

ATUALIZAÇÃO NO DIAGNÓSTICO DE LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B

José Vassallo, setembro de 2018

1. Introdução

O linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) é o tipo mais frequente de linfomas não-Hodgkin (LNH), perfazendo cerca de 40% destes. Estes linfomas são considerados **agressivos**, uma vez que apresentam alto índice proliferativo. Porém, são potencialmente curáveis, a depender da extensão da doença no organismo, como ocorre em geral com todas as neoplasias.

Do ponto de vista clínico, o LDGCB pode ser dividido em grupos de risco, de acordo com o número de fatores de prognóstico desfavoráveis que o paciente apresente. Esses fatores são os seguintes (Índice Prognóstico Internacional – IPI):

-
- *Idade superior a 60 anos;*
 - *Estádio de Ann Arbor III ou IV;*
 - *Desidrogenase láctica (DHL) sérica superior ao normal;*
 - *Índice de estado geral igual ou superior a 2;*
 - *Acometimento de mais de um sítio extranodal (medula óssea, sistema nervoso central, trato gastrointestinal, fígado, pulmões, gônadas, amígdalas)*
-

Se o paciente não apresentar nenhum dos 5 fatores acima, tem escore **zero** e é considerado de **baixo risco** (ou bom prognóstico), com sobrevida esperada em 5 anos de mais de 90% quando tratado com esquemas que incluem o anti-CD20 (rituximabe).

No extremo oposto, se o paciente apresentar todos os 5 fatores, ou seja, escore 5, é considerado de **alto risco** (ou mau prognóstico), com sobrevida esperada em 5 anos de pouco mais de 50%. Números entre zero e 5 conferem riscos intermediários ao paciente.

Esta categorização de LDGCB é a mais difundida e que apresenta maior aplicabilidade clínica. No entanto, a Oncologia atual se desenvolve buscando drogas que atuem de forma mais seletiva e eficaz levando em conta os mecanismos moleculares envolvidos na origem das neoplasias. Desta forma, têm se tornado cada vez mais numerosas as pesquisas de fatores biológicos (moleculares) que possam influenciar na conduta terapêutica.

2. Fatores biológicos importantes na avaliação dos linfomas difusos de grandes células B

2.1. Morfologia

Até os anos 1970, a única ferramenta disponível para os Patologistas diagnosticarem as neoplasias era a morfologia microscópica. Nesta etapa, os LDGCB foram conhecidos primeiramente como **reticulossarcomas** e, após os anos 1960, como **linfomas histiocíticos**. Com o advento da imunistoquímica nos anos 1970, verificou-se que estas neoplasias eram derivadas de linfócitos B ativados. Na classificação de Kiel (desenvolvida pelo grupo do pesquisador alemão Karl Lennert) esses linfomas passaram a ser classificados como: **centroblásticos** (variantes monomórfica e polimórfica, representando mais de 80% dos LDGCB), **imunoblásticos** (8-10%) e **anaplásicos** (<3%). Há também variantes morfológicas muito raras de LDGCB, como a de células em anel de sinete e a fusocelular ou sarcomatoide. Esta classificação refletia uma heterogeneidade histopatológica que apresentava alguma correspondência com o prognóstico da doença.

No entanto, esta classificação não obteve ampla aceitação entre os americanos e sua reprodutibilidade entre os patologistas era considerada baixa. Após os anos 1990, esta neoplasia passou a ser denominada **linfoma difuso de grandes células B**, nome que perdura até o presente nas várias edições da Nomenclatura da Organização Mundial da Saúde - OMS ⁽¹⁾. Após o agrupamento destas neoplasias em uma única entidade, continuava a intrigar os especialistas na área a relativa heterogeneidade clínica de pacientes que apresentavam tumores de morfologia e imunofenótipo semelhantes (células linfóides grandes, com nucléolos evidentes, alto índice proliferativo e expressão do marcador linfóide B, CD20). Nesse contexto, novos estudos moleculares se seguiram, como descreveremos adiante.

2.2 Estudo com perfil de expressão gênica detecta a existência de dois grupos moleculares de LDGCB: tipo centro germinativo e tipo não-centro germinativo

Em 2000, Alizadeh e colaboradores publicaram um estudo altamente relevante na revista científica *Nature* ⁽²⁾. Nesse estudo, o perfil de expressão gênica (GEP, do inglês *gene expression profiling*) dos LDGCB pode identificar dois grupos moleculares distintos do ponto de vista de características genéticas e de evolução clínica.

De um lado, o grupo com características semelhantes às células B dos centros germinativos (**LDGCB-CG**), com melhor prognóstico. Este grupo contou com cerca de 40% dos pacientes estudados.

De outro lado, o grupo com características de células B ativadas, ou pós-centro germinativo, ou ainda não-centro germinativo (**LDGCB-NCG**), com prognóstico pior. Este grupo contou com cerca de 60% dos pacientes estudados. Nos vários estudos usando GEP, cerca de 10% dos casos não

se enquadram em nenhum dos dois grupos citados acima; no entanto, eles são agrupados com os NCG, já que também apresentam evolução menos favorável que os CG.

É importante notar que esses dois grupos moleculares forneciam nova estratificação prognóstica mesmo entre os pacientes com IPIs baixos ou elevados. Além disto, os pacientes com LDGCB-NCG podem necessitar de drogas mais adequadas à biologia das células neoplásicas e que atuem nas vias de sinalização próprias, o que vem sendo demonstrado com os novos esquemas terapêuticos desenvolvidos.

Estudos posteriores mostraram que pacientes com LDGCB apresentam gradual aumento na participação do tipo NCG com o passar da idade. Como a idade é um importante fator clínico de pior prognóstico, poderia se pensar que esta relação seria responsável pelo desenrolar clínico menos favorável. No entanto, mesmo com a análise corrigida para a idade, os pacientes com o tipo NCG tiveram pior desempenho clínico, confirmando que deve haver um mecanismo molecular responsável pela resistência maior à terapêutica convencional por parte dos portadores do tipo NCG ⁽³⁾.

Entre as alterações moleculares que caracterizam os LDGCB-CG estão: translocação de BCL2, translocações e mutações de BCL6, amplificação de REL, mutações de EZH2 e de genes da via GNA13. Para os do tipo NCG estão: ativação da via do NF-KB por mutações em genes reguladores dessa via, ativação da via do receptor de células B e mutações de MYD88 ⁽⁴⁾.

Portanto, seria desejável que a classificação molecular dos LDGCB estivesse disponível para todos os pacientes, o que não é prático, uma vez que a técnica de GEP ainda é dispendiosa. O estudo imunistoquímico, já disponível para a maioria dos pacientes com linfomas, seria uma opção mais acessível.

2.3 Como utilizar a classificação molecular com técnica mais amplamente disponível nos laboratórios de Patologia, como a imunistoquímica

Um dos primeiros estudos a propor uma correspondência imunistoquímica com a classificação molecular foi o de Hans CP et al ⁽⁵⁾. Nesse estudo com apenas três marcadores imunistoquímicos (**CD10, proteína BCL6 e MUM1/IRF4**), os autores defendiam que poderiam classificar adequadamente os LDGCB em CG e NCG, com valor prognóstico independente ao IPI (Figura 1). Para cada um desses três marcadores ser considerado positivo, mais de 30% das células devem expressá-lo. Isoladamente, a expressão desses marcadores nos LDGCB, considerado o valor de corte, corresponde a, respectivamente, 30-60%, 60-90% e 35-65%. Usando-os no algoritmo de Hans, a distribuição dos subtipos nesse estudo foi semelhante à mostrada pelo GEP, ou seja, 42% para CG e 58% para NCG.

Do ponto de vista clínico, nenhuma diferença foi observada entre os grupos de pacientes dos tipos CG versus NCG (sexo, idade, estágio, número de sítios extranodais, estado geral, níveis de desidrogenase láctica sérica ou índice prognóstico internacional ⁵⁾).

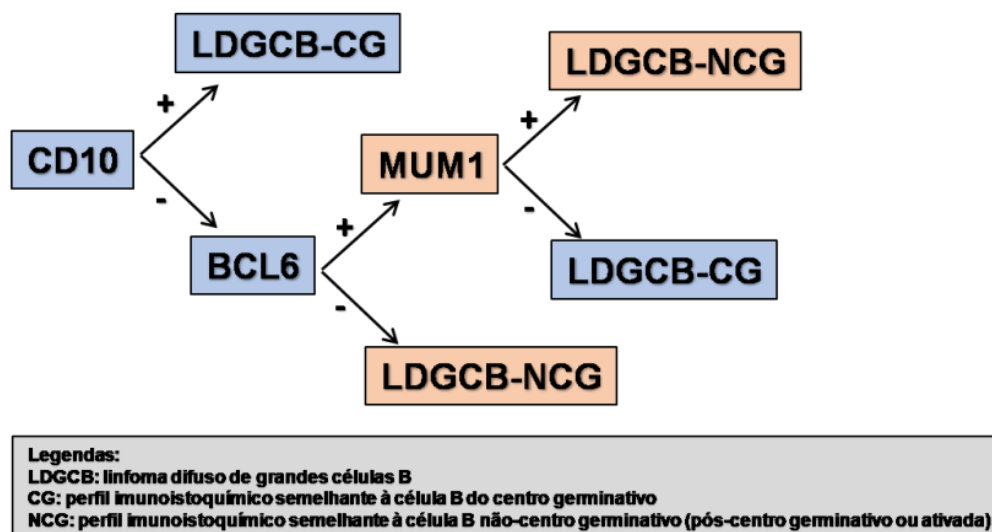


Figura 1: Algoritmo de Hans ⁽⁵⁾ como sucedâneo para a classificação molecular dos linfomas difusos de grandes células B em tipos centro germinativo e não-centro germinativo. O marcador é considerado positivo se 30% ou mais das células neoplásicas o expressam.

Não tardou para que esse estudo fosse contestado e vários outros trabalhos posteriores apresentaram propostas de painéis imunoistoquímicos que poderiam ter correspondência com o GEP, embora nenhuma delas apresentasse boa correlação com o método molecular ⁽⁶⁾. Embora a concordância dos algoritmos imunoistoquímicos não seja total em relação ao GEP, a proposta de Hans foi incorporada à nova edição da OMS, por se tratar de uma informação relevante e pelo fato de o método estar disponível na maioria dos serviços de Patologia que fazem o diagnóstico de linfoma ⁽¹⁾. Além disto, esta informação é mais relevante para o subtipo NCG, no qual a concordância do esquema de Hans com o GEP chega aos 85% ⁽⁶⁾.

2.4 Os LDGCB podem ter rearranjos nos genes C-MYC, BCL2 e BCL6, que podem ser detectados por hibridização in situ fluorescente (sigla em inglês: FISH)

Apesar do avanço representado pela classificação molecular dos LDGCB em tipos CG e NCG, existem ainda aqueles que apresentam recaídas em ambos os grupos. Desta forma é necessário estudar quais outros fatores poderiam contribuir para essa diferença clínica.

No estudo dos mecanismos envolvidos na evolução das células linfóides B destinadas a passarem pelos centros germinativos, vários genes emergiram como tendo papéis de destaque, dentre os quais o C-MYC, o BCL2 e o BCL6.

O **gene C-MYC** está localizado no cromossomo 8 e é ativado como resultado de complexos estímulos a receptores de membrana. Uma vez ativado, o C-MYC regula a transcrição de vários

outros genes através da ligação na região promotora dos mesmos. Cerca de 10 a 15% de todos os genes podem ser alvos de C-MYC, estando envolvidos em funções diversas, como proliferação e crescimento celular e replicação de DNA. Há evidências de que a ativação de C-MYC apenas estimula programas já ativados em uma dada célula, o que explica suas variadas funções em tipos diferentes de células ⁷.

O gene C-MYC está tipicamente translocado no **linfoma de Burkitt**, que ocorre principalmente na faixa etária pediátrica. Mais de 90% dos linfomas de Burkitt apresentam a translocação, sendo que o restante do genoma está normal.

Apenas para nos restringirmos aos linfomas B agressivos, outro tipo de linfoma com translocação de C-MYC é o conhecido como **linfoma B de alto grau** (LBAG), uma forma rara de linfoma B (cerca de 3% dos linfomas não Hodgkin) com feições histológicas intermediárias entre o linfoma de Burkitt e o LDGCB. No LBAG, translocações de C-MYC ocorrem em 30-60% dos casos, estando frequentemente associadas à translocação de BCL2 e/ou de BCL6. Nestes casos, uma categoria à parte está prevista na nomenclatura da OMS-2016, denominada **LBAG double hit (DH) ou triple hit (TH)** ¹. Ao contrário dos linfomas de Burkitt, a alteração de C-MYC nos LBAG está associada a cariótipo complexo (Tabela 1 ⁸). Entre os linfomas com DH ou TH, as combinações de alterações gênicas mais frequentes são de C-MYC/BCL2 (65%), seguidas de C-MYC/BCL2/BCL6 (20%) e C-MYC/BCL6 (15%). Enquanto as duas primeiras combinações de alterações ocorrem mais nos linfomas do tipo CG, a combinação C-MYC/BCL6 pode ocorrer tanto no tipo CG, quanto no NCG, e apresenta um prognóstico particularmente desfavorável ⁹.

Os LDGCB típicos do ponto de vista histopatológico também podem apresentar translocações de C-MYC em cerca de 10-20% dos casos (mais frequentes no tipo CG), além de ampliações desse gene em cerca de 2% dos casos. Embora mais raramente, translocações de C-MYC, associadas ou não com as de BCL2 e/ou BCL6, podem ocorrer em outras neoplasias B de diversas morfologias ^{10,11}.

O **gene BCL2** está tipicamente translocado nos **linfomas foliculares** (85-90%), um tipo frequente de linfoma não Hodgkin indolente de células B (cerca de 25%). Translocações de BCL2 podem ocorrer nos LDGCB (até 30% do tipo CG, raramente, <5%, no tipo NCG), nos LBAG (40%), porém estão sempre ausentes nos linfomas de Burkitt. Digno de nota é o fato de que cerca de 40% dos pacientes com LDGCB exibindo translocação concomitante de C-MYC e BCL2 têm história de linfoma folicular prévio.

O **gene BCL6** está translocado em cerca de 25% dos LDGCB-NCG e 10% dos CG ¹². Mutações deste gene, que podem estar associadas a sua desregulação, com potencial impacto na linfomagenese, ocorrem em cerca de 50% dos LDGCB ¹³.

Tabela 1: Frequência de alterações de C-MYC, BCL2 e BCL6 nos linfomas B agressivos

	Linfoma de Burkitt	LDGCB	LBAG	Linfoma Plasmoblástico
Translocação MYC	90-100%	5-14%	35-50%	41-49%
Ganho/amplificação MYC	Muito rara	21-38%	Sem dados	20%
Genes parceiros da translocação	IGH 100%	Não-IG (35-53%) ou IGL	Não-IG (38%)	83% IG; 17% não-IG
Rearranjo simultâneo de BCL2	0%	Frequente - 58-83%	47%	Sem dados
Cariótipo	Simple	Complexo	Complexo	Sem dados
Expressão proteica de MYC	100%	29-47%	35%	Sem dados

LDGCB: linfoma difuso de grandes células B; LBAG: linfoma B de alto grau; IG: gene de imunoglobulina; IGH: gene de cadeia pesada de imunoglobulina; IGL: gene de cadeia leve de imunoglobulina; não-IG: parceiro é outro gene que não o de imunoglobulinas [Adaptado de Karube K, Campo E. Semin Hematol. 2015; 52: 97–106 (referência 8)].

2.5 A expressão imunoistoquímica de C-MYC e BCL2 não se correlaciona com os rearranjos nos genes C-MYC e BCL2, respectivamente, mas pode trazer informações prognósticas úteis

Embora a técnica de FISH possa ser aplicada em cortes de tecidos parafinados ou em esfregaços citológicos, sua disponibilidade não é tão generalizada quanto a imunoistoquímica. Desta forma, tem se buscado avaliar o valor clínico da expressão imunoistoquímica de C-MYC e de BCL2 nos LDGCB e LBAG.

A **proteína C-MYC** é detectada em cerca de 30- 40% dos LDGCB, 60% dos LBAG, 70-100% dos linfomas de Burkitt e em 5% de células B normais de centros germinativos. A **proteína BCL2** é detectada em 50% dos LDGCB, 75% dos LBAG, porém não no linfoma de Burkitt ou em células B normais de centros germinativos ¹⁴.

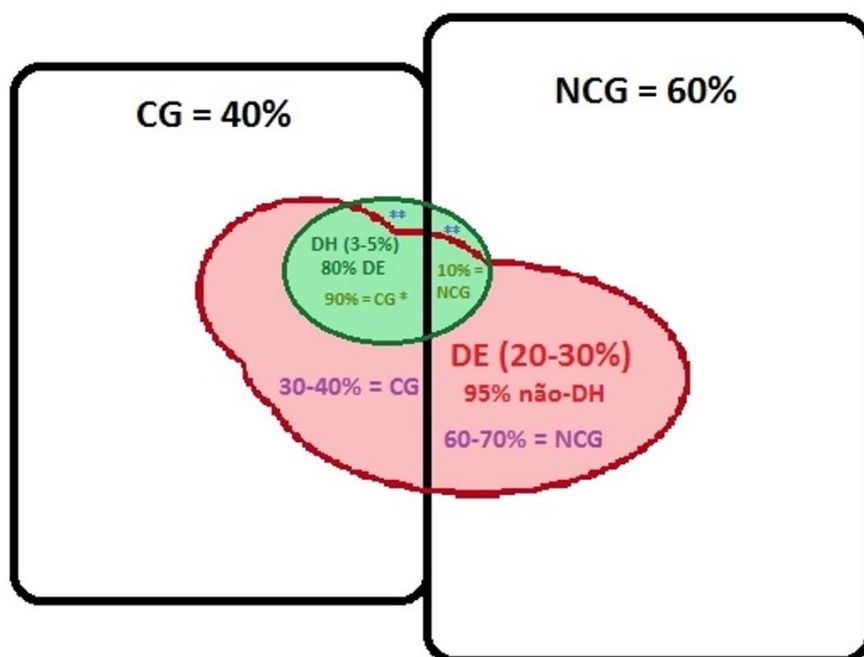
Para que os diagnósticos tenham reprodutibilidade, é necessário padronizar um valor de corte para considerar o caso positivo. Os estudos têm variado nesse valor, porém a OMS-2016 padronizou um valor >40% para C-MYC e >50% para BCL2. Os diversos estudos têm mostrado que 20-35% dos LDGCB são concomitantemente imunopositivos para ambas as proteínas (chamados de **DE, duplo expressores**, em inglês, *double expressors*). Dos linfomas DE, a maioria corresponde ao tipo NCG (60-70%). Por outro lado, a frequência de dupla translocação (DH, *double-hit*) é de apenas 3-5% e, destes, 90% são do tipo CG ¹⁴. Inversamente, 20% dos linfomas DH não são DE.

Embora não haja correspondência entre o FISH e a imunoistoquímica, os estudos têm mostrado alta significância no valor prognóstico desfavorável do grupo DE ¹⁵. Além disto, utilizando-se

ambas as técnicas para detectar alterações de C-MYC e BCL2, foi proposto um modelo de relevância prognóstica ¹⁴:

- Grupo DH com translocação de C-MYC/IG **ou** DE + translocação só de C-MYC/IG (5% dos pacientes no estudo): altíssimo risco;
- Grupo DH com translocação de C-MYC/não-IG **ou** DE sem translocação de C-MYC (25-30% dos pacientes no estudo): risco intermediário;
- Grupo DH sem DE **ou** não-DE (65-70% dos pacientes no estudo): risco baixo.

A validação deste modelo para aplicação rotineira nos LDGCB necessita de confirmação por autores independentes (Figuras 2 e 3).



* DH: 90% são CG, sendo a maior parte t(MYC) e t(BCL2). O restante, correspondente aos t(MYC;BCL6) e triple-hit, apresentam distribuição equilibrada entre CG e NCG.

** DH não-DE: 20%.

Figura 2: Esquema da caracterização molecular dos linfomas B agressivos (não-Burkitt). Adaptado de Li S et al. 2018 (referência 9)

- 40% dos linfomas B agressivos são do tipo CG (centro germinativo); cerca de 60% são NCG (não centro germinativo).
- Os linfomas DE (duplo expressores imunoistoquímicos de MYC e BCL2) correspondem a 20-30% dos linfomas B agressivos. Destes, a maioria (60-70%) são do grupo NCG e 30-40% são do grupo CG. A dupla expressão imunoistoquímica de C-MYC e BCL2 tem valores de corte >40% e >50%, respectivamente.
- Os linfomas DH (Double hit – dupla ou tripla translocação de MYC + BCL2 e/ou BCL6) correspondem a cerca de 3-5% dos linfomas B agressivos. Destes, 90% são do grupo CG e 10% do grupo NCG. Os casos DH com participação apenas de MYC+BCL2 são quase exclusivamente do tipo CG. Casos DH com participação do BCL6 estão distribuídos entre os tipos CG e NCG.
- Dos linfomas DH, 80% são também DE. Cerca de 20% dos casos DH não são DE. Dos linfomas DE, 95% não são DH.
- As porcentagens são apenas indicativas e variam segundo os estudos pesquisados.

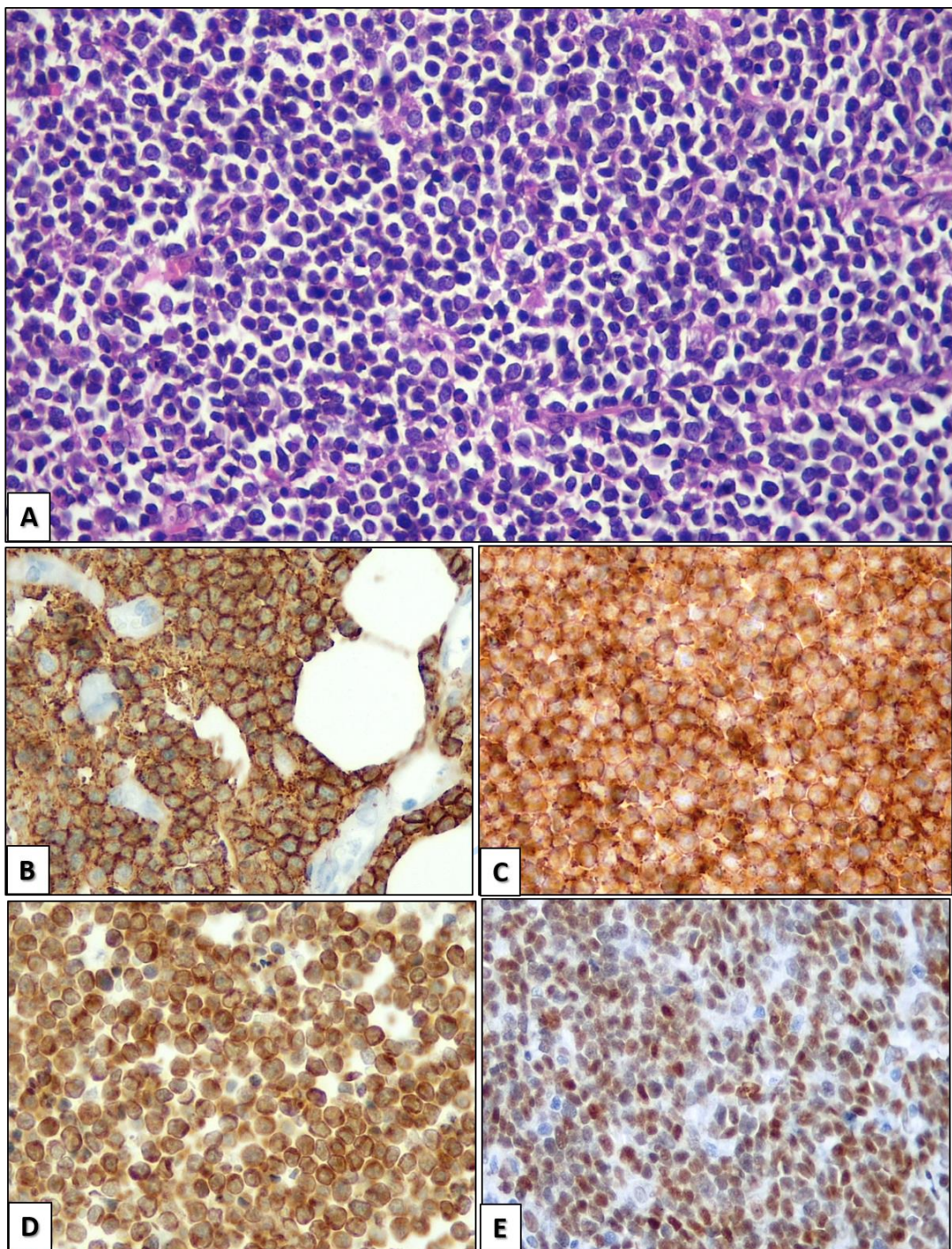


Figura 3: Exemplo de linfoma de grandes células B de alto grau. Notar a monotonia das células neoplásicas, de tamanho médio (A, HE). As células neoplásicas expressam CD20 (B), CD10 (C), BCL2 (D) e C-MYC (E). No presente caso, a pesquisa das translocações de C-MYC e BCL2 resultou positiva (não mostrada nas imagens), configurando um linfoma Double hit (DH).

2.6 Outros marcadores de valor clínico nos LDGCB: CD5, CD30, EBV

A **expressão de CD5** em neoplasias linfoides B é característica de duas entidades: a leucemia linfóide crônica/ linfoma linfocítico e o linfoma de células do manto. Outros linfomas B expressam raramente esse marcador. Em um estudo incluindo 130 pacientes com LDGCB, 12% foram CD5+. Não houve características clinicopatológicas divergentes nos dois grupos, incluindo a sua distribuição nos tipos CG e NCG. A recaída no sistema nervoso central foi significativamente mais alta nos casos com expressão de CD5, e esse marcador foi independentemente associado a sobrevida menos favorável ¹⁶. Nestes casos, é fundamental realizar o diagnóstico diferencial com a forma blastoide ou, mais raramente, com a forma polimórfica do linfoma de células do manto. A expressão de ciclina D1 e/ou a presença da translocação t(11;14) pela técnica de FISH permitem a conclusão por este diagnóstico.

Nas diferentes casuísticas, para ser considerado um **LDGCB com expressão de CD30**, tem-se considerados valores de corte para células positivas para esse marcador de >0% até valores mais altos. Em um estudo, a frequência de expressão desse marcador foi de 25% (considerada qualquer positividade >0%) e 12% (considerada expressão em mais de 20% das células neoplásicas). Nesse estudo, a expressão de CD30 não apresentou valor prognóstico, independentemente do ponto de corte utilizado ¹⁷. No entanto, a informação da porcentagem de células CD30 positivas num LDGCB deve ser reportada no laudo do Patologista, para ser utilizada pelo clínico com finalidade de indicação terapêutica, já que essa molécula é potencial alvo. Além disto, há estudos que atribuem prognóstico favorável aos LDGCB com expressão de CD30.

Pacientes com **LDGCB relacionado ao EBV** tendem a ser diagnosticados em faixas etárias mais avançadas, apresentarem IPI mais elevado, com maiores taxas de envolvimento extranodal, maior porcentagem de DHL elevada, estádios clínicos mais avançados e estado geral menos favorável. Não é surpreendente que esta condição esteja relacionado a pior sobrevida. Em relação à sua biologia, a maior parte corresponde ao tipo NCG. Ainda não está estabelecido um valor de corte para se considerar o linfoma como relacionado ao EBV. Foram reportados critérios como um mínimo de 10-50% considerando positividade viral na célula neoplásica. Seu diagnóstico diferencial pode ser desafiador e inclui outras entidades associadas ao EBV, como a linfoproliferação do imunocomprometido associada ao EBV, linfoma plasmoblástico, granulomatose linfomatoide, linfoma associado à infecção crônica e úlcera mucocutânea associada ao EBV ¹⁸.

3. Conclusão

- a) Os LDGCB representam um grupo frequente de LNH e são heterogêneos dos pontos de vista morfológico e molecular.
- b) Sua caracterização imunoistoquímica deve incluir um painel básico amplo: CD20, CD3, CD5, CD10, BCL6, MUM1, CD30, BCL2, C-MYC, Ki67, proteína p53 e pesquisa de EBV por hibridização *in situ*.
- c) Se não houver possibilidade de utilização de GEP para classificar a neoplasia de acordo com a célula de origem (centro germinativo x não centro germinativo), sugere-se utilizar, por exemplo, o algoritmo de Hans.
- d) A imunoistoquímica para C-MYC e BCL2 fornece informação prognóstica relevante, porém não substitui o FISH para pesquisar as translocações desses genes, também clinicamente importante.

4. Referências

1. Swerdlow SH et al. **Blood**. 2016; 127(20): 2375-2390.
2. Alizadeh AA et al. **Nature**. 2000; 403(6769): 503-511.
3. Mareschal S et al. **Haematologica**. 2011; 96(11): 1888-1890.
4. Jaffe ES et al (Eds.) **Hematopathology**. 2nd Ed., 2017. Elsevier (Philadelphia, PA, USA).
5. Hans CP et al. **Blood**, 2004; 103: 275-282.
6. Gutiérrez-García G et al. **Blood**. 2011; 117(18): 4836-4843.
7. De Jonge et al. **Eur J Cancer**. 2016; 55: 140-146.
8. Karube K, Campo E. **Semin Hematol**. 2015; 52: 97-106.
9. Li S et al. **Pathology**. 2018; 50(1): 74-87.
10. Haberl S et al. **Cancer Genetics**. 2016; 209: 431-439.
11. Wang W et al. **Am J Surg Pathol**. 2015; 39:1132-1139.
12. Iqbal J et al. **Leukemia**. 2007; 21(11): 2332-2343.
13. Capello D et al. **Blood**. 2000; 95: 651-659.
14. Sesques P, Johnson NA. **Blood**. 2017; 129(3): 280-288.
15. Steiger AM et al. **J Clin Oncol**. 2017; 35: 2515-2526.
16. Thakral B et al. **Eur J Haematol**. 2017; 98: 415-421.
17. Xu J et al. **Human Pathology**. 2017; 60: 160-166.
18. Castillo JJ et al. **Am J Hematol**. 2018; 93: 953-962.