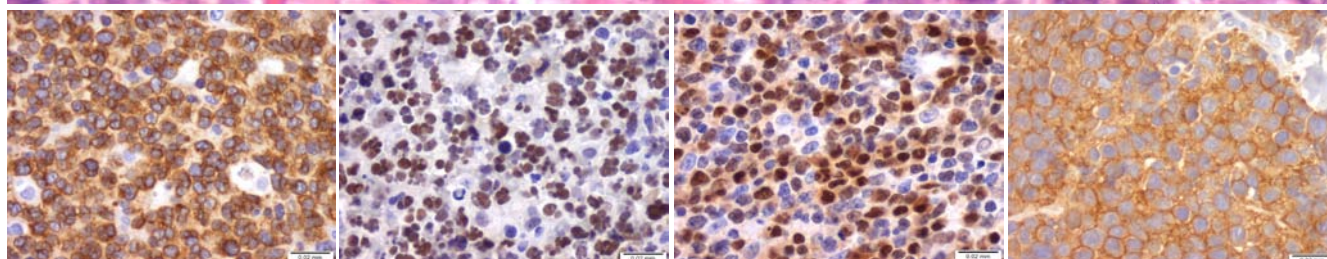




Valor prognóstico do perfil imunofenotípico em linfoma difuso de grandes células B

0,02 mm



Tese de Mestrado – Artigo de Investigação Mestrado Integrado em Medicina – 2009/2010

Carla Sofia dos Santos Silva Ferreira


Orientador: Prof. Doutor Rui Henrique

Director do Serviço de Anatomia Patológica, IPO-Porto &
Professor Auxiliar Convidado do ICBAS - UP.

Co-orientador: Dr. Sérgio Chacim

Interno Complementar de Hematologia, Serviço de Onco-
Hematologia do IPO-Porto

U. PORTO

 INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

ICBAS - Largo Prof. Abel Salazar, 2 - 4099-003 Porto

Resumo

Introdução

O linfoma difuso de grandes células B (DLBCL) é uma doença heterogénea e inclui, pelo menos, dois grupos prognosticamente diferentes: tipo células B do centro germinativo (GCB) e tipo células B activadas (ABC). Vários marcadores moleculares têm sido reconhecidos, individualmente ou integrados em algoritmos, como estando associados a prognósticos diferentes.

Objectivos

O objectivo principal consistiu na identificação de um perfil imunofenotípico de DLBCL preditivo de resposta à segunda linha de quimioterapia, através da caracterização da imunoexpressão de quatro biomarcadores (BCL-2, BCL-6, MUM-1 e CD10) isolados ou integrados em algoritmos propostos na literatura, sendo avaliado o seu impacto preditivo na sobrevivência global.

Metodologia

Neste estudo retrospectivo foram incluídos todos os pacientes com DLBCL com recidiva documentada em 2009 (27 doentes), no Instituto Português de Oncologia do Porto. Foram obtidos e analisados os perfis demográfico, clínico e imunofenotípico quanto ao impacto na sobrevivência global e resposta à quimioterapia de segunda linha.

Resultados

O *International Prognostic Index* ($p=0,026$) e idade superior a 60 anos ($p=0,006$) associaram-se a pior prognóstico. Não foram observadas diferenças significativas na sobrevivência global em função do padrão imunofenotípico, mas foi identificada uma tendência para prognóstico desfavorável em pacientes com MUM-1 positivos ($p=0,086$) ou do tipo não-GCB ($p=0,135$).

Verificou-se resposta à quimioterapia de segunda linha num terço dos casos, sem relação com a sobrevivência. Não houve associação estatisticamente significativa dos biomarcadores com a resposta à terapêutica, mas observou-se uma tendência para melhor resposta nos CD10 positivos ($p=0,071$).

Conclusões

A imunoexpressão dos marcadores estudados individualmente ou combinados no perfil molecular não demonstrou valor prognóstico nos doentes com DLBCL recidivado. Os actuais esquemas de quimioterapia de segunda linha são pouco eficazes e, no futuro, os regimes terapêuticos deverão ser orientados para o subtipo específico de DLBCL. O incremento da série de pacientes permitirá clarificar as tendências observadas, mas não comprovadas.

Palavras Chave

Linfoma difuso de grandes células B; BCL-2; BCL-6; MUM-1; CD10; Quimioterapia de segunda linha

Introdução

Os linfomas são neoplasias malignas com origem nas células do sistema imunitário.¹ O linfoma difuso de grandes células B (DLBCL) é o mais comum dos linfomas não-Hodgkin, representando cerca de um terço destes.^{1,2,3} Corresponde, também, a cerca de 80% dos linfomas agressivos², apresentando uma sobrevivência média aos 5 anos de 46%.¹

O tratamento *standard* dos DLBCL consiste num regime de quimioterapia, modificado a partir do esquema tradicional CHOP (ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona), para incluir também o rituximab (R-CHOP). Este é um anticorpo monoclonal anti CD-20, que veio melhorar significativamente o prognóstico dos DLBCL.^{1,4,5,6,7}

Vários instrumentos têm sido utilizados para prever o prognóstico dos DLBCL, sendo o *International Prognosis Index* (IPI) o mais utilizado. Este baseia-se na avaliação de factores de mau prognóstico [idade \geq 60 anos, lactato desidrogenase (LDH) sérica elevada, *performance status* da Organização Mundial de Saúde (OMS) \geq 2, estadio III/IV no sistema de Ann Arbor e doença extraganglionar em mais do que um local] para criar quatro grupos, cuja sobrevivência aos 5 anos oscila entre os 26 e 73%.^{1,8} A introdução do rituximab, ao alterar o prognóstico, interferiu com a validade deste índice.^{1,2,7,9}

A heterogeneidade clínica do DLBCL justificou a criação de uma subclassificação morfológica pela OMS¹⁰, mas que demonstrou variabilidade inter-observador e não prediz de forma fidedigna o prognóstico.^{10,11} Outra forma de subclassificar os DLBCL é, de acordo com a tabela I, reconhecendo dois subtipos principais: o tipo células B do centro germinativo (GCB) e o tipo células B activadas (ABC).^{9,11,12,13} Existe também um tipo 3, não classificável em nenhum dos anteriores e não tão bem caracterizado.^{11,13} Vários estudos indicam que esta classificação é um importante factor de prognóstico independente.^{12,13,14} A forma mais prática de reconhecer estes subtipos é através do padrão imunohistoquímico, aplicando o algoritmo proposto por Hans et al., apresentado na figura 1a.^{11,15}

	GCB	ABC
Célula de origem ¹¹	Célula do centro germinativo	Célula B activada (pós-centro germinativo)
Mecanismos oncogénicos ^{11,16,17}	Amplificação do REL e rearranjo do BCL-2.	Activação constitutiva do NF-kB
Alterações genéticas ^{11,18,19}	t (14;18); ganhos no 1q, 2p, 7q e 12q12	Trissomia 3; ganhos no 3q, 18q21-q2 e 19q; deleção no 6q21-q22 e 9p21
Padrão imunohistoquímico ^{9,11}	CD-10 e BCL-6	MUM-1/IRF4
Sobrevivência aos 5 anos com CHOP ^{11,13,14}	59%	30%

Tabela I. Subclassificação dos DLBCL com base na célula de origem. Células B do centro germinativo – GCB; células B activadas – ABC.

O biomarcador molecular de prognóstico mais estudado é o BCL-2, expresso em 50% dos DLBCL, apontado como factor de mau prognóstico, já que se trata de uma proteína anti-apoptótica.^{20,21,22} A reformulação do algoritmo proposto por Hans et al. é sugerida em alguns estudos, conforme demonstrado na figura 1b, tendo este maior poder preditivo.²³ No entanto, os estudos publicados são contraditórios.^{20,21,24,25,26} Mais uma vez, as novas terapêuticas que incorporam rituximab vieram alterar estes paradigmas, sendo actualmente pouco claro se o significado prognóstico destes parâmetros se mantém para o esquema R-CHOP.^{27,28,29} Quanto à aplicabilidade destes biomarcadores e algoritmos na predição da resposta à segunda linha de quimioterapia não há estudos publicados.

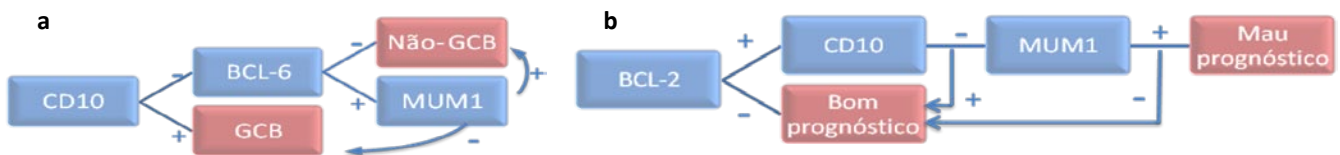


Figura 1. (a) Algoritmo de subclassificação imunohistoquímica dos DLBCL, adaptado de Hans et al.¹⁵ **(b)** Reformulação do algoritmo para incluir o BCL-2, adaptado de Muris et al.²³ Células B do centro germinativo – GCB.

As anomalias genéticas no DLBCL são frequentes. Algumas têm associação com a classificação com base na origem da célula (tabela I), mas muitas mais estão descritas, não sendo conhecido o papel na linfomagenese e significado prognóstico para todas.^{9,19,30,31} Com a utilização dos *microarrays*, encontraram-se múltiplos perfis de expressão genética, embora ainda não esteja definida a sua tradução prognóstica.^{9,11,32}

Torna-se, portanto, fundamental reconhecer a diversidade biológica dos DLBCL e como esta se reflecte, de forma integrada, no prognóstico. Neste contexto, o objectivo principal deste projecto consistiu na identificação de um perfil imunofenotípico de DLBCL preditivo de resposta à segunda linha de quimioterapia, de forma a oferecer uma ferramenta fidedigna e com aplicabilidade clínica na optimização da terapêutica dos doentes com DLBCL. Para esse fim, realizou-se a caracterização da imunoexpressão de quatro biomarcadores – BCL-2, BCL-6, MUM-1 e CD10 – e a categorização dos DLBCL de acordo com os algoritmos propostos,^{15,23} sendo avaliado o seu impacto na sobrevivência global. Tanto quanto é do nosso conhecimento, este tipo de estudo nunca foi realizado anteriormente.

Material e métodos

Seleção de pacientes e dados clínicos

Foi feita uma análise retrospectiva de todos os casos de DLBCL diagnosticados e tratados no Instituto Português de Oncologia do Porto (IPO-Porto), com recidiva documentada no ano de 2009. Foi efectuada a revisão dos processos clínicos, para obtenção de dados demográficos gerais (idade, sexo, período de sobrevivência global após a realização da segunda linha de quimioterapia), estadiamento (Sistema Ann Arbor e IPI), localização (ganglionar vs. não-ganglionar exclusiva), nível sérico de LDH e sintomas B.

Todos os doentes incluídos neste estudo tiveram o seu diagnóstico de DLBCL realizado ou confirmado pelo mesmo anátomo-patologista do IPO-Porto, utilizando como base a Classificação da OMS das Doenças Linfoproliferativas e do Sistema Hematopoiético de 2001.¹⁰

De referir que este estudo é parte de um projecto mais global de caracterização dos DLBCL tratados no IPO-Porto durante os últimos 10 anos, coordenado pelo Dr. Sérgio Chacim. Neste período, foram tratados no IPO-Porto 574 doentes com o diagnóstico de DLBCL, dos quais 482 recidivaram.

Caracterização histopatológica e estudo imunocitoquímico

Os anticorpos utilizados no estudo imunohistoquímico, de forma a traçar um perfil biológico do linfoma, bem como as respectivas condições experimentais, estão descritos na tabela II.

Anticorpo	Clone	Origem	Recuperação antigénica	Diluição
BCL-2	Bcl2/100/D5	Novocastra	Tampão citrato pH 6.0	1:150
BCL-6	LN22	Novocastra	Tampão EDTA pH 8.0	1:200
CD10	56C6	Novocastra	Tampão citrato pH 6.0	1:80
MUM-1	MUM1P	D ako	Tampão EDTA pH 8.0	1:50

Tabela II. Características dos anticorpos utilizados no estudo imunohistoquímico.

A análise imunocitoquímica foi realizada em material de biópsia/peça cirúrgica, em cortes de parafina com espessura de 3 micrómetros, de acordo com a técnica da avidina-biotina. Os cortes foram desparafinados, desidratados e lavados em água destilada. Após a recuperação antigénica procedeu-se à inibição das peroxidases endógenas com peróxido de hidrogénio. Foi, então, realizada a técnica da avidina-biotina de acordo com o protocolo do kit Elite PK 6200 (Vector). A revelação foi feita com diaminobenzidina (Sigma).

A avaliação da imunoexpressão (figura 2) foi realizada pelo mesmo observador, de acordo com critérios previamente publicados. Para o BCL-2 foram considerados positivos os casos em que mais de 50% das células neoplásicas apresentassem marcação citoplasmática.²⁸ No caso do BCL-6 qualquer marcação nuclear inequívoca em células grandes neoplásicas foi considerada definidora de positividade.³³ Relativamente ao CD10

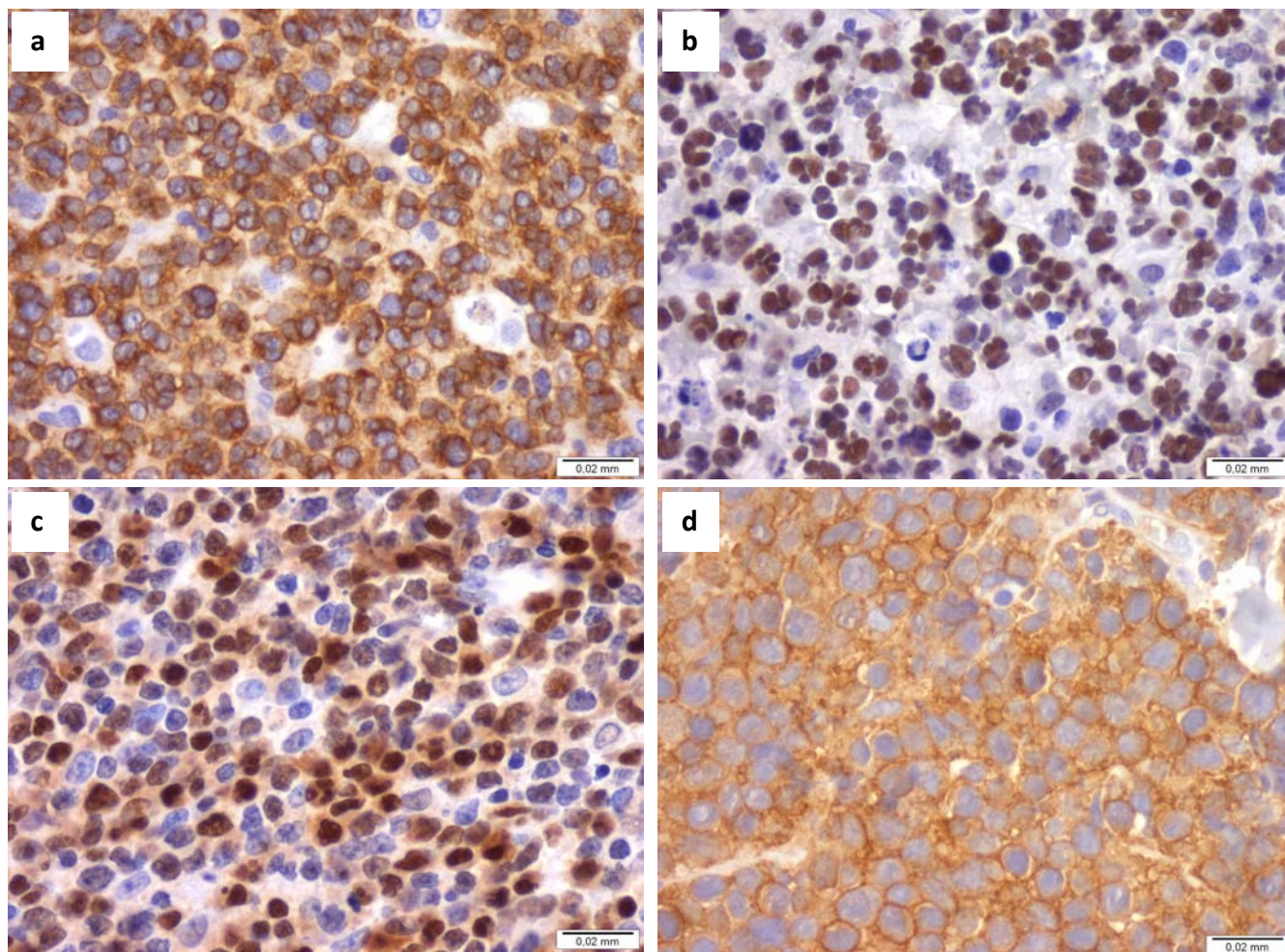


Figura 2. Avaliação da imunoposição dos quatro biomarcadores em estudo: **(a)** BCL-2; **(b)** BCL-6; **(c)** MUM-1; **(d)** CD10.

e MUM-1, foram considerados positivos os casos com marcação membranar ou nuclear, respectivamente, em mais de 30% das células neoplásicas.¹⁵

Análise estatística

Através de métodos estatísticos adequados procedeu-se à integração e análise dos perfis demográfico, clínico e imunofenotípico dos doentes. Foi realizada análise de sobrevivência global, de acordo com o método de Kaplan-Meier, após categorização para cada variável clínica, biomarcador, resposta à quimioterapia de segunda linha e esquema usado. Para análise das distribuições de sobrevivência foi utilizado o teste de log-rank. Realizou-se, igualmente, a avaliação da associação dos biomarcadores com a resposta à quimioterapia, através do teste do qui-quadrado e teste exacto de Fisher. Considerou-se significância estatística para valores de $p < 0,05$. Todos os valores de p foram avaliados bilateralmente.

Resultados

Caracterização dos pacientes

Neste estudo foram incluídos 27 pacientes com o diagnóstico de DLBCL recidivado em 2009, cujas características clínicas estão sumariadas na tabela III. A média de idades dos pacientes neste estudo foi de 58,7 anos \pm 14,9 (desvio padrão).

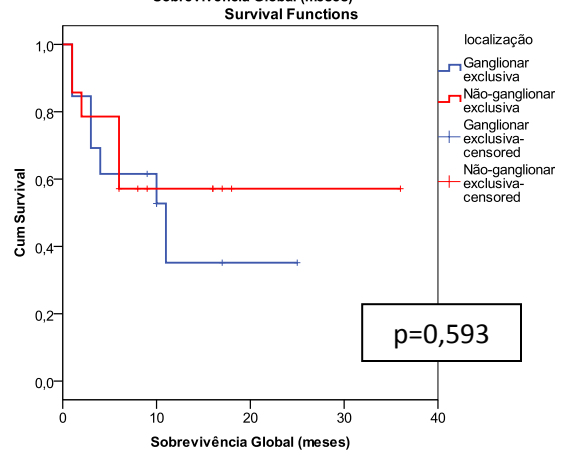
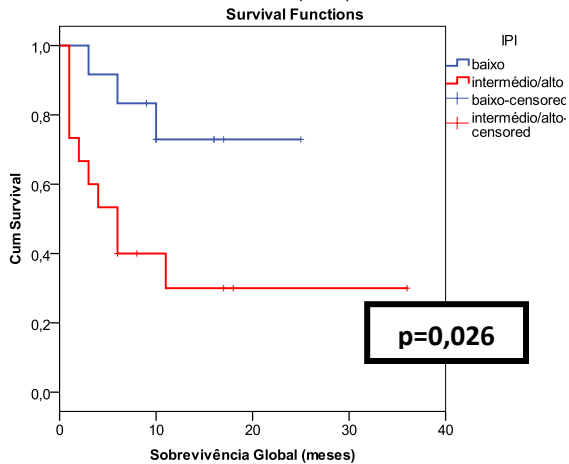
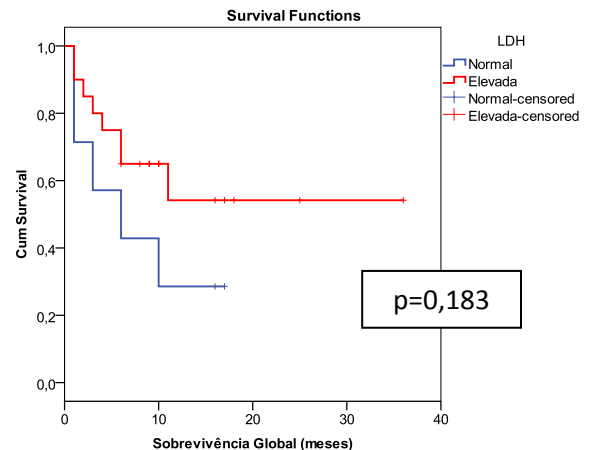
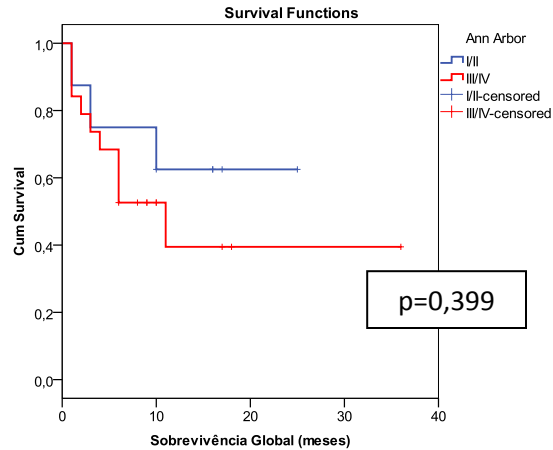
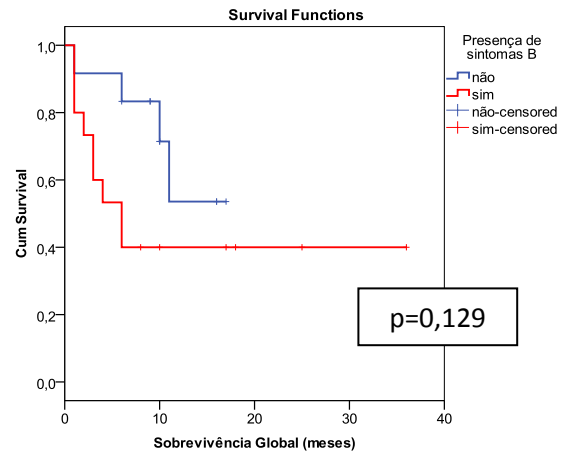
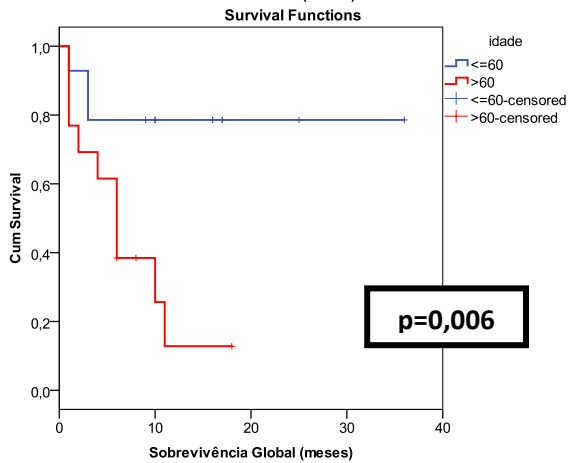
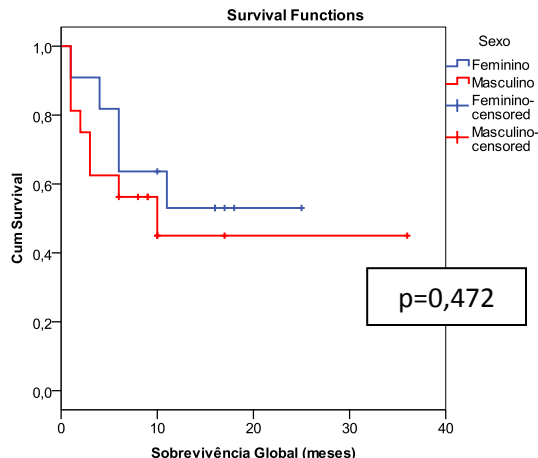
Características dos doentes	Total (%)
Sexo	
Masculino	16 (59,3)
Feminino	11 (40,7)
Idade	
≤ 60 anos	14 (51,9)
> 60 anos	13 (48,1)
Estadio pelo Sistema de Ann Arbor	
I/II	8 (29,6)
III/IV	19 (70,4)
IPI	
Baixo (0,1,2)	12 (44,4)
Intermédio/Alto (3,4,5)	15 (55,6)
Sintomas B	
Presentes	15 (55,6)
Ausentes	12 (44,4)
LDH (mg/L)	
Normal (≤ 190)	7 (25,9)
Elevada (> 190)	20 (74,1)
Localização	
Ganglionar Exclusiva	13 (48,1)
Não-ganglionar exclusiva	14 (51,9)

Tabela III. Características clínicas e patológicas da população em estudo. *International Prognostic Index* – IPI; lactato desidrogenase – LDH.

Com uma mediana de seguimento de 9 meses, à data do fim do estudo 51,9% dos doentes permaneciam vivos e destes 13,3% sem evidência de doença.

As variáveis clínicas significativamente associadas a pior prognóstico foram IPI ($p=0,026$) e idade superior a 60 anos ($p=0,006$), conforme é demonstrado na figura 3.

Figura 3. Análise da sobrevivência global para as variáveis clínicas em estudo: Sexo, Idade, Estadio Ann Arbor, IPI, Presença de sintomas B, níveis séricos de LDH e localização.



Perfil imunofenotípico

Na tabela IV estão listados os resultados da imunoexpressão dos marcadores BCL-2, BCL-6, CD10 e MUM-1, assim como a categorização dos doentes de acordo com os algoritmos descritos na introdução.

Biomarcador	Número (%)
BCL-2	
Positivo	20 (74,1)
Negativo	7 (25,9)
BCL-6	
Positivo	18 (66,7)
Negativo	9 (33,3)
MUM-1	
Positivo	21 (77,8)
Negativo	6 (22,2)
CD10	
Positivo	6 (22,2)
Negativo	21 (77,8)
Algoritmo proposto por Hans et al.¹⁵	
GCB	8 (29,6)
Não-GCB	19 (70,4)
Algoritmo proposto por Muris et al.²³	
Bom prognóstico	14 (51,9)
Mau prognóstico	13 (48,1)

Tabela IV. Resultados de imunoexpressão.

Não foram observadas diferenças significativas na sobrevivência global em função do padrão molecular ou da imunoexpressão individual de cada marcador (figura 4). Contudo, foi observada uma tendência para prognóstico desfavorável em pacientes com imunoexpressão de MUM-1 ($p=0,086$) ou com padrão não-GCB determinado pelo algoritmo proposto por Hans et al.¹⁵ ($p=0,135$).

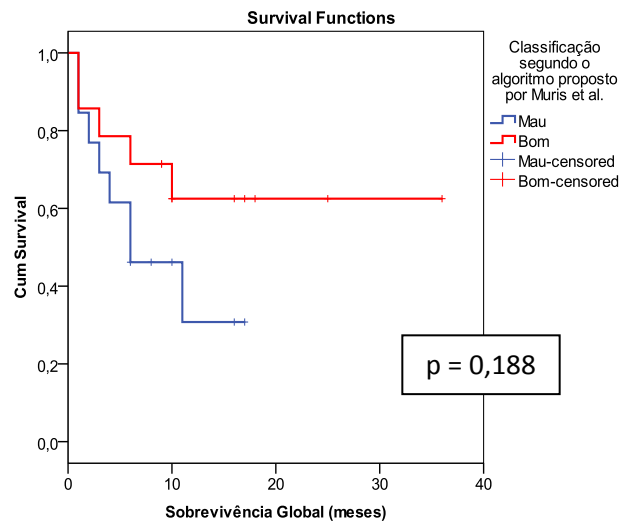
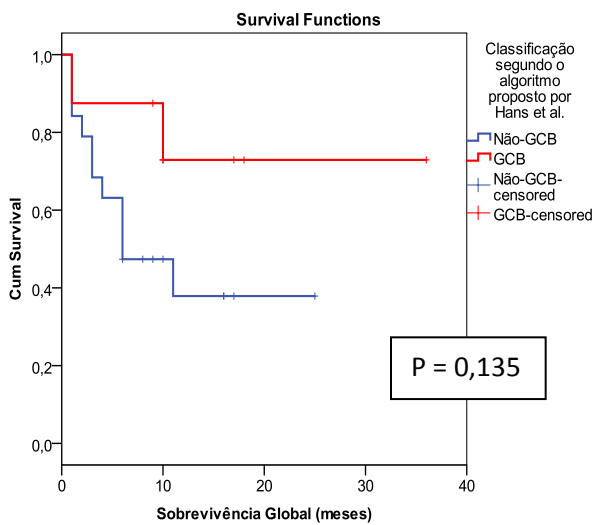
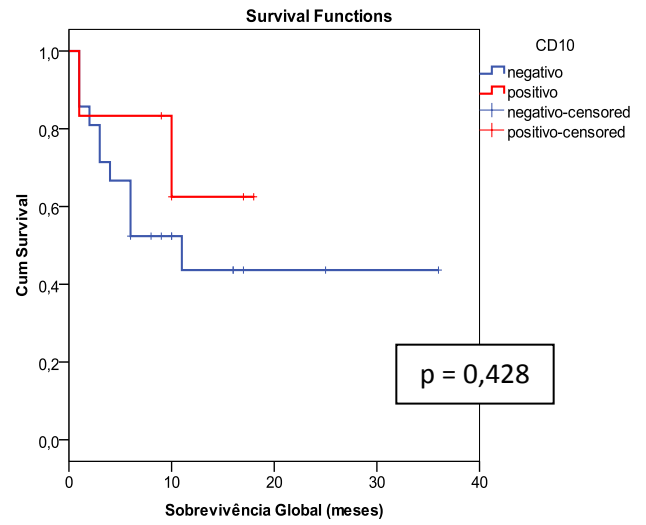
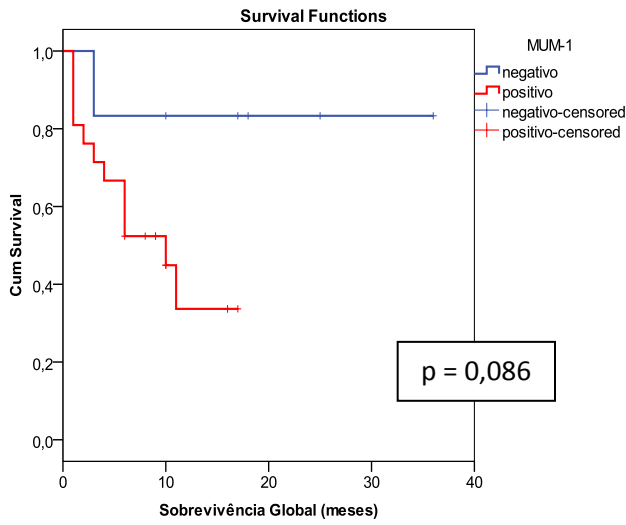
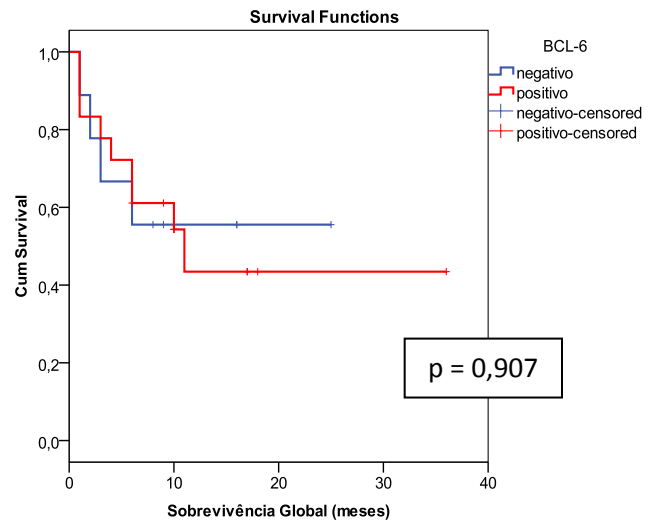
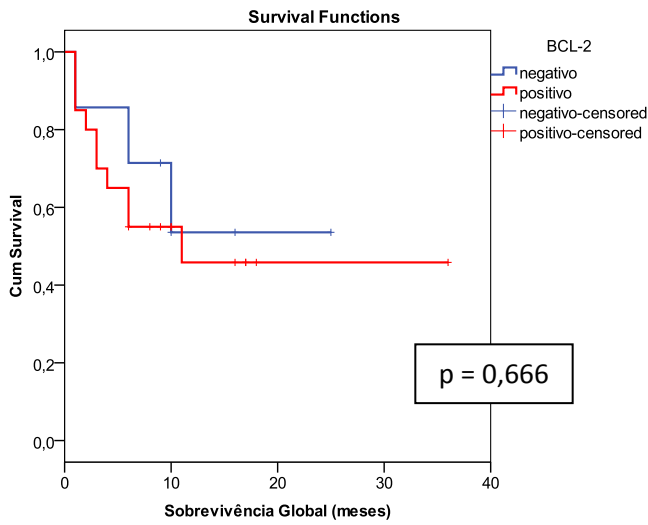


Figura 4. Análise da sobrevivência global para os biomarcadores em estudo isoladamente (BCL-2, BCL-6, MUM-1, e CD10) ou integrados em algoritmos descritos na introdução.

Correlação entre a resposta à terapêutica e o perfil imunofenotípico

Na tabela V estão listados os esquemas de quimioterapia de segunda linha utilizados ou vigilância.

Esquema de Quimioterapia	Número (%)
ESHAP	1 (3,7)
RESHAP	1 (3,7)
ICE	2 (7,4)
RICE	4 (14,8)
MINE	1 (3,7)
RMINE	7 (25,9)
De Angelis	1 (3,7)
Radioterapia	3 (11,1)
Quimioterapia intra-tecal	2 (7,4)
Vigilância	5 (18,5)

Tabela V Esquemas de quimioterapia de segunda linha utilizados.

Nesta série verificou-se resposta à quimioterapia de segunda linha apenas num terço dos casos (completa em 55,6% e parcial em 44,4% destes). Esta resposta à quimioterapia não teve relação estatisticamente significativa com a sobrevivência global (figura 5).

Considerando cada marcador isoladamente ou integrados nos algoritmos descritos, estes não revelaram associação estatisticamente significativa com a resposta à terapêutica. Encontrou-se, contudo, uma tendência para melhor resposta nos DLBCL CD10 positivos ($p=0,071$). Os resultados estão sumarizados na tabela VI.

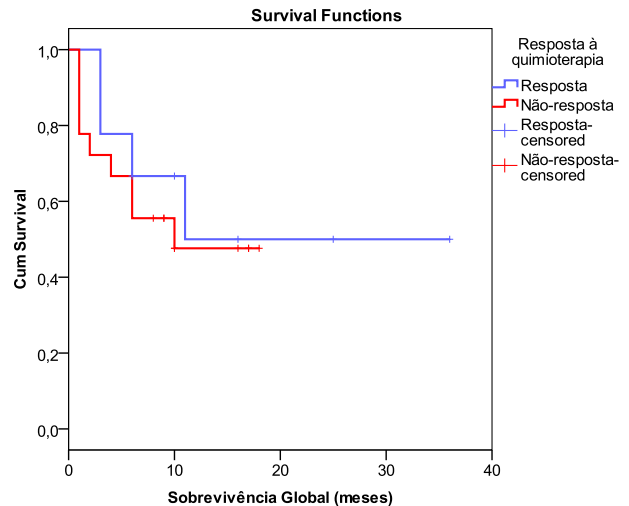


Figura 5. Análise da sobrevivência global para a resposta à quimioterapia de segunda linha

Característica de prognóstico desfavorável	Resposta à quimioterapia (%)	Não resposta à quimioterapia (%)	Valor de p
BCL-2 positivo	77,8	72,2	1,000
BCL-6 positivo	66,7	50	1,000
MUM-1 positivo	66,7	83,3	0,367
CD10 negativo	100	66,7	0,071
Não-GCB	88,9	61,1	0,201
Mau prognóstico	55,6	44,4	0,695

Tabela VI. Resultados da comparação entre os biomarcadores e resposta à quimioterapia. Não-células B do centro germinativo – não-GCB.

Discussão

A heterogeneidade dos DLBCL tem constituído um desafio na procura de indicadores clínicos, moleculares e genéticos que permitam prever o comportamento da doença a longo prazo e definir uma melhor estratégia terapêutica. Os novos métodos de análise de expressão génica por *microarrays* permitiram identificar dois grupos prognosticamente diferentes e tenta-se, agora, traduzir esta informação na prática clínica com vista à optimização da terapêutica. Enquanto que, para a resposta à primeira linha de quimioterapia existem já bastantes estudos publicados, para prever os resultados à segunda linha a bibliografia disponível é muito mais escassa. Tendo esta perspectiva, este estudo partiu de uma série homogénea de doentes com recidiva de DLBCL em 2009, tratados de acordo com vários protocolos terapêuticos de segunda linha. Através da avaliação da imunoexpressão de quatro marcadores (BCL-2, BCL-6, MUM-1, CD10) e sua associação em algoritmos propostos na literatura, tentou-se verificar a sua correlação com a resposta aos esquemas terapêuticos de segunda linha e seu impacto na sobrevivência global.

Constitui um factor de validação desta série o facto de o IPI estratificar os pacientes em grupos prognósticos diferentes. Isto está de acordo com o descrito na literatura, já que, apesar da introdução do rituximab, este continua a ser o melhor indicador clínico de prognóstico disponível.^{8,9,34} O mesmo se verificou em relação à idade dos doentes. Contudo, não se atingiu um valor significativo para outros factores de prognóstico tradicionalmente considerados importantes – o estadiamento pelo sistema de Ann Arbor ou a LDH.^{35,36} Provavelmente, uma extensão no tamanho da amostra permitiria validar a série nestes parâmetros, uma vez que os doentes seleccionados para este estudo se encontravam, predominantemente, nos estadios III/IV ou com LDH elevada. Uma das características que se salienta desta amostra é que nela estão incluídos um número relativamente mais elevado de doentes com características desfavoráveis do que é descrito para a generalidade dos DLBCL: um terço apresenta-se como estadio IV, um terço tem sintomas B, metade tem LDH elevada, 40% não tem localização ganglionar exclusiva.⁹

Globalmente, a eficácia da terapêutica foi baixa, atendendo aos resultados da sobrevivência global e resposta à quimioterapia. Adicionalmente, não se verificou qualquer relação entre as respostas à quimioterapia de segunda linha e a sobrevivência global. Este resultado traduz o baixo impacto clínico dos esquemas de quimioterapia de segunda linha actualmente disponíveis quando comparado com o R-CHOP (resposta completa em 75-80%)⁴, embora o relativamente curto período de seguimento não permita, ainda, uma comparação fidedigna com os resultados publicados em séries mais extensas e com seguimento mais prolongado.

O perfil de imunoexpressão dos quatro marcadores não permitiu evidenciar, seja individualmente ou agrupados no perfil molecular, um imunofenótipo passível de discriminar casos com diferente prognóstico no conjunto de doentes estudados. Estes resultados contrastam, aparentemente, com os publicados em séries que incluíram um número superior de doentes com maior período de seguimento.^{15,23} Contudo é de referir a

tendência de associação da imunexpressão de MUM-1 e da classificação em não-GCB com pior prognóstico, tal como verificado nos estudos atrás referidos. Os biomarcadores têm vindo a ser reavaliados na era do rituximab e são vários os estudos que apontam que o seu significado prognóstico parece ter desaparecido ou diminuído, como seguidamente se descreve. Portanto, uma das causas possíveis para o verificado neste trabalho é o facto de os doentes englobados terem sido tratados com esquemas englobando rituximab em primeira ou segunda linha.

O BCL-2, expresso em cerca de 50% dos DLBCL²⁰, é membro da família de proteínas que regulam a apoptose e julga-se que, por esse motivo, a sua sobre-expressão será causadora de resistência à quimioterapia, sendo assim geralmente associada com mau prognóstico nos doentes tratados com CHOP^{20,21,22}, embora não em todos os estudos.^{24,26} Outros demonstram que a sobre-expressão de BCL-2 só constituirá um marcador importante no tipo não-GCB.^{25,37} Pelos motivos expostos, acredita-se que a adição de rituximab, enquanto estimulador da apoptose, eliminou o efeito negativo da sobre-expressão de BCL-2 no DLBCL, melhorando apenas o prognóstico nos não-GCB.^{27,28,38,39}

O BCL-6 desempenha um papel central na formação de centro germinativo, sendo a sua expressão geralmente associada aos GCB e observada em 50-70% dos DLBCL.⁴⁰ É, então, considerado indicador de prognóstico favorável.⁴¹ A sua expressão diminui a resposta apoptótica mediada pelo p53 ao dano do DNA⁴² e, tal como para o BCL-2, a introdução do rituximab pode ter alterado o seu valor prognóstico, a beneficiar apenas os não-GCB.³³

O MUM-1 pertence a uma família de factores de transcrição,⁴³ tendo um importante papel na regulação da expressão de genes em resposta a interferão e citocinas.⁴⁴ A maioria dos GCB são MUM-1 negativos. A sua imunexpressão pode ser detectada em 40-50% dos DLBCL.⁴⁵ Não existem estudos publicados quanto à influência do rituximab no valor preditivo do MUM-1.

O CD-10 é uma enzima proteolítica expressa em células precursoras linfóides, epiteliais e alguns tipos de linfoma. É geralmente considerada um indicador de GCB e factor de prognóstico favorável.^{16,46} A sua imunexpressão no DLBCL ocorre em 30-40% casos.⁴⁶ Não existem estudos publicados quanto à influência do rituximab no valor preditivo do CD-10. É de salientar que, nesta série, a distribuição da amostra quanto à imunexpressão dos biomarcadores foi diferente da apresentada na literatura e descrita nesta discussão, com tendência a maior prevalência de factores tradicionalmente apontados como de mau prognóstico (BCL-2 e MUM-1 positivos e CD10 negativo), o que está de acordo com a selecção do tipo de amostra – doentes com recidiva de DLBCL.

O algoritmo proposto por Hans et al. é considerado imperfeito e classifica mal 19,7% dos casos quando comparado com informação genética, o que pode potencialmente confundir a análise da literatura disponível.²⁷ Estas diferenças podem ser também devidas a má reprodutibilidade entre os estudos, secundárias a diferentes técnicas de realizar e interpretar as técnicas imunohistoquímicas.⁴⁷ Mais uma vez, alguns estudos

eliminam a importância do algoritmo na era do rituximab afirmando que este só traz benefício para os não-GBC²⁹, embora isso não seja consensual.²⁷ Como já referido estas poderão explicar os resultados deste projecto.

Esta análise apresenta, como principais limitações, a dimensão da série e o curto tempo de seguimento dos pacientes tratados em segunda linha, dado que a análise destes marcadores imunofenotípicos, por rotina, só se verifica no IPO-Porto a partir de 2008. Assim, o impacto dos biomarcadores e dos esquemas em curso só serão comprovados estatisticamente após extensão do período de *follow-up*.

Se para a primeira linha de tratamento dos DLBCL o R-CHOP é consensual, para a segunda linha as taxas de resposta com esquemas actualmente disponíveis (27-75%)⁴⁸⁻⁵⁰, juntamente com o conhecimento que a diversidade biológica dos DLBCL pode justificar esta disparidade, fazem com que se procurem novos fármacos dirigidos a alvos moleculares. A interferência com a via de sinalização do factor nuclear-kappaB (NF-kB), activo constitutivamente no tipo ABC, como mencionado na tabela I, parece promissora.^{51,52} Estratégias possíveis consistem na redução da activação mediada pela cinase do inibidor-kappaB (IκB)⁵² ou inibição da degradação proteossómica do IκB.⁵³⁻⁵⁵ Em estudo clínico está a associação de quimioterapia a bortezomib, bloqueador da degradação do IκB nos proteassomas, para doentes com DLBCL refractários/recidivados, com taxa de resposta de 85% no grupo ABC (13% no GBC)⁵⁶ e também PKC, uma cinase serina/treonina que modula a via do NFκB nas células B e do factor de crescimento endotelial na microvasculatura tumoral.⁵⁷ Também vários inibidores do BCL-2 parecem poder vir a ser eficazes⁵⁸⁻⁶⁰ assim como para o BCL-6.^{61,62} Outras moléculas com interesse terapêutico estão a emergir, relacionadas com outras vias de sinalização potencialmente patogénicas e microambiente tumoral.⁶³

Como principal conclusão deste trabalho destaca-se que os actuais esquemas de quimioterapia de segunda linha não demonstram eficácia nos DLBCL recidivados. Também se conclui que a imunoexpressão dos marcadores estudados individualmente ou combinados no perfil molecular não demonstrou valor prognóstico dos doentes com DLBCL recidivado, apesar da tendência para a associação do perfil MUM-1 negativo e padrão não-GCB com prognóstico desfavorável. As limitações apresentadas não permitiram atingir valores de significado estatístico para algumas variáveis expectáveis, contudo o incremento da série de pacientes e a actualização dos dados de seguimento num futuro próximo permitirão aprofundar as hipóteses de trabalho que serviram de base a este estudo. Assim, no futuro, os regimes terapêuticos deverão ser orientados para o subtipo específico de DLBCL, dadas as suas diferenças na patogénese e história natural, conseguindo assim remissões mais longas e maior percentagem de cura, já que a eficácia da terapêutica em segunda linha está longe de ser satisfatória.

Referências

- ¹ Longo DL (2008) Malignancies of Lymphoid Cells. In: Harrison's Principles of Internal Medicine (Fauci AS, ed), pp687-700. EUA: Mc Graw-Hill.
- ² Coiffier B (2008) Clinical Seminars in Maintenance Therapy for Non-Hodgkin's Lymphoma Part Three: Maintenance Therapy. Londres: Nowpharma.
- ³ Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD (1998) Epidemiology of the non-Hodgkin Lymphomas: Distributions of the major subtypes differ by geographic locations. *Ann Oncol* 9:717-720.
- ⁴ Coiffier B et al. (2002) CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 346:235-242.
- ⁵ Feugier P et al. (2005) Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 23: 4117-4126.
- ⁶ Pfreundschuh M et al. (2006) CHOP-like chemotherapy plus rituximab vs CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomized controlled trial by the MabThera International Trial (MINT) Group. *Lancet Oncol* 5: 379-391.
- ⁷ Sehn LH et al. (2005) Revised International Prognostic Index (IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) treated with rituximab and CHOP (R-CHOP). *Blood* 106: 147a.
- ⁸ The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project (1993) A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 329:987-994.
- ⁹ Hunt KE, Reichard KK (2008) Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 132:118-124.
- ¹⁰ Gatter KC, Warnke RA (2001) Diffuse large B-cell lymphoma. In: World Health Organization Classification of Tumor. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds), pp171-174. Lyon: IARC Press.
- ¹¹ De Paepe P, De Wolf-Peeters C (2007) Diffuse large B-cell lymphoma: a heterogeneous group of non-Hodgkin lymphomas comprising several distinct clinicopathological entities. *Leukemia* 21:37-43.
- ¹² Alizadeh AA et al. (2000) Distinct types of diffuse large-B-cell lymphomas according to the Kiel classification: distinction of centroblastic and immunoblastic lymphomas is a significant prognostic risk factor. *Blood* 89:2291-2297.
- ¹³ Rosenwald A et al. (2002) The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 346:1937-1947.
- ¹⁴ Shipp MA et al. (2002) Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 8:68-74.
- ¹⁵ Hans C et al. (2004) Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 103:275-282.
- ¹⁶ Huang JZ et al. (2002) The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood* 99:2285-2290.
- ¹⁷ Davis RE et al (2006) Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* 194: 1861-1874.

- ¹⁸ Bea S et al. (2005) Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood* 106:3183-3190.
- ¹⁹ Tagawa H et al. (2005) Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 106:1770-1777.
- ²⁰ Gascoyne RD et al. (1997) Prognostic significance of bcl-2 proteins expression and bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-hodgkin's lymphoma. *Blood* 90:244-251.
- ²¹ Hermine O et al. (1996) Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Études des Lymphomes de l'adult (GELA). *Blood* 87:265-272.
- ²² Hill, E et al. (1996) Prognostic significance of Bcl-2 expression and Bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: A British National Lymphoma Investigation Study. *Blood* 88:1046-1051.
- ²³ Muris JJ et al. (2006) Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 e MUM-1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J Pathol* 208:714-723.
- ²⁴ Wilson WH et al. (1997) Relationship of p53, bcl-2, and tumor proliferation to clinical drug resistance in non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 89:601-609.
- ²⁵ Iqbal J et al. (2006) BCL-2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 24:961-968.
- ²⁶ Piris, A et al. (1994) p53 and Bcl-2 expression in high-grade B-cell lymphomas: Correlation with survival time. *Br J Cancer* 69:337-341.
- ²⁷ Kai Fu D et al. (2008) Addition of Rituximab to Standard Chemotherapy Improves the Survival of Both the Germinal Center B-Cell-Like and Non-Germinal Center B-Cell-Like Subtypes of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* 26:4587-4594.
- ²⁸ Mounier N et al. (2003) Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2 associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Blood* 101:4279-4284.
- ²⁹ Nyman H et al. (2007) Prognostic impact of immunohistochemically defined germinal center phenotype in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy. *Blood* 109:4930-4935.
- ³⁰ Lossos IS et al. (2004) Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N Engl J Med* 350:1828-1837.
- ³¹ Monti S et al. (2005) Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood* 105: 1851-1861.
- ³² Lenz G et al. (2008) Stromal Gene Signatures in Large-B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med* 359:2313-23.
- ³³ Winter JN et al. (2006) Prognostic significance of Bcl-6 protein expression in DLBCL treated with CHOP or R-CHOP: a prospective correlative study. *Blood* 107:4207-4213.
- ³⁴ Ziepert, M. et al. (2010) Standard International Prognostic Index Remains a Valid Predictor of Outcome for Patients With Aggressive CD20+ B-Cell Lymphoma in the Rituximab Era. *J Clin Oncol* 28: 2373-2380.
- ³⁵ Carbone PP et al. (1971) Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res* 31:1860-1861.

- ³⁶ Ferraris AM et al. (1979) Serum lactic dehydrogenase as a prognostic tool for non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 54:928-932.
- ³⁷ Farinha, P et al. (2006) Addition of rituximab to CHOP improves survival in the non-GCB subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 108: 2406.
- ³⁸ Shivakumar L, Armitage JO (2006) Bcl-2 gene expression as a predictor of outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma* 6:455-457.
- ³⁹ Wilson, S et al. (2007) CHOP-R therapy overcomes the adverse prognostic influence of Bcl-2 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 48:1102-1109.
- ⁴⁰ Pittaluga, S et al. (1996) Bcl-6 expression in reactive lymphoid tissue and in B-cell non-hodgkin's lymphomas. *J Pathol* 179:145-150.
- ⁴¹ Lossos, I. et al. (2001) Expression of a single gene, Bcl-6 strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 98:945-951.
- ⁴² Phan, R. Et al. (2004) The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal centre B cells. *Nature* 432:635-639.
- ⁴³ Grossman, A. et al. (1996) Cloning of human lymphocyte-specific regulatory factor (hLSIRF/hIRF4) and mapping of the gene to 6p23-p25. *Genomics* 37:229-233.
- ⁴⁴ Tsuboi, K. et al. (2000) MUM1/IRF4 expression as a frequent event in mature lymphoid malignancies. *Leukemia* 14:449-456.
- ⁴⁵ Colomo, L. et al. (2003) Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 101:78-84.
- ⁴⁶ Ohshima, K. et al. (2001) CD10 and Bcl10 expression in diffuse large B-cell lymphoma : CD10 is a marker of improved prognosis. *Histopathology* 39:152-162.
- ⁴⁷ de Jong D et al. (2007) Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: Validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications – A study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *J Clin Oncol* 25:805-812.
- ⁴⁸ Kewalramani, T. et al. (2004) Rituximab and ICE as second-line therapy before autologous stem cell transplantation for relapsed or primary refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 103:3684-8.
- ⁴⁹ Soussain, C. et al. (1999) Intensive chemotherapy with hematopoietic cell transplantation after ESHAP therapy for relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma. Results of a single-centre study of 65 patients. *Leuk Lymphoma* 33:543-550.
- ⁵⁰ Vellenga, E. et al. (2008) Rituximab improves the treatment results of DHAP-VIM-DHAP and ASCT in relapsed/progressive aggressive CD20+ NHL: a prospective randomized HOVON trial. *Blood* 111:537-43.
- ⁵¹ Davis, R. et al. (2001) Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* 194:1861-1865
- ⁵² Lam, L. et al. (2005) Small molecule inhibitors of I κ B kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin Cancer Res* 11:28-40.

- ⁵³ Ferch, U. et al. (2009) Inhibition of MALT1 protease activity is selectively toxic for activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* 206:2313-20.
- ⁵⁴ Hailfinger, S. et al. (2009) Essential role of MALT1 protease activity in activated B cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:19946-51.
- ⁵⁵ Soucy, T. et al. (2009) An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature* 458:732-736.
- ⁵⁶ Dunleavy, K. et al. (2009) Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 113:6069-76.
- ⁵⁷ Su, T. et al. (2002) PKC-beta controls I kappa B kinase lipid raft recruitment and activation in response to BCR signaling. *Nat Immunol* 3:780-786.
- ⁵⁸ Oltsersdorf, T. et al. (2005) An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 435:677-81.
- ⁵⁹ Walensky, L. et al. (2004) Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. *Science* 305:1466-1470.
- ⁶⁰ Wang, S. Et al. (2003) Targeting Bcl-2 and Bcl-XL with nonpeptidic small-molecule antagonists. *Semin Oncol* 30:133-142.
- ⁶¹ Pasqualucci, L. et al. (2003) Molecular pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma: the role of Bcl-6. *Leuk Lymphoma* 44:5-12.
- ⁶² Polo, J. et al. (2004) Specific peptide interference reveals BCL6 transcriptional and oncogenic mechanisms in B-cell lymphoma cells. *Nat Med* 10:1329-35.
- ⁶³ Lenz, G. et al. (2010) Aggressive Lymphomas. *N Engl J Med* 362:1417-1429.

Contribuição dos Autores

A elaboração do projecto que serviu de base a este trabalho, incluindo a revisão bibliográfica, a construção da base de dados e respectiva análise estatística, a interpretação dos resultados e a elaboração do manuscrito foi da responsabilidade da Aluna Carla Ferreira. A selecção de pacientes e a revisão dos processos clínicos para a obtenção dos dados foi realizada pelo Dr. Sérgio Chacim. A caracterização histopatológica e interpretação do estudo imunocitoquímico esteve a cargo do Prof. Doutor Rui Henrique. O Prof. Doutor Rui Henrique e o Dr. Sérgio Chacim orientaram a execução do projecto e reviram a versão final do trabalho.

Agradecimentos

Agradeço a disponibilidade e colaboração dos tutores, o Prof. Doutor Rui Henrique e o Dr. Sérgio Chacim na orientação e realização deste trabalho.