste grupo ( $n=5$ ). De fato, a literatura revela que os LDGCB imunoblásticos apresentam pior prognóstico em termos de SG do que os centroblásticos (Hoffman *et al.*, 2005). Dentro desta perspectiva, é possível que, como os centroblastos normais apresentam um perfil de expressão gênica permissivo à apoptose, mesmo quando transformados malignamente sejam mais suscetíveis ao tratamento do que os imunoblastos, que normalmente apresentam um perfil de expressão gênica anti-apoptótico (Hoffman *et al.*, 2005).

Para eliminar o viés do tratamento e do subtipo morfológico, foram considerados apenas os 58 pacientes com LDGCB centroblástico tratados com o protocolo convencional CHOP na análise do impacto das características clínicas e demográficas na resposta ao tratamento (Tabela 3). Neste grupo, foi observado que os diferentes estágios da doença, o gênero e a etnia não foram preditivos da SLP e da SG (Tabela 3 e Figuras 4, 5 e 6). Por outro lado, os pacientes com o nível de LDH acima do normal apresentaram uma tendência a uma pior SG ( $p=0,078$ ), embora não tenha havido diferença significativa na SLP (Tabela 3 e Figura 9). Além disso, pacientes com idade acima de 60 anos responderam pior do que os pacientes com menos de 60 anos, mesmo quando os últimos foram subdivididos em maiores e menores de 40 anos, embora o impacto na SG quanto estratificados em três grupos tenha sido em forma de tendência ( $p=0,070$ ) (Tabela 3 e Figuras 7 e 8). Já o IPI apresentou uma tendência a prever uma melhor SLP ( $p=0,064$ ) e foi um forte fator preditivo da SG favorável ( $p=0,006$ ) quando baixo (Tabela 3 e Figura 10). Novamente, os fatores que apresentaram apenas uma tendência à significância podem ter sido comprometidos pelo pequeno número de

amostras nas caselas ou pelo elevado erro padrão dos subgrupos analisados. Por outro lado, a significância isolada de fatores como estadiamento de Ann Arbor, LDH e idade varia entre os estudos publicados e o consenso atual é o de que eles só são capazes de prever a resposta ao tratamento quando considerados em conjunto na forma do IPI (**A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project**, 1993). De acordo com os dados obtidos no referido estudo, que analisou mais de 2000 pacientes com LNH agressivos, os resultados do presente estudo mostraram que o IPI foi o único fator clínico-demográfico preditivo de maneira independente na análise multivariada da SG ( $p=0,014$ ) e apresentou uma tendência para a SLP ( $p=0,108$ ) (Tabela 4).

Com relação às frequências de expressão das proteínas envolvidas na resistência a apoptose XIAP, survivina, p53 e Bcl-2 e da proteína relacionada à proliferação celular, ki-67, o presente estudo detectou positividade em 31,6%, 21%, 20,8%, 12,5% e 58,8% dos 76 casos de LDGCB arrolados, respectivamente (Tabela 5). A frequência de expressão de XIAP nos LDGCB analisados (31,6%) foi semelhante à reportada em estudo anteriormente publicado que observou a frequência de expressão das IAPs XIAP, c-IAP1 e c-IAP2 (26%, 90%, 37%, respectivamente) em 38 casos de LDGCB (Akyurek *et al.*, 2006). No entanto, outro estudo analisou 73 casos e observou frequência de expressão de XIAP de 67% (Muris *et al.*, 2005). Em contrapartida, a frequência de expressão de survivina observada nos LDGCB (21%) foi menor do que a reportada na literatura (60-82%) em estudos cujos números de tumores avaliados variaram de 27 a 222 (Adida *et al.*, 2000; Kuttler *et al.*, 2002; Watanuki-Miyauchi *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007).

A frequência de expressão de p53 nos LDGCB (20,8%) está de acordo com o reportado em artigos que reportaram frequências de 13% a 38%, tendo analisado de 55 a 372 casos de LDGCB (Kramer *et al.*, 1996; Sanchez *et al.*, 1998; Llanos *et al.*, 2001; Sohn *et al.*,

2003; Maartense *et al.*, 2004). A expressão de Bcl-2 observada nos LDGCB de nossa casuística (12,5%) foi menor do que o encontrado na literatura, variando de 26,4% a 61% em estudos que analisaram de 55 a 372 casos (Kramer *et al.*, 1996; Sanchez *et al.*, 1998; Llanos *et al.*, 2001; Sohn *et al.*, 2003; Maartense *et al.*, 2004). Com relação à expressão de ki-67, a frequência observada no presente estudo (58,8%) foi intermediária à observada em estudos anteriores, cuja variação foi ampla (18-100%) e que analisaram de 55 a 405 casos de LDGCB (Grogan *et al.*, 1988; Sanchez *et al.*, 1998; Llanos *et al.*, 2001; Jerkeman *et al.*, 2004).

Por outro lado, um importante fator limitante na comparação da frequência de positividade para as proteínas analisadas entre estudos é a variação do ponto de corte definido como discriminador entre a negatividade e a positividade. Normalmente, utiliza-se uma determinada fração de células tumorais positivas como ponto de corte. No entanto, esta fração varia de acordo com o desenho experimental de cada estudo, podendo variar desde a presença de apenas algumas células positivas em toda a extensão do tumor até frações maiores do que 50% das células tumorais imunomarcadas. Estas diferenças são frequentemente observadas nos estudos envolvendo a detecção da proteína ki-67, em que são estabelecidos pontos de corte para positividade de 10 a 25% e para determinação de alta expressão de 20 a 60% das células tumorais positivas (Grogan *et al.*, 1988; Sanchez *et al.*, 1998; Saez *et al.*, 1999; Llanos *et al.*, 2001; Spyrtos *et al.*, 2002; Jerkeman *et al.*, 2004), mas também são observadas em estudos da expressão de p53, (ponto de corte/determinação de alta expressão de 1 a 75%) (Sanchez *et al.*, 1998; Llanos *et al.*, 2001; Jerkeman *et al.*, 2004) e Bcl-2 (ponto de corte/determinação de alta expressão de 1 a 50%) (Sanchez *et al.*, 1998; Llanos *et al.*, 2001; Sohn *et al.*, 2003; Jerkeman *et al.*, 2004). Além disso, há estudos que consideram, além da porcentagem de células tumorais positivas, a intensidade da imunomarcção de determinada proteína na célula tumoral como parâmetro classificador (Llanos *et al.*, 2001), o que torna ainda mais heterogênea e complexa a comparação.

Para a expressão de XIAP e survivina, existe ainda outra variável a ser considerada: a compartimentalização dessas proteínas. Tanto a XIAP quanto a survivina são frequentemente associadas à localização citoplasmática em função da sua atividade sabidamente antiapoptótica. No entanto, atualmente já se sabe que elas também podem se localizar no núcleo das células, onde sua função ainda é pouco compreendida, embora a survivina venha sendo relacionada à segregação dos cromossomos e à progressão da mitose (Nowak *et al.*, 2004; Zaffaroni *et al.*, 2005; Pennati *et al.*, 2007; Stauber *et al.*, 2007; Pennati *et al.*, 2008).

Embora a expressão de survivina já tenha sido detectada no núcleo de células de LDGCB (Watanuki-Miyauchi *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007), de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, a expressão de survivina foi detectada quase sempre no citoplasma (Figura 11b), o que condiz com um dos trabalhos que investigou este assunto (Adida *et al.*, 2000), sugerindo favorecimento de sua função anti-apoptótica, frente a sua função no ciclo celular (Li *et al.*, 1998; Zaffaroni *et al.*, 2005; Vader *et al.*, 2006; Pennati *et al.*, 2007; Stauber *et al.*, 2007; Mita *et al.*, 2008; Pennati *et al.*, 2008). Em oposição, a expressão de XIAP foi detectada quase sempre no núcleo (Figura 11a), em contraste com o único estudo em células de LDGCB que também analisou este aspecto, em que se observou localização citoplasmática de XIAP nos casos de LDGCB analisados (Muris *et al.*, 2005). Por outro lado, o conflito com os resultados dos demais estudos apontam para a necessidade de se analisar mais detalhadamente a questão da localização celular da survivina e da XIAP nos LDGCB.

Além disso, a observação de que a positividade para XIAP foi frequentemente detectada nos centroblastos, em comparação com os imunoblastos, mesmo os presentes no mesmo tipo de tumor (Figura 11a), ressalta a diferença entre as características biológicas desses dois tipos celulares, o que possivelmente tem implicações na patogênese do tumor. Estes dados também reforçam a importância do desenvolvimento de mais estudos que



contribuam para o esclarecimento dos mecanismos de compartimentalização e da função nuclear da XIAP (Nowak *et al.*, 2004) para uma melhor compreensão de seu papel na biologia dos LDGCB.

Uma observação importante é a de que a frequência observada da expressão das proteínas detectadas no núcleo (p53=20,8% e ki-67=58,8%) se assemelha com a relatada na literatura (13-38% e 18-100%, respectivamente) (Grogan *et al.*, 1988; Kramer *et al.*, 1996; Sanchez *et al.*, 1998; Llanos *et al.*, 2001; Sohn *et al.*, 2003; Jerkeman *et al.*, 2004; Maartense *et al.*, 2004) enquanto a das detectadas no citoplasma (survivina=21% e Bcl-2=12,5%) foi menor do que a observada em outros estudos (60-82% e 26,4-61%, respectivamente) (Kramer *et al.*, 1996; Sanchez *et al.*, 1998; Adida *et al.*, 2000; Llanos *et al.*, 2001; Kuttler *et al.*, 2002; Sohn *et al.*, 2003; Maartense *et al.*, 2004; Watanuki-Miyauchi *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007). Neste contexto cabem algumas considerações: um ponto importante com relação à avaliação da expressão protéica por imunohistoquímica é a subjetividade deste tipo de análise, especialmente para antígenos citoplasmáticos. Mesmo no caso de antígenos nucleares é comum a ocorrência de quantificações diferentes entre avaliadores diferentes em termos de porcentagem de células imunomarcadas. Isso acontece porque a quantificação é feita subjetivamente através da avaliação da quantidade de células de interesse imunomarcadas em relação à quantidade total das células de interesse presentes em pelo menos dez campos em aumento de 40 vezes devido à inviabilidade executiva das células positivas e negativas serem literalmente contadas. Por outro lado, este viés é extremamente reduzido quando as mesmas amostras são avaliadas de maneira independente por dois observadores treinados, fornecendo uma avaliação mais precisa e segura. Assim, antígenos nucleares se tornam mais fáceis de avaliar e portanto ficam sujeitos a variações menores entre os diferentes grupos. De fato, este foi o observado com relação à frequência de positividade para p53 e ki-67 em nosso estudo com relação à literatura.

No tocante a frequência de expressão de XIAP, embora a observada em nosso estudo seja compatível com a de Akyurek e col (2006) não é possível estabelecer esta avaliação uma vez que no trabalho mencionado a localização celular da XIAP não foi informada. Além disso, o único outro estudo que avaliou a frequência de expressão de XIAP em LDGCB relatou localização citoplasmática desta proteína (Muris *et al.*, 2005), o que pode ter ocorrido devido a detalhes técnicos discutidos a seguir.

No caso de antígenos citoplasmáticos (ou mesmo de antígenos de localização celular desconhecida), a detecção da positividade se torna ainda mais complexa. Variações na execução da técnica que alterem o acesso do anticorpo aos compartimentos celulares e/ou o bloqueio dos antígenos inespecíficos (como nas etapas de permeabilização, recuperação antigênica, bloqueios e lavagens) podem favorecer a adsorção do anticorpo a face externa da membrana celular. Embora este fenômeno possa ocorrer independentemente da localização celular do antígeno-alvo, os LDGCB possuem o tamanho do núcleo bastante avantajado em relação ao tamanho do citoplasma, o que favorece a avaliação do núcleo, mas dificulta a visualização do citoplasma. E, finalmente, como a imunomarcação é realizada em cortes histológicos do tecido, as células de interesse muitas vezes estão agrupadas de tal forma que é difícil discriminar seus citoplasmas. Ou seja, a adsorção do anticorpo a membrana pode, especialmente no caso dos LDGCB, ser erroneamente avaliada como positividade citoplasmática. Sendo assim, além de estar sujeita a avaliações diferentes por dois observadores independentes como a avaliação de antígenos nucleares, a avaliação e a quantificação da expressão de antígenos citoplasmáticos, são ainda mais complexas devido ao procedimento técnico da imunomarcação tecidual e isto pode levar a não concordância entre resultados obtidos por diferentes grupos, como ocorrido com a frequência de expressão de survivina e Bcl-2 no presente estudo. Assim, embora seja mundialmente aceita e utilizada como parâmetro diagnóstico e prognóstico de diversos tipos de tumor (Harris *et al.*, 1999;

Jaffe *et al.*, 2001), graças a seu baixo custo e rapidez de execução, a imunohistoquímica requer avaliação extremamente atenta, cautelosa e reprodutível dos seus resultados pois pode gerar dados discrepantes e por isso não só é importante como também necessário que diferentes grupos validem os resultados inicialmente obtidos por outros através da utilização da mesma metodologia.

Com relação à co-expressão dessas proteínas, sabe-se que a atividade das proteínas Bcl-2, XIAP e survivina, embora através de mecanismos e alvos diferentes, está associada a uma resposta celular comum, a inibição da apoptose (Antonsson e Martinou, 2000; Elmore, 2007; Srinivasula e Ashwell, 2008), o que pode levar à expressão dessas proteínas ocorrer de forma concomitante, mediante estímulo apopótico. Além disso, a atividade normal da p53 implica na repressão dos genes da Bcl-2 e da survivina (Hoffman *et al.*, 2002; Mirza *et al.*, 2002; Vousden e Lane, 2007; Meulmeester e Jochemsen, 2008; Riley *et al.*, 2008). Sendo assim, mutações inativadoras na p53 poderiam resultar na liberação da expressão de Bcl-2 e survivina e, assim, na sua expressão concomitante à p53 estabilizada. No entanto, no presente estudo não foi observada co-expressão de nenhuma das proteínas analisadas (Tabela 7), indicando que outros fatores podem estar envolvidos na regulação da expressão e atividade dessas proteínas.

No tocante ao impacto prognóstico da expressão dessas proteínas nos LDGCB alguns estudos mostraram que a detecção imunohistoquímica da IAP survivina parece ter valor negativo para a resposta ao tratamento dos LDGCB, embora a expressão de survivina tenha sido detectada no núcleo em um dos estudos e no citoplasma no outro (Adida *et al.*, 2000; Watanuki-Miyauchi *et al.*, 2005). Em uma série de 222 pacientes, a taxa de SG dos pacientes que apresentaram expressão citoplasmática da survivina no tumor foi significativamente menor do que os que não apresentaram (40% x 54%  $p=0,02$ ) (Adida *et al.*, 2000). Em outro estudo englobando 60 pacientes, a taxa de SG dos pacientes que apresentaram expressão

nuclear da survivina no tumor foi significativamente menor do que os que não apresentaram (40% x 50%  $p=0,01$ ) (Watanuki-Miyauchi *et al.*, 2005). Nestes estudos, o período total de acompanhamento clínico dos pacientes foi de 10 a 11 anos.

Com relação à XIAP, o único estudo relacionado ao assunto analisou 73 casos de LDGCB e relacionou sua expressão à inibição da via apoptótica ativada por caspase-9, que foi preditiva de uma menor SG em cinco anos (Muris *et al.*, 2005). No entanto, de acordo com os resultados obtidos em nosso estudo, a expressão de XIAP e de survivina nos 58 LDGCB centrolblásticos analisados não se correlacionou com a SLP ( $p=0,923$  e  $p=0,362$ , respectivamente) e com a SG ( $p=0,689$  e  $p=0,173$ , respectivamente) em um período de acompanhamento de oito anos (um período considerado longo frente às dificuldades práticas de seguimento dos pacientes) (Tabelas 8 e 9 e Figuras 13 e 14).

Embora outros grupos (Muris *et al.*, 2005; Akyurek *et al.*, 2006) tenham empregado pontos de corte de 50% de células tumorais imunomarcadas para considerar o tumor positivo para XIAP, no presente estudo apenas 2 casos apresentaram positividade em  $\geq 50\%$  células tumorais (Tabela 10), inviabilizando a análise estatística. Contudo, para minimizar o viés do ponto de corte, os casos foram re-analisados utilizando o ponto de corte de  $\geq 20\%$  para XIAP. Novamente, a expressão de XIAP não foi capaz de prever a resposta ao tratamento nem quando polarizados os pacientes em positivos e negativos para o ponto de corte de  $\geq 20\%$  (Figura 18), nem quando estratificados em negativos, grupo 1 (5-20%) e grupo 2 ( $\geq 20\%$ ) (Figura 19).

Para a survivina, foram utilizados pontos de corte de  $\geq 30\%$  (Watanuki-Miyauchi *et al.*, 2005) e  $\geq 70\%$  (Adida *et al.*, 2000). Não obstante, em nossa amostragem, devido ao pequeno número de casos positivos para  $\geq 5\%$  ( $n=14$ ) e à heterogeneidade de porcentagens de células tumorais positivas entre os casos, não foi possível aumentar o ponto de corte ou estratificar o grupo para análise estatística. Em contrapartida, como os estudos mencionados não

discriminaram morfológicamente os LDGCB, é possível que a presença de casos do subtipo imunoblástico, que sabidamente apresentam uma pior resposta ao tratamento, tenha influenciado o resultado do conjunto dos LDGCB analisados. De fato, os estudos que analisaram o impacto da expressão de survivina na SG dos pacientes com LDGCB não fizeram análise multivariada para confirmar se seu valor preditivo era independente de outras características (Watanuki-Miyauchi *et al.*, 2005) ou não incluíram a variável subtipo morfológico na análise (Adida *et al.*, 2000). Assim, através da utilização da análise multivariada, nossos resultados indicam que a expressão de XIAP e survivina não tem impacto no prognóstico de pacientes com LDGCB do subtipo centrobástico.

Tendo em vista a grande versatilidade do papel da proteína p53 e a convergência de todas as suas variadas funções para a supressão de tumores, foi observado que nos LDGCB mutações no gene da p53 estão presentes em aproximadamente 21% dos casos e conferem um pior prognóstico (Young *et al.*, 2008). Além disso, falhas nos mecanismos regulatórios da p53, devidas a mutação na p53 ou a outras alterações estabilizadoras, permitem que ela se torne estável, o que torna possível sua detecção por imunohistoquímica (Piris *et al.*, 1995). Em LNH, sua expressão, concomitante ou não a de Bcl-2, parece ser indicativa de pior prognóstico em termos de sobrevida em cinco anos (Piris *et al.*, 1995).

Em estudo anterior do nosso grupo, a expressão das proteínas p53 e Bcl-2 foram analisadas por imunohistoquímica em um total de 116 casos de LNH de alto grau de malignidade, dentre os quais uma série de amostras de LDGCB foi incluída. O referido estudo obteve como resultado que a expressão de p53 e de Bcl-2 não foi preditiva na resposta ao protocolo de tratamento baseado em antraciclina, tendo como parâmetros as taxas de SLP ( $p=0,2$ ) e a SG ( $p=0,7$ ) desses pacientes (Maia *et al.*, 1998). Embora nos LDGCB já tenha sido reportada validade prognóstica da expressão de p53 e Bcl-2 (Barrans *et al.*, 2003; Jerkeman *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2008), como o nosso estudo agrupou pacientes com

diversos tipos de LNH, heterogêneos em termos moleculares e de resposta ao tratamento, este resultado indica que o impacto prognóstico da expressão dessas proteínas em cada uma dessas doenças é diferente e pode não ter refletido o impacto real nos LDGCB.

Para tentar elucidar essa questão, adicionamos à avaliação das implicações clínicas da expressão de XIAP e de survivina nas células tumorais a releitura dos dados de p53 e de Bcl-2 da mesma série de 80 casos de LDGCB analisada retrospectivamente. No estudo atual, apenas os 58 pacientes com LDGCB centrobástico tratados com o protocolo CHOP foram selecionados dentre os 116 pacientes com LNH de alto grau analisados anteriormente para a expressão de p53 e Bcl-2.

De maneira semelhante aos resultados obtidos quanto ao impacto da expressão de survivina e XIAP na resposta ao tratamento nos LDGCB centrobásticos, foi observado que a expressão de p53 e Bcl-2 não se correlacionou com a SLP ( $p=0,647$  e  $p=0,513$ , respectivamente) e com a SG ( $p=0,504$  e  $p=0,322$ , respectivamente) em oito anos de segmento dos pacientes (Figuras 15 e 16). Neste caso, cabe a consideração de que o pequeno número de casos positivos para a expressão de p53 e Bcl-2 nos LDGCB centrobásticos ( $n=11$  e  $n=7$ , respectivamente) (Tabela 6) pode ter sido responsável pelos erros padrão subideais obtidos nestes grupos quando confrontados com a SLP (14,6% e 18,7%, respectivamente) (Tabela 8) e com a SG (17,2% e 17,1%, respectivamente) (Tabela 9), além de ter inviabilizado a análise com outros pontos de corte. Por outro lado, existem, de fato, na literatura estudos que não observaram correlação da expressão de p53 e Bcl-2 com a resposta ao tratamento dos LDGCB (Kramer *et al.*, 1996; Llanos *et al.*, 2001; Sohn *et al.*, 2003). Assim, é possível que as considerações feitas para o impacto da expressão de XIAP e survivina na resposta ao tratamento dos LDGCB também sejam pertinentes ao impacto da expressão de p53 e Bcl-2. Novamente, os estudos que analisaram o valor preditivo da expressão de p53 e Bcl-2 nos LDGCB foram vagos quanto ao subtipo morfológico dos

LDGCB em suas análises (Sohn *et al.*, 2003; Jerkeman *et al.*, 2004; Muris *et al.*, 2005). Sendo assim, é possível que os componentes centroblastico e imunoblastico dos LDGCB estivessem presentes em frequências variadas entre os estudos que observaram correlação da expressão de p53 e Bcl-2 com a resposta ao tratamento e os em que a expressão dessas proteínas não foi preditiva, resultando nas observações controversas. Dentro desta perspectiva, nossos dados indicam que a expressão de p53 e Bcl-2 não tem impacto na resposta ao tratamento dos LDGCB centroblasticos.

No tocante à proteína ki-67, sua detecção parece estar fortemente associada ao engajamento no ciclo celular e, além de sua utilização como ferramenta para determinar a fração de células em proliferação em uma população, sua expressão também já foi relacionada à resposta ao tratamento nos LDGCB (Grogan *et al.*, 1988; Jerkeman *et al.*, 2004), embora existam resultados controversos (Saez *et al.*, 1999; Llanos *et al.*, 2001; Seki *et al.*, 2003; Hasselblom *et al.*, 2008). No presente estudo, a expressão de ki-67 não se correlacionou com a SLP ( $p=0,920$ ) (Tabela 8) e com a SG ( $p=0,993$ ) (Tabela 9) dos 58 pacientes com LDGCB centroblasticos analisados (Figura 17), tendo o acompanhamento dos pacientes sido realizado por um período semelhante ao dos estudos supracitados.

Quando considerados outros pontos de corte empregados na literatura (Tabela 11) (Grogan *et al.*, 1988; Spyrtos *et al.*, 2002; Jerkeman *et al.*, 2004), nem a polarização em 20%, nem a polarização em 60%, nem a estratificação dos pacientes em três grupos com base nessas porcentagens de células imunomarcadas para ki-67 foram preditivos da SLP e da SG (Figuras 20 a 22). Além disso, assim como os estudos envolvendo as proteínas relacionadas à resistência à apoptose, os estudos que observaram impacto da expressão de ki-67 na resposta ao tratamento (Grogan *et al.*, 1988; Jerkeman *et al.*, 2004; Hasselblom *et al.*, 2008), não continham o fator subtipo morfológico nas análises multivariadas. Desta forma, também no caso da proteína envolvida na proliferação celular, é possível que o subtipo morfológico possa

ter contribuído para as controvérsias observadas com relação ao impacto da expressão de ki-67 em relação aos demais estudos (Saez *et al.*, 1999; Llanos *et al.*, 2001; Seki *et al.*, 2003).

Em resumo, a análise do impacto da expressão das proteínas XIAP, survivina, p53, Bcl-2 e ki-67 na SLP e na SG na série de LDGCB do subtipo centrolástico estudada apresentou resultados discordantes da literatura existente sobre os LDGCB como grupo, reforçando o conceito de que seus subtipos constituem entidades diferentes em termos de patogênese, alterações moleculares e de resposta ao tratamento (Volpe *et al.*, 1996; Hoffman *et al.*, 2005), indicando portanto que devem ser investigados independentemente. Isto porque os subtipos de LDGCB compartilham o fato de serem originados de linfócitos B, mas se diferenciam em termos dos diferentes estágios de maturação em que a célula B pode se encontrar ao sofrer a transformação maligna (Figura 30), o que vai conferir ao linfoma características e funcionalidades biológicas próprias do estado fisiológico em que o clone que o originou se encontrava quando se transformou. Dentre estas características, destaca-se o fato de que os centrolastos normais apresentam ativação de vias de proliferação, como a de NFkB, mas se mantêm sensíveis aos estímulos de morte, enquanto os imunoblastos, embora não proliferem tanto quanto os centrolastos, apresentam superexpressão de proteínas de resistência a apoptose, como Bcl-2 (Guzman-Rojas *et al.*, 2002; De Leval e Harris, 2003; Hoffman *et al.*, 2005; Klein e Dalla-Favera, 2008). No contexto da transformação maligna, a manutenção dessas características tem como consequência importante uma melhor resposta ao tratamento dos LDGCB centrolásticos do que os LDGCB imunoblásticos, possivelmente devido a essas características fisiológicas que resguardadas pelas células malignas se transformam em resistência ao tratamento no caso do subtipo imunoblástico. Outro achado relevante é que as diferenças entre os centrolastos e os imunoblastos ajudam a explicar a heterogeneidade em termos de apresentação e curso da doença do conjunto dos LDGCB observada na prática médica (Jaffe *et al.*, 2001) e devendo estas características serem



consideradas nos estudos de pesquisa básica e translacional. Corroborando com estas observações, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que os LDGCB centrolásticos apresentam características biológicas que os diferenciam dos LDGCB como um todo e reforçam a necessidade de se discriminar seus subtipos, considerando-os como grupos distintos, na pesquisa biomédica.

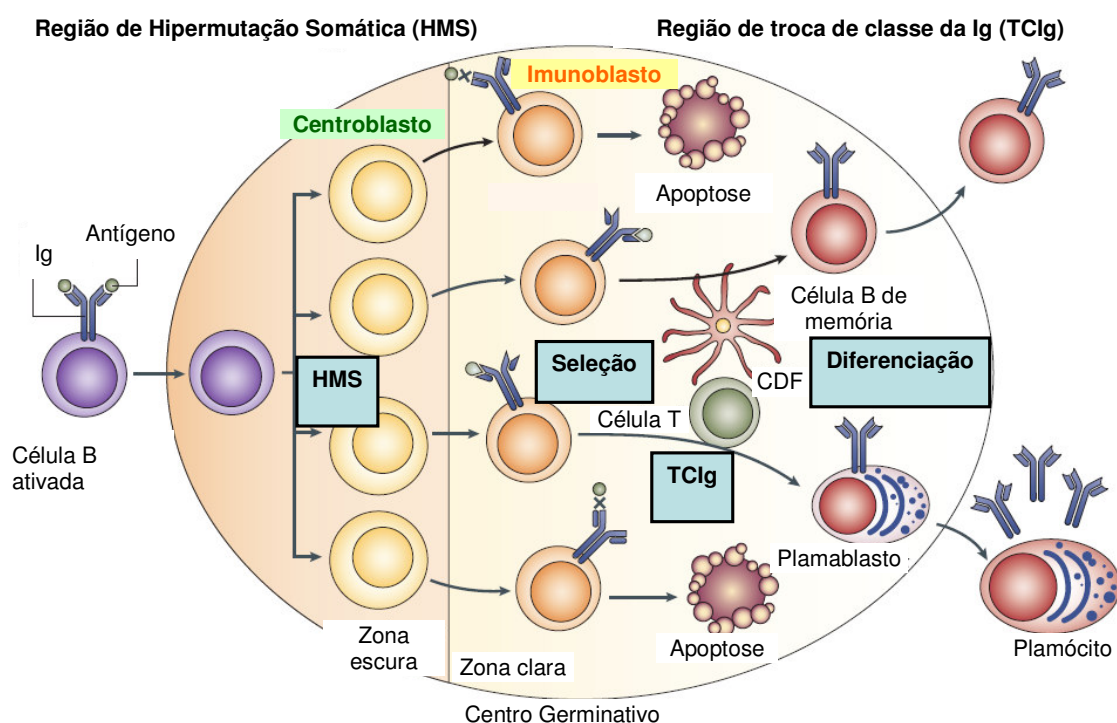


Figura 30: Representação esquemática do linfonodo durante a formação e maturação do centro germinativo, com destaque para as diferenças entre os microambientes pelos quais o linfócito passa durante sua maturação como centrolástico e imunoblasto. Adaptado de Klein e Dalla-Favera, 2008.

Concluindo, uma fração dos casos analisados de LDGCB é positiva para as proteínas XIAP, survivina, p53, Bcl-2 e ki-67. Embora tenha sido reportado que a expressão de p53, Bcl-2, XIAP, survivina e ki-67, de forma isolada, tem impacto prognóstico negativo na SG (Grogan *et al.*, 1988; Adida *et al.*, 2000; Barrans *et al.*, 2003; Jerkeman *et al.*, 2004; Muris *et al.*, 2005; Bai *et al.*, 2007; Hasselblom *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2008), o mesmo resultado

não foi observado em nosso estudo, onde apenas o subtipo morfológico centrolástico foi avaliado. Estes resultados sugerem que as diferenças biológicas apresentadas pelos linfócitos B no estágio de maturação em que se encontram ao sofrerem a transformação maligna possam não só ser responsáveis pela heterogeneidade observada entre os LDGCB como, além disso, tornar necessário que os diferentes subtipos de LDGCB passem a ser tratados como doenças distintas dos pontos de vista biológico e clínico.

## 6 CONCLUSÃO

A análise do impacto da expressão das proteínas XIAP, survivina, p53, Bcl-2 e ki-67 na SLP e na SG de uma série de LDGCB do subtipo centroblástico apresentou resultados discordantes da literatura existente sobre os LDGCB como grupo, reforçando o conceito de que seus subtipos constituem entidades diferentes em termos moleculares e de resposta ao tratamento, sobretudo porque são originados de tipos celulares distintos e, portanto, devem ser investigados independentemente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adida, C., Haioun, C., Gaulard, P., *et al.* **Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas.** *Blood*, v.96, n.5, p.1921-5. Sep 1, 2000.
- Akyurek, N., Ren, Y., Rassidakis, G.Z., *et al.* **Expression of inhibitor of apoptosis proteins in B-cell non-Hodgkin and Hodgkin lymphomas.** *Cancer*, v.107, n.8, p.1844-51. Oct 15, 2006.
- Ameisen, J.C. **On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years.** *Cell Death Differ*, v.9, n.4, p.367-93. Apr, 2002.
- Ansell, S.M., Arendt, B.K., Grote, D.M., *et al.* **Inhibition of survivin expression suppresses the growth of aggressive non-Hodgkin's lymphoma.** *Leukemia*, v.18, n.3, p.616-23. Mar, 2004.
- Ansell, S.M. e Armitage, J. **Non-Hodgkin lymphoma: diagnosis and treatment.** *Mayo Clin Proc*, v.80, n.8, p.1087-97. Aug, 2005.
- Antonsson, B. e Martinou, J.C. **The Bcl-2 protein family.** *Exp Cell Res*, v.256, n.1, p.50-7. Apr 10, 2000.
- Baars, J.W., De Jong, D., Willemse, E.M., *et al.* **Diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphomas: the clinical relevance of histological subclassification.** *Br J Cancer*, v.79, n.11-12, p.1770-6. Apr, 1999.
- Bai, M., Skyras, A., Agnantis, N.J., *et al.* **B-cell differentiation, apoptosis and proliferation in diffuse large B-cell lymphomas.** *Anticancer Res*, v.25, n.1A, p.347-62. Jan-Feb, 2005.
- Bai, M., Tsanou, E., Skyras, A., *et al.* **Alterations of the p53, Rb and p27 tumor suppressor pathways in diffuse large B-cell lymphomas.** *Anticancer Res*, v.27, n.4B, p.2345-52. Jul-Aug, 2007.
- Barrans, S.L., Evans, P.A., O'connor, S.J., *et al.* **The t(14;18) is associated with germinal center-derived diffuse large B-cell lymphoma and is a strong predictor of outcome.** *Clin Cancer Res*, v.9, n.6, p.2133-9. Jun, 2003.
- Bensaad, K. e Vousden, K.H. **p53: new roles in metabolism.** *Trends Cell Biol*, v.17, n.6, p.286-91. Jun, 2007.
- Crook, N.E., Clem, R.J. e Miller, L.K. **An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif.** *J Virol*, v.67, n.4, p.2168-74. Apr, 1993.
- Datta, R., Oki, E., Endo, K., *et al.* **XIAP regulates DNA damage-induced apoptosis downstream of caspase-9 cleavage.** *J Biol Chem*, v.275, n.41, p.31733-8. Oct 13, 2000.
- De Leval, L. e Harris, N.L. **Variability in immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its clinical relevance.** *Histopathology*, v.43, n.6, p.509-28. Dec, 2003.

Deveraux, Q.L., Roy, N., Stennicke, H.R., *et al.* **IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases.** EMBO J, v.17, n.8, p.2215-23. Apr 15, 1998.

Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., *et al.* **X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases.** Nature, v.388, n.6639, p.300-4. Jul 17, 1997.

Diebold, J., Anderson, J.R., Armitage, J.O., *et al.* **Diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic analysis of 444 cases classified according to the updated Kiel classification.** Leuk Lymphoma, v.43, n.1, p.97-104. Jan, 2002.

Dohi, T., Okada, K., Xia, F., *et al.* **An IAP-IAP complex inhibits apoptosis.** J Biol Chem, v.279, n.33, p.34087-90. Aug 13, 2004.

Duchrow, M., Schluter, C., Wohlenberg, C., *et al.* **Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67.** Cell Prolif, v.29, n.1, p.1-12. Jan, 1996.

Dunn-Walters, D., Thiede, C., Alpen, B., *et al.* **Somatic hypermutation and B-cell lymphoma.** Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, v.356, n.1405, p.73-82. Jan 29, 2001.

Efeyan, A. e Serrano, M. **p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes.** Cell Cycle, v.6, n.9, p.1006-10. May 2, 2007.

Eliyahu, D., Michalovitz, D., Eliyahu, S., *et al.* **Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.86, n.22, p.8763-7. Nov, 1989.

Elmore, S. **Apoptosis: a review of programmed cell death.** Toxicol Pathol, v.35, n.4, p.495-516, 2007.

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., *et al.* **A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD.** Nature, v.391, n.6662, p.43-50. Jan 1, 1998.

Endl, E. e Gerdes, J. **The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function.** Exp Cell Res, v.257, n.2, p.231-7. Jun 15, 2000.

Engelhard, M., Brittinger, G., Huhn, D., *et al.* **Subclassification of diffuse large B-cell lymphomas according to the Kiel classification: distinction of centroblastic and immunoblastic lymphomas is a significant prognostic risk factor.** Blood, v.89, n.7, p.2291-7. Apr 1, 1997.

Finlay, C.A., Hinds, P.W. e Levine, A.J. **The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation.** Cell, v.57, n.7, p.1083-93. Jun 30, 1989.

Galluzzi, L., Maiuri, M.C., Vitale, I., *et al.* **Cell death modalities: classification and pathophysiological implications.** Cell Death Differ, v.14, n.7, p.1237-43. Jul, 2007.

- Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., *et al.* **Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67.** J Immunol, v.133, n.4, p.1710-5. Oct, 1984.
- Gerdes, J., Li, L., Schlueter, C., *et al.* **Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67.** Am J Pathol, v.138, n.4, p.867-73. Apr, 1991.
- Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H., *et al.* **Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation.** Int J Cancer, v.31, n.1, p.13-20. Jan 15, 1983.
- Grogan, T.M., Lippman, S.M., Spier, C.M., *et al.* **Independent prognostic significance of a nuclear proliferation antigen in diffuse large cell lymphomas as determined by the monoclonal antibody Ki-67.** Blood, v.71, n.4, p.1157-60. Apr, 1988.
- Gross, A., McDonnell, J.M. e Korsmeyer, S.J. **BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis.** Genes Dev, v.13, n.15, p.1899-911. Aug 1, 1999.
- Guzman-Rojas, L., Sims-Mourtada, J.C., Rangel, R., *et al.* **Life and death within germinal centres: a double-edged sword.** Immunology, v.107, n.2, p.167-75. Oct, 2002.
- Harris, N.L., Jaffe, E.S., Diebold, J., *et al.* **The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997.** Ann Oncol, v.10, n.12, p.1419-32. Dec, 1999.
- Hasselblom, S., Ridell, B., Sigurdardottir, M., *et al.* **Low rather than high Ki-67 protein expression is an adverse prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma.** Leuk Lymphoma, v.49, n.8, p.1501-9. Aug, 2008.
- Hengartner, M.O. **The biochemistry of apoptosis.** Nature, v.407, n.6805, p.770-6. Oct 12, 2000.
- Hennessy, B.T., Hanrahan, E.O. e Daly, P.A. **Non-Hodgkin lymphoma: an update.** Lancet Oncol, v.5, n.6, p.341-53. Jun, 2004.
- Hoffman, R., Benz, E.J., Jr., Shattil, S.J., *et al.*, Eds. **Hematology : basic principles and practice.** Philadelphia, Pa.: Churchill Livingstone, p.xxix, 2821 p., 4th ed. 2005.
- Hoffman, W.H., Biade, S., Zilfou, J.T., *et al.* **Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53.** J Biol Chem, v.277, n.5, p.3247-57. Feb 1, 2002.
- Hofmann, K. e Bucher, P. **The FHA domain: a putative nuclear signalling domain found in protein kinases and transcription factors.** Trends Biochem Sci, v.20, n.9, p.347-9. Sep, 1995.
- Jaffe, E.S., Harris, N.L., Stein, H., *et al.* **Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues.** Lyon ; Washington, D.C.: IARC Press, v.3. 2001. 351 p. p. (World Health Organization classification of tumors)

- Jerkeman, M., Anderson, H., Dictor, M., *et al.* **Assessment of biological prognostic factors provides clinically relevant information in patients with diffuse large B-cell lymphoma--a Nordic Lymphoma Group study.** *Ann Hematol*, v.83, n.7, p.414-9. Jul, 2004.
- Kausch, I., Lingnau, A., Endl, E., *et al.* **Antisense treatment against Ki-67 mRNA inhibits proliferation and tumor growth in vitro and in vivo.** *Int J Cancer*, v.105, n.5, p.710-6. Jul 10, 2003.
- Klein, U. e Dalla-Favera, R. **Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy.** *Nat Rev Immunol*, v.8, n.1, p.22-33. Jan, 2008.
- Klener, P., Jr., Andera, L., Klener, P., *et al.* **Cell death signalling pathways in the pathogenesis and therapy of haematologic malignancies: overview of therapeutic approaches.** *Folia Biol (Praha)*, v.52, n.4, p.119-36, 2006.
- Kramer, M.H., Hermans, J., Parker, J., *et al.* **Clinical significance of bcl2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study.** *J Clin Oncol*, v.14, n.7, p.2131-8. Jul, 1996.
- Kramer, M.H., Hermans, J., Wijburg, E., *et al.* **Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma.** *Blood*, v.92, n.9, p.3152-62. Nov 1, 1998.
- Kroemer, G., El-Deiry, W.S., Golstein, P., *et al.* **Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death.** *Cell Death Differ*, v.12 Suppl 2, p.1463-7. Nov, 2005.
- Kuo, M.T. **Roles of multidrug resistance genes in breast cancer chemoresistance.** *Adv Exp Med Biol*, v.608, p.23-30, 2007.
- Kuttler, F., Valnet-Rabier, M.B., Angonin, R., *et al.* **Relationship between expression of genes involved in cell cycle control and apoptosis in diffuse large B cell lymphoma: a preferential survivin-cyclin B link.** *Leukemia*, v.16, n.4, p.726-35. Apr, 2002.
- Lacasse, E.C., Mahoney, D.J., Cheung, H.H., *et al.* **IAP-targeted therapies for cancer.** *Oncogene*, v.27, n.48, p.6252-75. Oct 20, 2008.
- Lane, D.P. e Crawford, L.V. **T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells.** *Nature*, v.278, n.5701, p.261-3. Mar 15, 1979.
- Lens, S.M. e Medema, R.H. **The survivin/Aurora B complex: its role in coordinating tension and attachment.** *Cell Cycle*, v.2, n.6, p.507-10. Nov-Dec, 2003.
- Li, F., Ambrosini, G., Chu, E.Y., *et al.* **Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin.** *Nature*, v.396, n.6711, p.580-4. Dec 10, 1998.
- Linzer, D.I. e Levine, A.J. **Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells.** *Cell*, v.17, n.1, p.43-52. May, 1979.

- Liu, B., Chen, Y. e St Clair, D.K. **ROS and p53: a versatile partnership.** Free Radic Biol Med, v.44, n.8, p.1529-35. Apr 15, 2008.
- Liu, L., Zhang, M. e Zou, P. **Expression of PLK1 and survivin in diffuse large B-cell lymphoma.** Leuk Lymphoma, v.48, n.11, p.2179-83. Nov, 2007.
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., *et al.* **DFP, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis.** Cell, v.89, n.2, p.175-84. Apr 18, 1997.
- Llanos, M., Alvarez-Arguelles, H., Aleman, R., *et al.* **Prognostic significance of Ki-67 nuclear proliferative antigen, bcl-2 protein, and p53 expression in follicular and diffuse large B-cell lymphoma.** Med Oncol, v.18, n.1, p.15-22, 2001.
- Lossos, I.S. e Morgensztern, D. **Prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma.** J Clin Oncol, v.24, n.6, p.995-1007. Feb 20, 2006.
- Lu, M., Lin, S.C., Huang, Y., *et al.* **XIAP induces NF-kappaB activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization.** Mol Cell, v.26, n.5, p.689-702. Jun 8, 2007.
- Maartense, E., Kramer, M.H., Le Cessie, S., *et al.* **Lack of prognostic significance of BCL2 and p53 protein overexpression in elderly patients with diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma: results from a population-based non-Hodgkin's lymphoma registry.** Leuk Lymphoma, v.45, n.1, p.101-7. Jan, 2004.
- Maia, R.C., Mendes, G.Q., Magalhães, L., *et al.* **Immunohistochemical analysis of p53 and bcl-2 expression in high-grade non-Hodgkin Lymphomas: correlation with clinical outcome.** 17th International Cancer Congress Rio de Janeiro: Proceedings of the 17th International Cancer Congress: 1375-8 p. 1998.
- Martin, A.R., Weisenburger, D.D., Chan, W.C., *et al.* **Prognostic value of cellular proliferation and histologic grade in follicular lymphoma.** Blood, v.85, n.12, p.3671-8. Jun 15, 1995.
- Meulmeester, E. e Jochemsen, A.G. **p53: a guide to apoptosis.** Curr Cancer Drug Targets, v.8, n.2, p.87-97. Mar, 2008.
- Miller, T.P., Grogan, T.M., Dahlberg, S., *et al.* **Prognostic significance of the Ki-67-associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: a prospective Southwest Oncology Group trial.** Blood, v.83, n.6, p.1460-6. Mar 15, 1994.
- Mirza, A., Mcguirk, M., Hockenberry, T.N., *et al.* **Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway.** Oncogene, v.21, n.17, p.2613-22. Apr 18, 2002.
- Mita, A.C., Mita, M.M., Nawrocki, S.T., *et al.* **Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics.** Clin Cancer Res, v.14, n.16, p.5000-5. Aug 15, 2008.



Monni, O., Franssila, K., Joensuu, H., *et al.* **BCL2 overexpression in diffuse large B-cell lymphoma.** *Leuk Lymphoma*, v.34, n.1-2, p.45-52. Jun, 1999.

Monni, O., Joensuu, H., Franssila, K., *et al.* **BCL2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma.** *Blood*, v.90, n.3, p.1168-74. Aug 1, 1997.

Muris, J.J., Cillessen, S.A., Vos, W., *et al.* **Immunohistochemical profiling of caspase signaling pathways predicts clinical response to chemotherapy in primary nodal diffuse large B-cell lymphomas.** *Blood*, v.105, n.7, p.2916-23. Apr 1, 2005.

Nagata, S. **Apoptotic DNA fragmentation.** *Exp Cell Res*, v.256, n.1, p.12-8. Apr 10, 2000.

Ng, A.K. **Diffuse large B-cell lymphoma.** *Semin Radiat Oncol*, v.17, n.3, p.169-75. Jul, 2007.

Nigro, J.M., Baker, S.J., Preisinger, A.C., *et al.* **Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types.** *Nature*, v.342, n.6250, p.705-8. Dec 7, 1989.

Notarbartolo, M., Cervello, M., Dusonchet, L., *et al.* **Resistance to diverse apoptotic triggers in multidrug resistant HL60 cells and its possible relationship to the expression of P-glycoprotein, Fas and of the novel anti-apoptosis factors IAP (inhibitory of apoptosis proteins).** *Cancer Lett*, v.180, n.1, p.91-101. Jun 6, 2002.

Nowak, D., Boehrer, S., Brieger, A., *et al.* **Upon drug-induced apoptosis in lymphoma cells X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) translocates from the cytosol to the nucleus.** *Leuk Lymphoma*, v.45, n.7, p.1429-36. Jul, 2004.

O'connor, D.S., Grossman, D., Plescia, J., *et al.* **Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.97, n.24, p.13103-7. Nov 21, 2000.

Opferman, J.T. e Korsmeyer, S.J. **Apoptosis in the development and maintenance of the immune system.** *Nat Immunol*, v.4, n.5, p.410-5. May, 2003.

Park, C.S. e Choi, Y.S. **How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre?** *Immunology*, v.114, n.1, p.2-10. Jan, 2005.

Pennanen, H., Kuittinen, O., Soini, Y., *et al.* **Prognostic significance of p53 and matrix metalloproteinase-9 expression in follicular lymphoma.** *Eur J Haematol*, v.81, n.4, p.289-97. Oct, 2008.

Pennati, M., Folini, M. e Zaffaroni, N. **Targeting survivin in cancer therapy: fulfilled promises and open questions.** *Carcinogenesis*, v.28, n.6, p.1133-9. Jun, 2007.

Pennati, M., Folini, M. e Zaffaroni, N. **Targeting survivin in cancer therapy.** *Expert Opin Ther Targets*, v.12, n.4, p.463-76. Apr, 2008.

Phillips, K. e Luisi, B. **The virtuoso of versatility: POU proteins that flex to fit.** J Mol Biol, v.302, n.5, p.1023-39. Oct 6, 2000.

Pileri, S.A., Dirnhofer, S., Went, P., *et al.* **Diffuse large B-cell lymphoma: one or more entities? Present controversies and possible tools for its subclassification.** Histopathology, v.41, n.6, p.482-509. Dec, 2002.

Piris, M.A., Villuendas, R., Martinez, J.C., *et al.* **p53 expression in non-Hodgkin's lymphomas: a marker of p53 inactivation?** Leuk Lymphoma, v.17, n.1-2, p.35-42. Mar, 1995.

**A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project.** N Engl J Med, v.329, n.14, p.987-94. Sep 30, 1993.

Riley, T., Sontag, E., Chen, P., *et al.* **Transcriptional control of human p53-regulated genes.** Nat Rev Mol Cell Biol, v.9, n.5, p.402-12. May, 2008.

Rosenwald, A. e Ott, G. **Burkitt lymphoma versus diffuse large B-cell lymphoma.** Ann Oncol, v.19 Suppl 4, p.iv67-9. Jun, 2008.

Roy, N., Deveraux, Q.L., Takahashi, R., *et al.* **The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases.** EMBO J, v.16, n.23, p.6914-25. Dec 1, 1997.

Saez, A., Sanchez, E., Sanchez-Beato, M., *et al.* **p27KIP1 is abnormally expressed in Diffuse Large B-cell Lymphomas and is associated with an adverse clinical outcome.** Br J Cancer, v.80, n.9, p.1427-34. Jul, 1999.

Sakahira, H., Enari, M. e Nagata, S. **Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis.** Nature, v.391, n.6662, p.96-9. Jan 1, 1998.

Salar, A., Fernandez De Sevilla, A., Romagosa, V., *et al.* **Diffuse large B-cell lymphoma: is morphologic subdivision useful in clinical management?** Eur J Haematol, v.60, n.3, p.202-8. Mar, 1998.

Sanchez, E., Chacon, I., Plaza, M.M., *et al.* **Clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma is dependent on the relationship between different cell-cycle regulator proteins.** J Clin Oncol, v.16, n.5, p.1931-9. May, 1998.

Schluter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., *et al.* **The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins.** J Cell Biol, v.123, n.3, p.513-22. Nov, 1993.

Scholzen, T. e Gerdes, J. **The Ki-67 protein: from the known and the unknown.** J Cell Physiol, v.182, n.3, p.311-22. Mar, 2000.

Seki, R., Okamura, T., Koga, H., *et al.* **Prognostic significance of the F-box protein Skp2 expression in diffuse large B-cell lymphoma.** Am J Hematol, v.73, n.4, p.230-5. Aug, 2003.

Shin, S., Sung, B.J., Cho, Y.S., *et al.* **An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7.** *Biochemistry*, v.40, n.4, p.1117-23. Jan 30, 2001.

Shiozaki, E.N. e Shi, Y. **Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology.** *Trends Biochem Sci*, v.29, n.9, p.486-94. Sep, 2004.

Slee, E.A., Adrain, C. e Martin, S.J. **Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis.** *J Biol Chem*, v.276, n.10, p.7320-6. Mar 9, 2001.

Sohn, S.K., Jung, J.T., Kim, D.H., *et al.* **Prognostic significance of bcl-2, bax, and p53 expression in diffuse large B-cell lymphoma.** *Am J Hematol*, v.73, n.2, p.101-7. Jun, 2003.

Spyratos, F., Ferrero-Pous, M., Trassard, M., *et al.* **Correlation between MIB-1 and other proliferation markers: clinical implications of the MIB-1 cutoff value.** *Cancer*, v.94, n.8, p.2151-9. Apr 15, 2002.

Srinivasula, S.M. e Ashwell, J.D. **IAPs: what's in a name?** *Mol Cell*, v.30, n.2, p.123-35. Apr 25, 2008.

Srinivasula, S.M., Datta, P., Fan, X.J., *et al.* **Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway.** *J Biol Chem*, v.275, n.46, p.36152-7. Nov 17, 2000.

Staples, O.D., Steele, R.J. e Lain, S. **p53 as a therapeutic target.** *Surgeon*, v.6, n.4, p.240-3. Aug, 2008.

Starborg, M., Gell, K., Brundell, E., *et al.* **The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression.** *J Cell Sci*, v.109 ( Pt 1), p.143-53. Jan, 1996.

Stauber, R.H., Mann, W. e Knauer, S.K. **Nuclear and cytoplasmic survivin: molecular mechanism, prognostic, and therapeutic potential.** *Cancer Res*, v.67, n.13, p.5999-6002. Jul 1, 2007.

Tamm, I., Kornblau, S.M., Segall, H., *et al.* **Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias.** *Clin Cancer Res*, v.6, n.5, p.1796-803. May, 2000.

Vader, G., Kauw, J.J., Medema, R.H., *et al.* **Survivin mediates targeting of the chromosomal passenger complex to the centromere and midbody.** *EMBO Rep*, v.7, n.1, p.85-92. Jan, 2006.

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R. e Berneman, Z.N. **Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer.** *Ann Hematol*, v.84, n.10, p.627-39. Oct, 2005.

Vischioni, B., Van Der Valk, P., Span, S.W., *et al.* **Expression and localization of inhibitor of apoptosis proteins in normal human tissues.** *Hum Pathol*, v.37, n.1, p.78-86. Jan, 2006.

Volpe, G., Vitolo, U., Carbone, A., *et al.* **Molecular heterogeneity of B-lineage diffuse large cell lymphoma.** *Genes Chromosomes Cancer*, v.16, n.1, p.21-30. May, 1996.

Vousden, K.H. e Lane, D.P. **p53 in health and disease.** *Nat Rev Mol Cell Biol*, v.8, n.4, p.275-83. Apr, 2007.

Wang, R., Luo, D., Ma, X., *et al.* **Antisense Ki-67 cDNA transfection reverses the tumorigenicity and induces apoptosis in human breast cancer cells.** *Cancer Invest*, v.26, n.8, p.830-5. Oct, 2008.

Wang, Z., Fukuda, S. e Pelus, L.M. **Survivin regulates the p53 tumor suppressor gene family.** *Oncogene*, v.23, n.49, p.8146-53. Oct 21, 2004.

Watanuki-Miyauchi, R., Kojima, Y., Tsurumi, H., *et al.* **Expression of survivin and of antigen detected by a novel monoclonal antibody, T332, is associated with outcome of diffuse large B-cell lymphoma and its subtypes.** *Pathol Int*, v.55, n.6, p.324-30. Jun, 2005.

Wilson, W.H., Teruya-Feldstein, J., Fest, T., *et al.* **Relationship of p53, bcl-2, and tumor proliferation to clinical drug resistance in non-Hodgkin's lymphomas.** *Blood*, v.89, n.2, p.601-9. Jan 15, 1997.

Yang, L., Cao, Z., Yan, H., *et al.* **Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells: implication for cancer specific therapy.** *Cancer Res*, v.63, n.20, p.6815-24. Oct 15, 2003.

Young, K.H., Leroy, K., Moller, M.B., *et al.* **Structural profiles of TP53 gene mutations predict clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma: an international collaborative study.** *Blood*, v.112, n.8, p.3088-98. Oct 15, 2008.

Zaffaroni, N., Pennati, M. e Daidone, M.G. **Survivin as a target for new anticancer interventions.** *J Cell Mol Med*, v.9, n.2, p.360-72. Apr-Jun, 2005.

**ANEXO**

**FIGURA 18 EXPANDIDA**

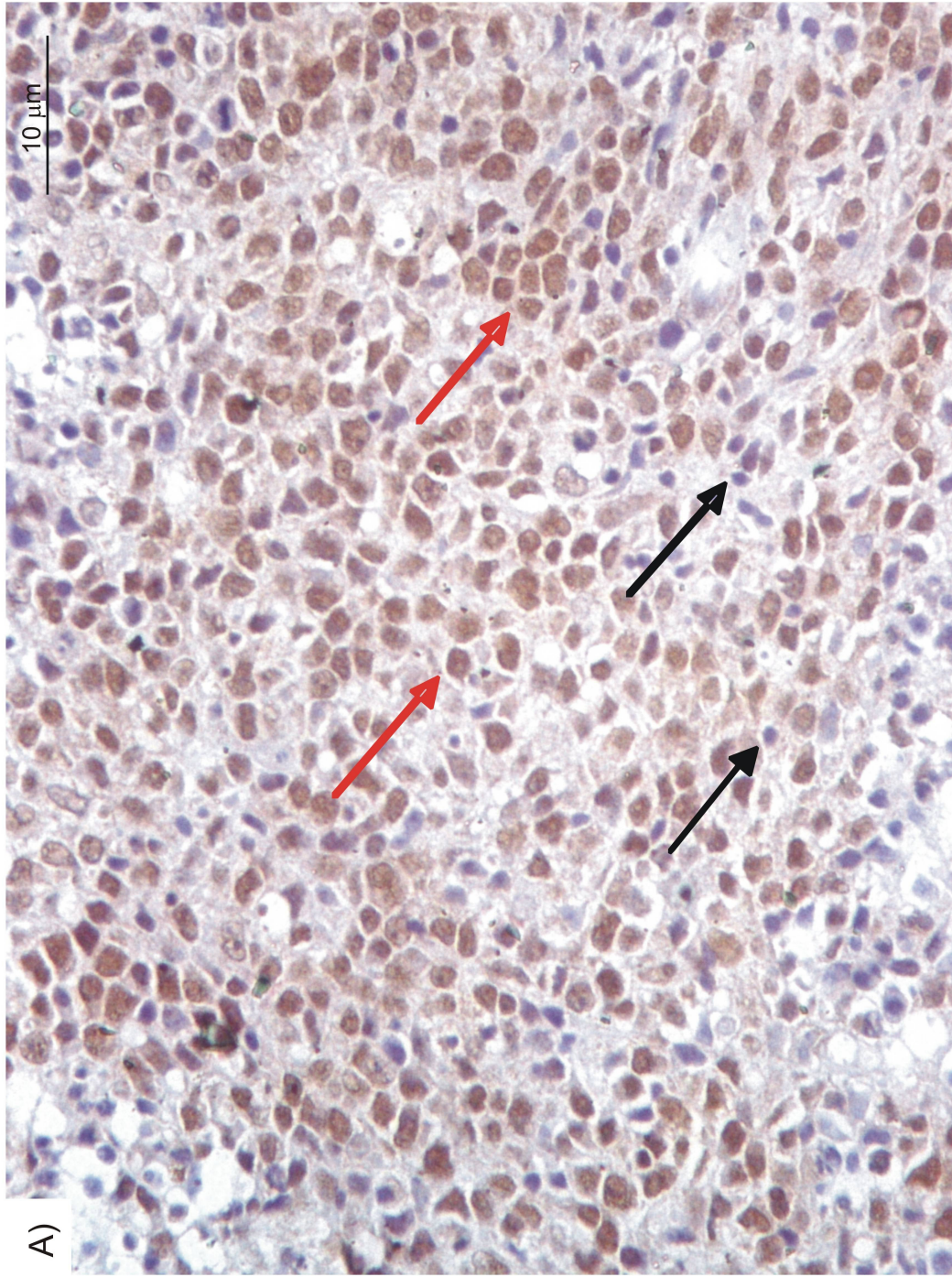


Figura 18a: Detecção por imunohistoquímica da expressão de XIAP no núcleo das células de LDGCB. Setas vermelha: centroblasto. Setas preta: imunoblasto.

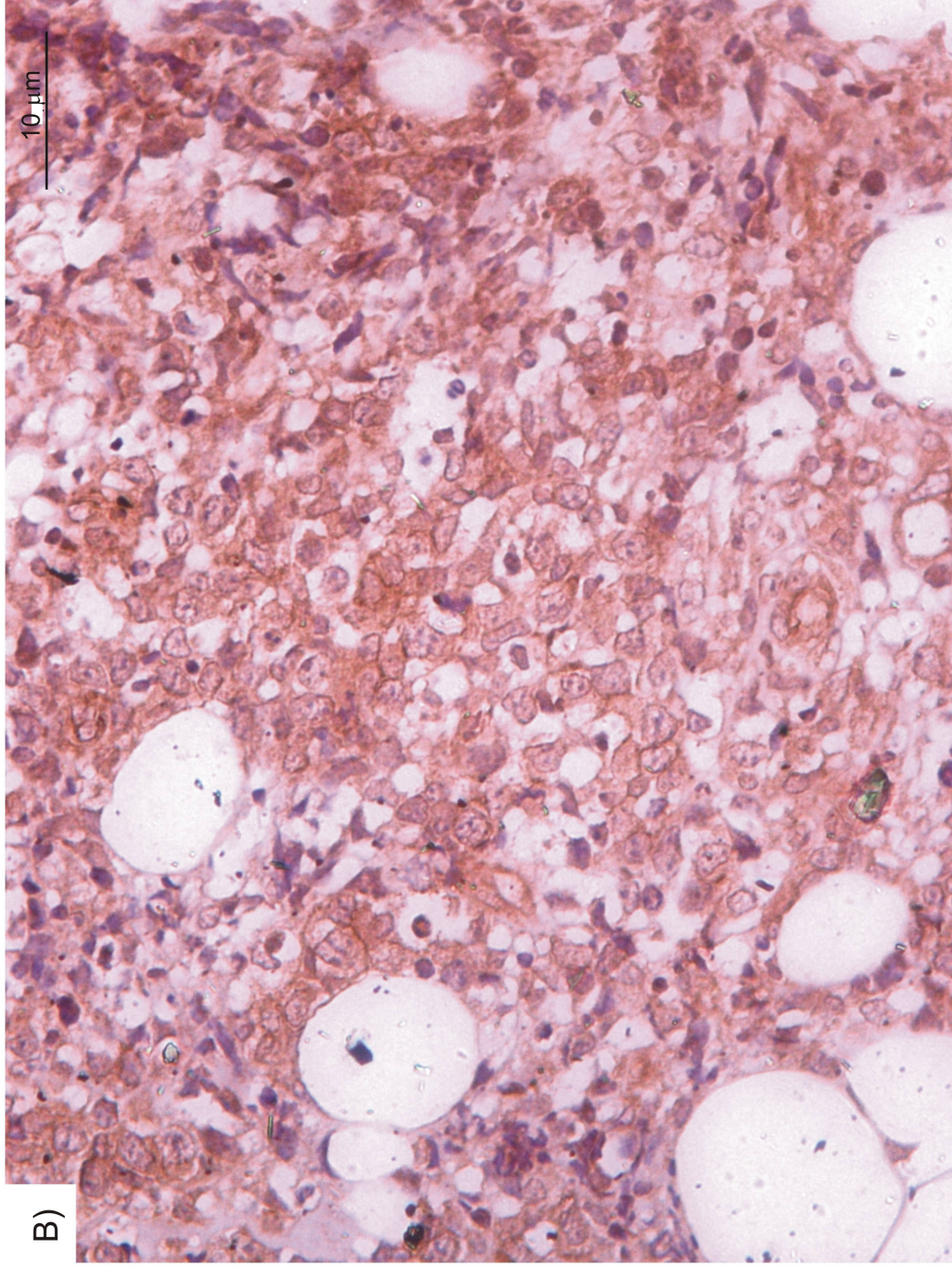


Figura 18b: Detecção por imunohistoquímica da expressão de XIAP no núcleo das células de LDGCB.

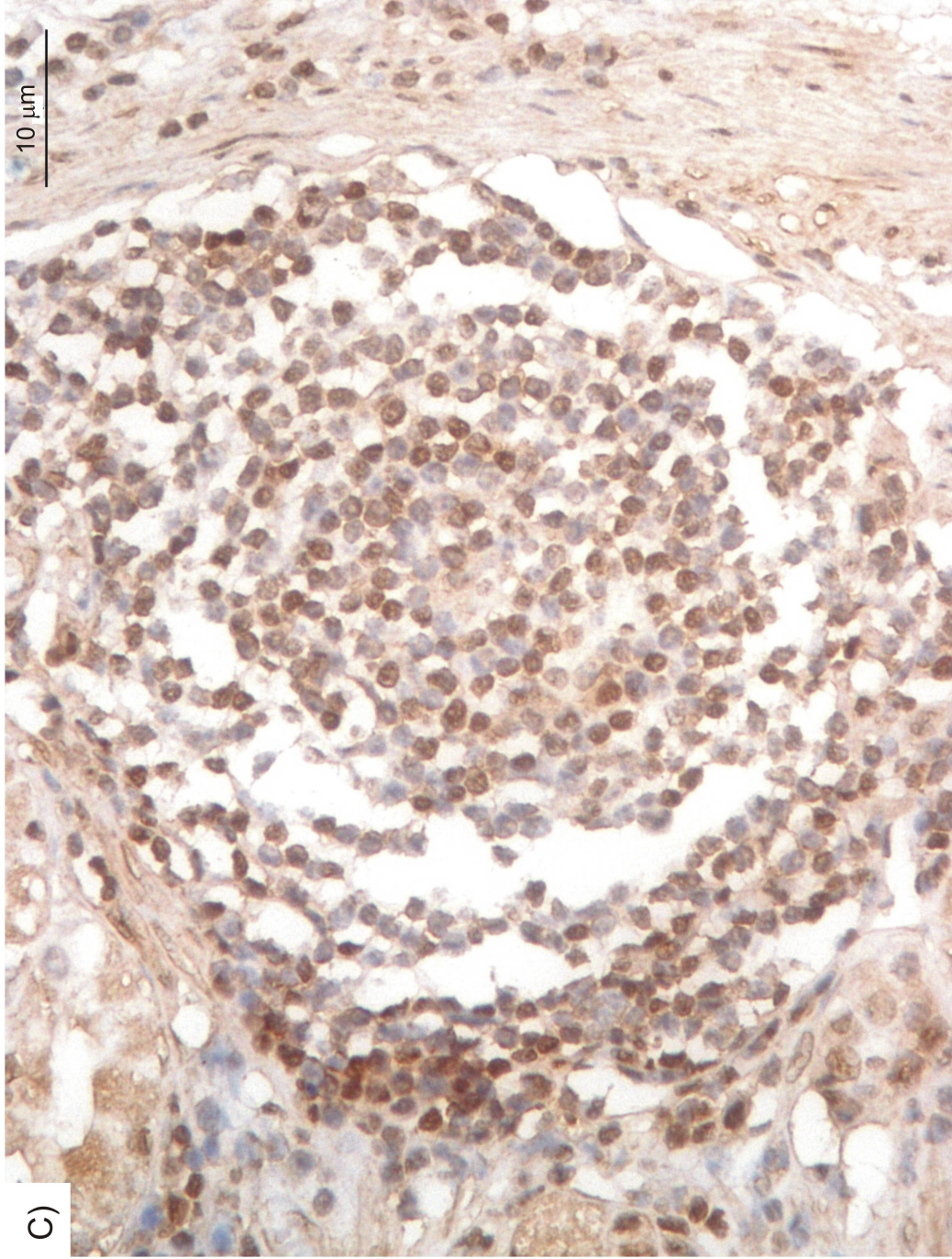


Figura 18c: Detecção por imunohistoquímica da expressão de XIAP em linfócitos da mucosa estomacal. Controle positivo.



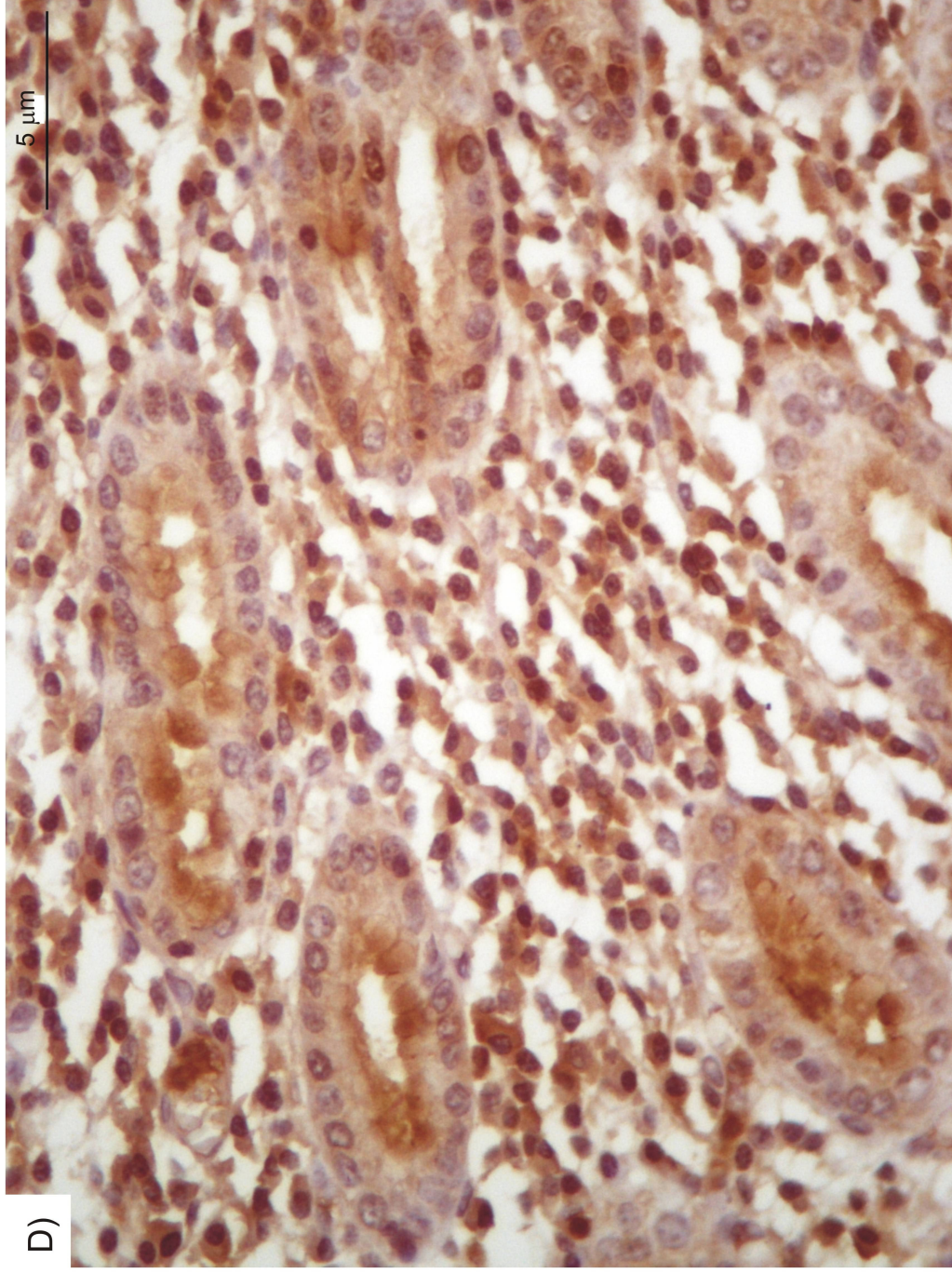


Figura 18d: Detecção por imunohistoquímica da expressão de survivina em plasmócitos da mucosa estomacal. Controle positivo.

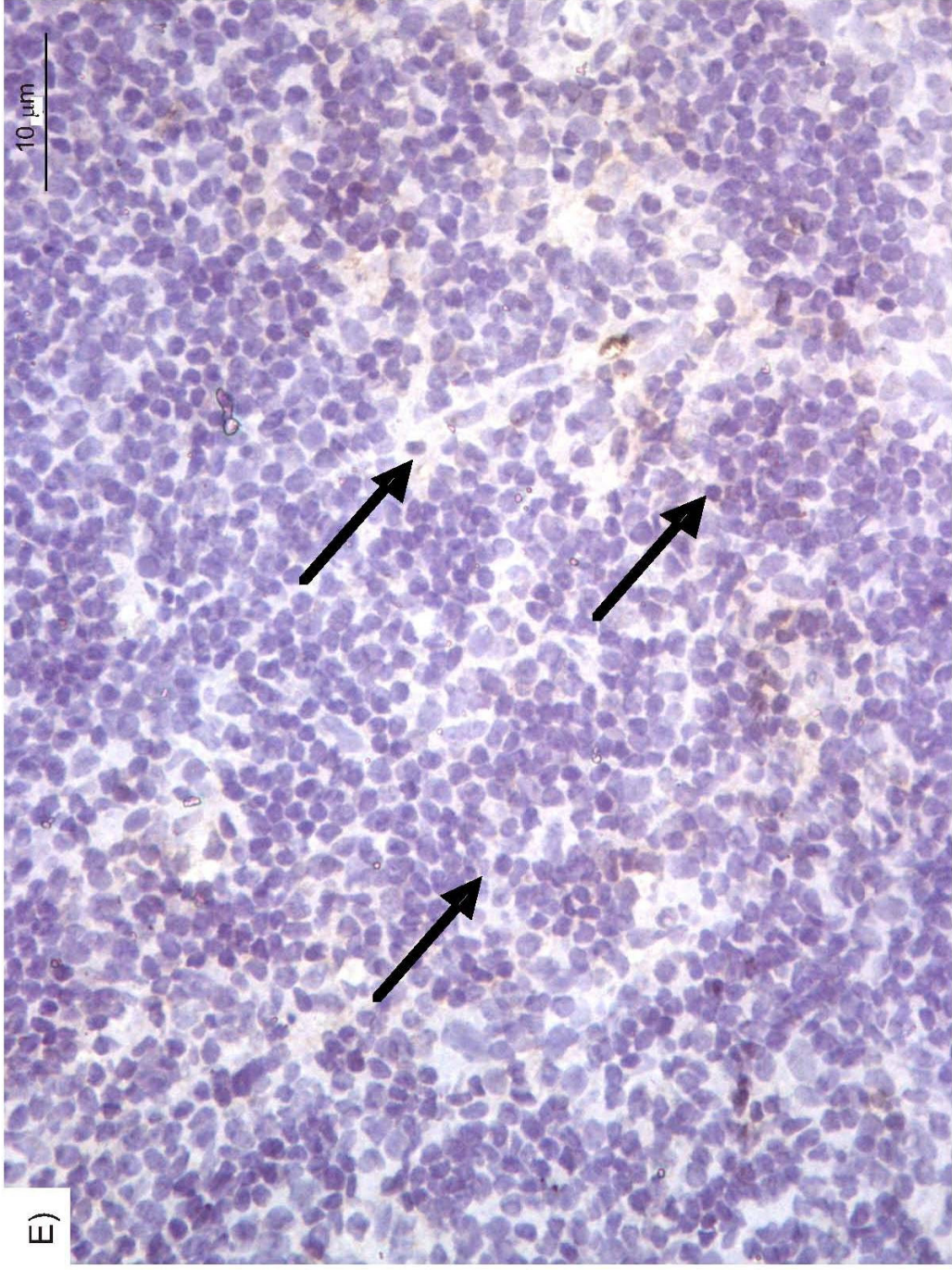


Figura 18e: Detecção por imunohistoquímica da expressão de XIAP em células de LDGCB. Amostra negativa. Seta preta: imunoblasto.

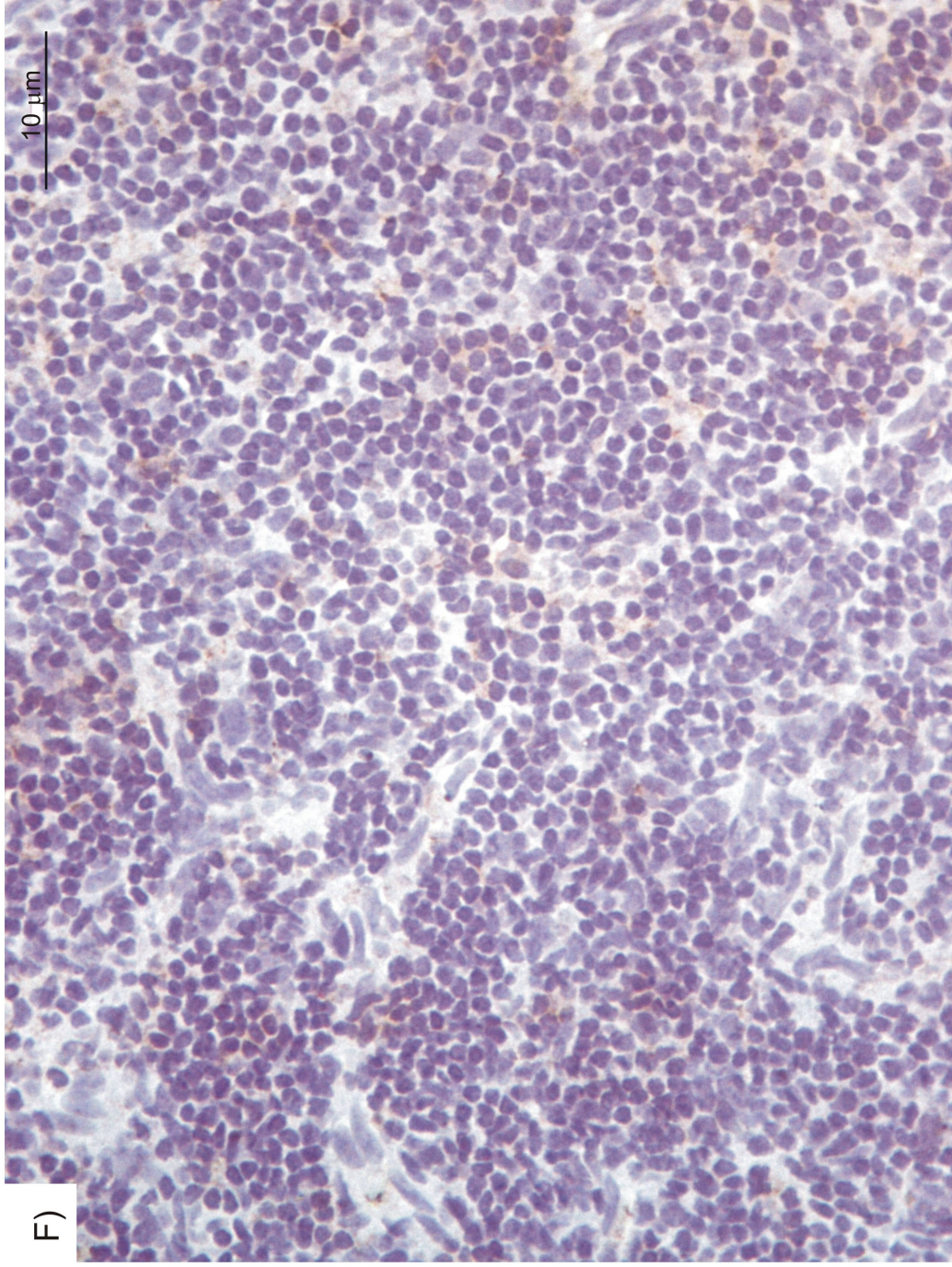


Figura 18f: Detecção por imunohistoquímica da expressão de survivina em células de LDGCB. Amostra negativa.

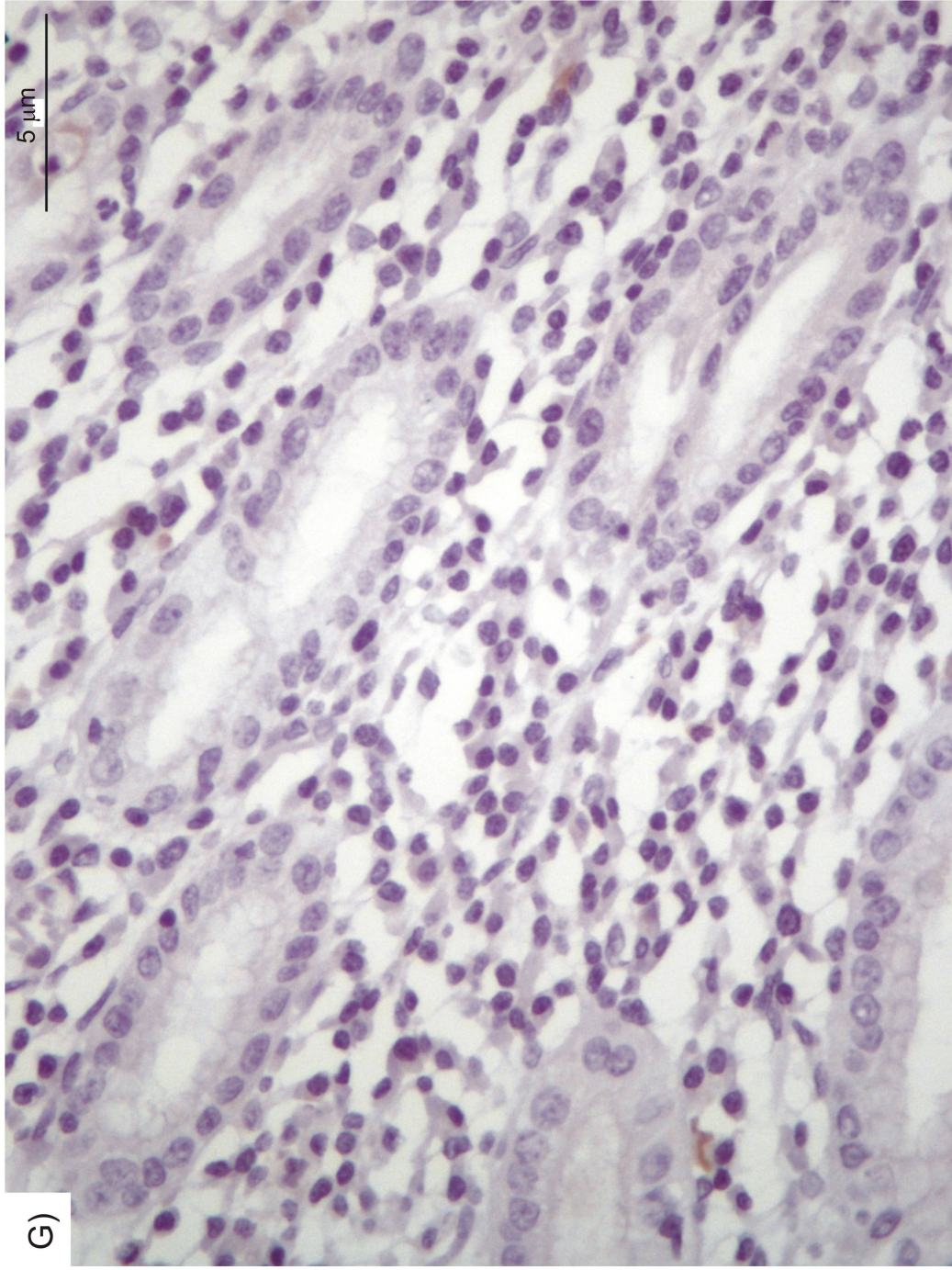


Figura 18g: Detecção por imunohistoquímica da expressão de XIAP e survivina em células da mucosa estomacal. Controle negativo (incubação com anticorpo primário omitida).

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)