HENRIQUE MOURA DE PAULA

Linfoma difuso de grandes células B, SOE *de novo*:
significado prognóstico de algoritmos e
biomarcadores imuno-histoquímicos em pacientes
tratados com esquema CHOP-simile e rituximab

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientador: Profa. Dra. Maria Cláudia Nogueira Zerbini

São Paulo

2016

HENRIQUE MOURA DE PAULA

Linfoma difuso de grandes células B, SOE *de novo*:
significado prognóstico de algoritmos e
biomarcadores imuno-histoquímicos em pacientes
tratados com esquema CHOP-simile e rituximab

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientador: Profa. Dra. Maria Cláudia Nogueira Zerbini

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Paula, Henrique Moura de

Linfoma difuso de grandes células B, SOE *de novo* : significado prognóstico de algoritmos e biomarcadores imuno-histoquímicos em pacientes tratados com esquema CHOP-simile e rituximab / Henrique Moura de Paula. -- São Paulo, 2016.

Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.

Orientador: Maria Cláudia Nogueira Zerbini.

Descritores: 1.Antígenos CD30 2.Biomarcadores 3.Classificação 4.Imuno-histoquímica 5.Linfoma difuso de grandes células B 6.Prognóstico 7.Proteínas proto-oncogênicas c-bcl-2 8.Proteínas proto-oncogênicas c-myc 9.Rituximab

USP/FM/DBD-164/16

Dedicatória

Aos meus amados pais, Élbio e Sílvia Lêda, pelo amor e apoio incondicional, e sobretudo pelo exemplo de vida profissional e familiar.

A minha amada esposa, namorada, amiga e parceira, Juliê, por sua compreensão, orientação, dedicação e amor.

Ao meu filho amado, Gregório, pela sua chegada que transformou minha vida e pela benção que é poder viver ao seu lado.

Ao paciente portador de linfoma, pelo seu exemplo de coragem e disposição de lutar pela vida, que motivaram este estudo e impulsionam minha busca pelo conhecimento.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Maria Cláudia Nogueira Zerbini, minha mentora e orientadora, por toda sua paciência, compreensão, disposição e disponibilidade.

À Profa. Dra. Sheila Aparecida Coelho Siqueira, minha mentora e apoiadora, por todos ensinamentos e pelo carinho que sempre me dispensou.

À Profa. Dra. Juliana Pereira, por ter acreditado e apoiado este projeto, e pela sua contribuição na minha formação.

À Profa. Dra. Vera Lúcia Aldred, por todos os seus ensinamentos e sua disposição, que foram fundamentais na minha formação.

Aos meus colegas hematologistas, Dra. Flávia Dias Xavier, Dr. Luís Alberto de Pádua Covas Lage e Dra. Renata de Oliveira Costa, pela contribuição com os informes clínicos e resolução de dúvidas que surgiram durante a execução deste projeto.

À equipe técnica da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, que foi fundamental para execução deste estudo, realizando todas as tarefas com presteza e qualidade.

Aos meus colegas patologistas do Laboratório CAPC e do Hospital Araújo Jorge, pela compreensão com minhas ausências e apoio para a realização deste sonho.

À minha família, Fátima, Isabela, Eduardo, Gabriela, Daniella, Tomás, Mateus, Emanuella, Élbio Neto e João, pelo amor e suporte.

À minha segunda família, Sérgio, Maysa, José, Cristiane, Daniel, Maria Cecília e Ana Luiza, pelo carinho e cuidado que sempre tiveram comigo.

“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar.”

Anatole France

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

Lista de siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Linfoma difuso de grandes células B (LDGCB).....	1
1.2 Estadiamento e avaliação de resposta terapêutica	6
1.3 Estratificação de risco clínico.....	13
1.3.1 Índice Prognóstico Internacional (IPI).....	13
1.3.2 Índice Prognóstico Internacional revisado (R-IPI).....	15
1.4 Estratificação de risco biológico.....	16
1.4.1 Estudos do perfil de expressão gênica/Subgrupos moleculares.....	17
1.4.2 Algoritmos imuno-histoquímicos/Subgrupos imuno-histoquímicos.....	25
1.4.2.1 Algoritmo de <i>Hans</i>	26
1.4.2.2 Algoritmo de <i>Choi</i>	28
1.4.2.3 Algoritmo de <i>Visco-Young</i>	31
1.4.2.4 Algoritmo de <i>Muris</i>	34
1.4.2.5 Algoritmo de <i>Nyman</i>	35
1.4.3 Biomarcadores.....	37
1.4.3.1 CD30.....	38
1.4.3.2 BCL2.....	40
1.4.3.3 MYC.....	41
1.4.3.4 Coexpressão BCL2 e MYC/Linfoma <i>Duplo-expressor</i>	44
2 OBJETIVOS.....	48
3 MÉTODOS.....	49
3.1 Seleção dos pacientes.....	49
3.2 Avaliação morfológica.....	50
3.3 Estudo imuno-histoquímico.....	51
3.4 Hibridização <i>in situ</i> (HIS) para vírus Epstein Barr (EBV).....	54
3.5 Análise estatística.....	55

4 RESULTADOS.....	57
4.1 Características clínicas e evolução.....	57
4.2 Estratificação de risco clínico.....	60
4.3 Estudo IHQ e HIS para EBV/EBER.....	61
4.3.1 Algoritmos IHQ/Subgrupos IHQ do LDGCB.....	63
4.3.1.1 Subgrupos IHQ e valor prognóstico.....	64
4.3.1.2 Correlação entre os algoritmos IHQ.....	64
4.3.2 Biomarcadores.....	65
4.3.2.1 CD30.....	65
4.3.2.2 BCL2.....	66
4.3.2.3 MYC.....	67
4.3.2.4 Coexpressão BCL2 e MYC/Linfoma <i>Duplo-expressor</i> (LDE).....	69
5 DISCUSSÃO.....	74
6 CONCLUSÕES.....	86
7 ANEXOS.....	87
8 REFERÊNCIAS.....	97
Apêndice	

LISTA DE SIGLAS

ALK	<i>Anaplastic lymphoma kinase</i>
BAG	Biópsia por agulha grossa
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL6	<i>B-cell lymphoma 6</i>
BCR	Receptor de célula B
BMO	Biópsia de medula óssea
BX	Biópsia
BXe	Biópsia excisional
BXi	Biópsia incisional
CARD11	<i>Caspase recruitment domain family member 11</i>
CBA	Subgrupo molecular célula B ativada símile
CD79 B/A	<i>Cluster of differentiation 79 B/A</i>
CDFs	Células dendríticas foliculares
CDFs	Células dendríticas foliculares
CDKN1	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>
cDNA	Ácido desoxirribunucleico complementar
CF	Citometria de fluxo
CG	Subgrupo molecular célula B centrogerminativa símile
CGA	Campo de grande aumento
CHOP	Ciclofosfamida, vincristina, doxorrubicina e prednisona
DAP	Divisão de Anatomia Patológica
DE	Doença estável
DHL	Desidrogenase láctica
DP	Doença progressiva
EBV	Vírus Epstein-Barr
ECOG	<i>Eastern Clinical Oncology Group</i>
EUA	Estados Unidos da América
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i>
FDG	2-F18-fluoro-2-deoxi-glicose
FISH	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente

GCB	Subgrupo imunofenotípico célula B centrogerminativa símile
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo
HHV-8	Herpesvirus humano-8
HIS	Hibridização <i>in situ</i>
HRS	Célula de Reed-Sternberg
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
IHQ	Estudo imuno-histoquímico
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPI	Índice Prognóstico Internacional
IRAK-4	<i>Interleukin-1 receptor kinase 4</i>
IRF-4	<i>Interferon regulatory factor 4</i>
JAK	<i>Janus activating kinase</i>
LB	Linfoma de Burkitt
LBI-LDGCB/LB	Linfoma de células B inclassificável com características intermediárias entre o LDGCB e o Linfoma de Burkitt
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LDE	Linfoma <i>duplo-expressor</i>
LDGCB	Linfoma difuso de grandes células B
LDH	Linfoma <i>double-hit</i>
LF	Linfoma folicular
LGCA	Linfoma de grandes células anaplásicas
LGCB-Med	Linfoma de grandes células B do mediastino/tímico
LH	Linfoma de Hodgkin
LLC/LL	Leucemia linfóide crônica/Linfoma linfocítico
LNH	Linfoma não-Hodgkin
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MO	Medula óssea
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MYC	<i>V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
MYD88	<i>Myeloid of differentiation primary response 88</i>

NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cell</i>
NGCB	Subgrupo imunofenotípico célula B não-centrogerminativa símile
NLDE	Linfoma não <i>duplo-expressor</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PEG	Estudo do perfil de expressão gênica
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
R-CHOP	Rituximab, ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina e prednisona
R-IPI	Índice Prognóstico Internacional revisado
RC	Remissão completa
RCu	Remissão completa não confirmada
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
RP	Remissão parcial
RTCE	Radioterapia de campo envolvido
RTNF	Receptor do fator de necrose tumoral
SG	Sobrevida Global
SLE	Sobrevida livre de eventos
SNC	Sistema nervoso central
SNG	Sequenciamento gênico de nova geração
TC	Tomografia computadorizada
TFFP	Tecido fixado em formalina e incluído em parafina
TGI	Trato gastrointestinal
TMA	<i>Tissue microarray</i>
TNFAIP3	<i>Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3</i>
TP53	<i>Tumor protein p53</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Expressão gênica monitorada com uso de microarrays de cDNA.....	18
Figura 2. Agrupamento hierárquico dos dados de expressão gênica da análise de 128 microarrays.....	19
Figura 3. Subgrupos moleculares de LDGCB.....	20
Figura 4. Relação entre os subgrupos moleculares de LDGCB e o modelo preditor de resposta.....	22
Figura 5. LDGCB CG: as vias moleculares implicadas na oncogênese e progressão da doença, e os possíveis alvos terapêuticos.....	24
Figura 6. LDGCB CBA: as vias moleculares implicadas na oncogênese e progressão da doença, e os possíveis alvos terapêuticos.....	25
Figura 7. Árvore de decisão do algoritmo imuno-histoquímico de <i>Hans</i>	27
Figura 8. Árvore de decisão do algoritmo imuno-histoquímico de <i>Choi</i>	30
Figura 9. Árvore de decisão do algoritmo imuno-histoquímico de <i>Visco-Young</i>	32
Figura 10. Árvore de decisão do algoritmo imuno-histoquímico de <i>Muris</i>	35
Figura 11. Árvore de decisão do algoritmo imuno-histoquímico de <i>Nyman</i>	36
Figura 12. Aspecto morfológico de casos de linfoma difuso de grandes células B, SOE de novo incluídos no grupo de estudo.....	50
Figura 13. Curva de Kaplan-Meier estimando sobrevida global dos pacientes com LDGCB diagnosticados entre agosto de 2008 e agosto de 2011, tratados com imunoquimioterapia padrão.....	60

Figura 14. Curvas de Kaplan-Meier, estimativa de sobrevida global de acordo com modelos clínicos de estratificação de risco, nos pacientes com LDGCB tratados com imunoquimioterapia padrão.....	61
Figura 15. Variação da positividade nas células tumorais dos marcadores estudados.....	62
Figura 16. Grau de concordância entre os cinco algoritmos IHQ estudados....	64
Figura 17. Estudo imuno-histoquímico com avaliação da expressão do CD30 em casos de linfoma difuso de grandes células B, SOE de novo incluídos no grupo de estudo.....	65
Figura 18. Curvas de Kaplan-Meier da sobrevida global de pacientes com LDGCB e tratados com imunoquimioterapia, de acordo com a expressão do CD30.....	66
Figura 19. Estudo imuno-histoquímico com avaliação da expressão do BCL2 em casos de linfoma difuso de grandes células B, SOE de novo incluídos no grupo de estudo.....	67
Figura 20. Estudo imuno-histoquímico com avaliação da expressão do MYC em casos de linfoma difuso de grandes células B, SOE de novo incluídos no grupo de estudo.....	68
Figura 21. Curvas de Kaplan-Meier da sobrevida global de pacientes com LDGCB e tratados com imunoquimioterapia, de acordo com o fenótipo LDE.....	71
Figura 22. Curvas de Kaplan-Meier da sobrevida global de pacientes com LDGCB e tratados com imunoquimioterapia, de acordo com o fenótipo LDE e IPI.....	72

Figura 23. Curvas de Kaplan-Meier da sobrevida global de pacientes com LDGCB e tratados com imunoquimioterapia, de acordo com os subgrupos de risco segundo o fenótipo LDE e o IPI.....73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. LDGCB: variantes, subgrupos e subtipos/entidades.....	2
Tabela 2. Critérios para definição de sítios envolvidos.....	8
Tabela 3. Classificação de Ann Arbor modificada.....	10
Tabela 4. Critérios de resposta terapêutica.....	11
Tabela 5. Status funcional pelo ECOG.....	14
Tabela 6. Evolução clínica/Grupos de risco definidos pelo IPI.....	15
Tabela 7. Evolução clínica baseado no IPI e R-IPI.....	16
Tabela 8. Algoritmos imuno-histoquímicos para classificação do LDGCB e os marcadores utilizados para definir a origem celular (GCB vs. NGCB).....	37
Tabela 9. Dados técnicos dos anticorpos estudados.....	52
Tabela 10. Características clínicas entre os pacientes do grupo de estudo.....	59
Tabela 11. Distribuição da classificação IHQ do LDGCB segundo diferentes algoritmos estudados e estimativa de sobrevida em pacientes tratados com imunoquimioterapia.....	63
Tabela 12. Características clínicas e imunofenótípicas de pacientes com LDGCB tratados com imunoquimioterapia em relação ao fenótipo linfoma <i>duplo-expressor</i> (LDE).....	70
Tabela 13. Estudos com algoritmos imuno-histoquímicos para classificação do LDGCB (GCB vs. NGCB) com lista de anticorpos/clones e diluição utilizados.....	76
Tabela 14. Estudos com avaliação do fenótipo LDE em pacientes com LDGCB.....	82

RESUMO

Paula HM. *Linfoma difuso de grandes células B, SOE de novo: significado prognóstico de algoritmos e biomarcadores imuno-histoquímicos em pacientes tratados com esquema CHOP-símile e rituximab* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

INTRODUÇÃO: O linfoma difuso de grandes células B, sem outras especificações (LDGCB, SOE) é uma neoplasia agressiva caracterizada pela heterogeneidade morfológica, imunofenotípica e molecular, porém o atual tratamento padrão utilizando imunoquimioterapia (R-CHOP) não considera tal diversidade. Há percentual significativo de pacientes que são refratários à terapia de primeira linha e alguns que apresentam recidiva precoce ou tardia, os quais representam as vítimas desta doença. O estudo imuno-histoquímico (IHQ), que é um método simples e universalmente disponível, vem sendo utilizado para reconhecer a diversidade biológica do LDGCB, SOE, identificando biomarcadores e subgrupos distintos da doença, que poderiam prever a resposta terapêutica ao tratamento padrão e apontar possíveis candidatos a novas estratégias terapêuticas. OBJETIVOS: Este estudo avalia o valor prognóstico de cinco algoritmos para classificação do LDGCB segundo a célula de origem (COO) e da expressão de três biomarcadores (BCL2, CD30 e MYC) tendo como *endpoint* a sobrevida global. MÉTODOS: Foi realizado estudo retrospectivo com setenta e nove pacientes com LDGCB, SOE *de novo* tratados com imunoquimioterapia padrão, estadiados e acompanhados protocolarmente. Os casos foram classificados como subgrupo célula B centrogerminativa símile (GCB) ou como subgrupo célula B não-centrogerminativa símile (NGCB), de acordo com três algoritmos IHQ (*Hans*,

Choi, e *Visco-Young*) pareados com estudo do perfil de expressão gênica (PEG) e dois algoritmos IHQ não-PEG pareados (*Muris* e *Nyman*). Foi estimado o valor prognóstico destes algoritmos e também avaliado a concordância entre eles. O valor prognóstico da expressão do BCL2, CD30 e MYC utilizando IHQ também foi analisado. RESULTADOS: Os algoritmos IHQ PEG pareados revelaram maior concordância entre si, porém nenhum deles revelou força prognóstica. A expressão do CD30 mostrou tendência a melhor prognóstico, porém a expressão de BCL2 e MYC avaliados isoladamente não revelaram impacto prognóstico. Contudo, a coexpressão do BCL2 e MYC, denominado como fenótipo *linfoma duplo-expressor* (LDE), revelou-se importante marcador prognóstico desfavorável. Foram identificados três subgrupos de risco baseado no fenótipo LDE e o Índice Prognóstico Internacional (IPI). CONCLUSÃO: Em pacientes com LDGCB, SOE *de novo* tratados com esquema terapêutico padrão, a pesquisa da expressão do fenótipo LDE é mais relevante do ponto vista prognóstico que a classificação em subgrupo GCB ou NGCB. Além disso, a expressão do CD30 pode ser relevante tanto para identificar subgrupo com tendência a melhor prognóstico como para identificar possíveis candidatos a nova terapia alvo.

Palavras-chave: antígenos CD30; biomarcadores; classificação; imunohistoquímica; linfoma difuso de grandes células B; prognóstico; proteínas proto-oncogênicas c-bcl-2, proteínas proto-oncogênicas c-myc; rituximab.

ABSTRACT

Paula HM. *Diffuse large B-cell lymphoma, NOS de novo: prognostic significance of immunohistochemical algorithms and biomarkers in patients treated with rituximab plus a CHOP-like regimen* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

BACKGROUND: Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified (DLBCL, NOS) is an aggressive neoplasm characterized by morphological, phenotypic and molecular heterogeneity, but the current standard therapy using immunochemotherapy (R-CHOP) does not consider such diversity. There is a significant percentage of patients who are refractory to first-line therapy and those with early or late recurrence, whose represent the victims of this disease. Immunohistochemistry (IHC), a simple and universally available method, has been used to recognize the biological diversity of DLBCL, NOS, to identify biomarkers and distinct subgroups of the disease, which would predict the therapeutic response to standard treatment and point possible candidates for novel therapeutic strategies. OBJECTIVES: The current study was conducted to evaluate the prognostic value from five algorithms for classification of DLBCL based on cell of origin (COO) and the expression of three biomarkers (BCL2, CD30 and MYC) with overall survival (OS) as an endpoint. METHODS: We retrospectively evaluated seventy nine patients with *de novo* DLBCL, NOS treated with R-CHOP-like immunochemotherapy. The cases were assigned as germinal center B-cell like (GCB) or non-GCB subgroup (NGCB) according to five different IHC algorithms, including three algorithms based on gene expressing profile study (GEP), proposed by *Hans, Choi*, and *Visco-Young*, and

two non-GEP based algorithms proposed by *Muris*, and *Nyman*. We evaluated their prognostic relevance and the concordance between these algorithms. The prognostic power of BCL2, CD30 and MYC expression were also assessed by IHC. RESULTS: None of the profiles assessed by IHC algorithms was able to predict overall survival (OS). The positive expression of CD30 showed a trend toward a better outcome. Neither the positive expression of BCL2 nor the positive expression of MYC were associated with outcome. However, the *double-expressor lymphoma* phenotype (DEL), represented by the concurrent expression of MYC and BCL2, exhibited a negative prognostic impact. Three different risk subgroups were identified based on the DEL phenotype and the International Prognostic Index (IPI) score. CONCLUSIONS: These data suggest that the DEL, rather than the cell of origin classification based on IHC, is a better predictor of OS in patients with DLBCL treated with R-CHOP-like immunochemotherapy. Besides, the CD30 expression may be a useful prognostic marker and a possible therapeutic target.

Keywords: antigens, CD30; biomarkers; classification; diffuse large B-cell lymphoma; immunohistochemistry; prognosis; proto-oncogene proteins c-bcl-2; proto-oncogene proteins c-myc; rituximab.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Linfoma difuso de grandes células B

Os Linfomas não-Hodgkin (LNH) representam um grupo heterogêneo de neoplasias malignas de células linfóides B e T/NK, que no Brasil em 2013 foram responsáveis por 4033 mortes (2231 homens e 1802 mulheres), com expectativa de incidência de 10240 casos novos em 2016 (5210 homens e 5030 mulheres), segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA).¹ As neoplasias de células linfóides B, também conhecidas como linfomas de células B, são responsáveis por cerca de 90% dos casos de linfoma. Estas representam 4% dos casos de câncer anualmente, com incidência crescente, apresentando mais de 280.000 casos por ano em todo mundo. Entre os LNH, o Linfoma difuso de grandes células-B (LDGCB) é o mais frequente, responsável por 37% dos casos.² No Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) representa 49,7% de todos os casos de LNH atendidos no período.³

Antigamente, o LDGCB representava diversas entidades agrupadas com base apenas em características morfológicas, caracterizado pela presença de células linfóides neoplásicas grandes, as quais exibem duas vezes ou mais o tamanho dos linfócitos pequenos, e usualmente sendo maiores que histiócitos.⁴ Entretanto, desde 1994 com a criação da classificação *REAL (Revised European-American classification of lymphoid neoplasms)*⁵, características imunofenotípicas e genéticas foram incorporadas na definição das entidades. Posteriormente, com as propostas da Organização Mundial de Saúde (OMS)

publicadas em 2001⁶ e 2008⁷, conceitos patogenéticos e clínicos foram agregados, e assim reconhecidos diferentes subtipos de LDGCB. Atualmente, além do LDGCB, sem outras especificações (LDGCB, SOE) e suas variantes, são conhecidos outros 4 subtipos de LDGCB, 8 linfomas de grandes células-B (LGCB) e outras 2 entidades provisórias caracterizadas por células linfóides B grandes (Tabela 1).

Tabela 1. LDGCB: variantes, subgrupos e subtipos/entidades

LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS-B, SEM OUTRAS ESPECIFICAÇÕES (SOE)
<i>Variantes morfológicas comuns</i>
Centroblástica
Imunoblástica
Anaplásica
<i>Variantes morfológicas raras</i>
<i>Subgrupos moleculares</i>
Célula B do centro germinativo simile (CG)
Célula B ativada simile (CBA)
<i>Subgrupos Imuno-histoquímicos</i>
Linfoma Difuso de Grandes Células B CD5-positivo
Célula B do centro germinativo simile (GCB)
Célula B não-centro germinativa simile (NGCB)
SUBTIPOS DE LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS-B
Linfoma de Grandes Células B rico em células T/Histiócitos
Linfoma Difuso de Grandes Células B primário do Sistema Nervoso Central
Linfoma Difuso de Grandes Células B primário da pele, do tipo perna
Linfoma Difuso de Grandes Células B EBV positivo, do idoso
OUTROS LINFOMAS DE GRANDES CÉLULAS-B
Linfoma de Grandes Células B primário do mediastino (Tímico)
Linfoma de Grandes Células B Intravascular
Linfoma Difuso de Grandes Células B associado a Inflamação cornice
Linfoma Difuso de Grandes Células B ALK positivo
Granulomatose Linfomatóide
Linfoma Plasmoblástico
Linfoma Primário de Efusões
Linfoma de Grandes Células B associado a Doença de Castleman Multicêntrica HHV8 positivo
CASOS INTERMEDIÁRIOS
Linfoma de Células B não-classificável, com características intermediárias entre LDGCB e Linfoma de Burkitt
Linfoma de Células B não-classificável, com características intermediárias entre LDGCB e Linfoma de Hodgkin Clássico

FONTE: IARC, 2008.

ALK: Anaplastic Lymphoma Kinase, EBV: vírus Epstein-Barr, HHV-8: Herpesvirus Humano-8

O LDGCB, SOE representa todos os casos de LNH de grandes células B que não preenchem os critérios diagnósticos tanto para os subtipos especiais de LDGCB como para os outros LNH de grandes células-B. A maioria dos casos de LDGCB, SOE são *de novo*, porém existem os casos transformados de LNH indolentes. Estes podem ser primários nodais ou extranodais, assim como podem acometer qualquer faixa etária e qualquer sexo, porém são mais comuns em homens e idosos (idade mediana: 7ª década). Em geral são neoplasias malignas agressivas e potencialmente curáveis.^{8,9}

O diagnóstico morfológico é definido pela obliteração parcial ou total da histoarquitetura do órgão envolvido, devido a infiltrado linfóide de células grandes, as quais podem exibir aspecto centroblastico (núcleos centrais, redondos-ovais, cromatina dispersa e múltiplos pequenos nucléolos próximos à membrana nuclear), imunoblastico (núcleos discretamente excêntricos, nucléolos únicos ou múltiplos, proeminentes, por vezes com aspecto similar a inclusões nucleares), anaplásico (células redondas, ovais ou poligonais, com núcleos pleomórficos e bizarros) ou formas mais raras como fusiforme ou sinetoide⁹. Usualmente apresentam padrão difuso de infiltração, porém podem exibir padrão irregular, sinusoidal, interfolicular ou nodular, sendo que estas áreas nodulares diferem dos casos de Linfoma folicular (LF) por serem focais e grandes, além de não apresentarem a trama de células dendríticas foliculares (CDFs) características dos casos de LF. Há quantidade variável de células inflamatórias de permeio, como linfócitos T pequenos, histiócitos, plasmócitos e eosinófilos.¹⁰

As células neoplásicas expressam antígenos associados a células B maduras, CD19, CD20, CD22 e CD79a, com imunoglobulina na superfície

celular (IgS+/-) e não imunoglobulina citoplasmática (IgC-/+). A expressão do CD20 é especialmente relevante, não apenas para o diagnóstico, mas também por ser alvo terapêutico de anticorpo monoclonal humanizado que revolucionou o tratamento do LDGCB, chamado rituximab.⁹

O tratamento padrão para os casos de LDGCB é baseado em uso de antracíclicos desde a década de 70. O esquema quimioterápico composto por ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona (CHOP) associado ou não a radioterapia foi a terapia padrão por mais de 25 anos. Nos casos localizados, definidos por estágio I de Ann Arbor ou estágio II sem doença “bulky” (tumor menor que 10 cm de diâmetro) ou sintomas sistêmicos, apresentavam taxas de remissão completa (RC) de 95% e probabilidade de cura em 5 anos de 80-90% em pacientes tratados com radioterapia de campo envolvido (RTCE) associado a quimioterapia com esquema CHOP ou CHOP-simile. Já os pacientes com doença avançada, definida por estágio II de Ann Arbor com doença “bulky” ou estágios III ou IV, quando tratados com esquema CHOP associado ou não a RTCE, demonstravam 55-60% de RC e aproximadamente 33% de cura.¹¹

Ainda em meados dos anos 90, foi desenvolvido através de tecnologia recombinante o rituximab, que viria a impactar significativamente a terapêutica dos pacientes com LDGCB. O rituximab é um anticorpo monoclonal quimérico (humano/murino), criado com a fusão de domínios variáveis das cadeias leve e pesada do anticorpo monoclonal murino anti-CD20 2B8 com uma região constante da cadeia pesada de anticorpo humano.¹² Estudos in vitro sugeriram que o rituximab induz apoptose celular, lise celular mediada pelo sistema complemento e citotoxicidade celular anticorpo-dependente em linfócitos B.¹³

Em 2002, foram publicados os primeiros resultados de estudo randomizado comparando os esquemas CHOP associado a rituximab (R-CHOP) e CHOP em pacientes idosos (idade 60-80 anos), sem tratamento prévio, diagnosticados como LDGCB, estágios II, III ou IV de Ann Arbor e performance status de 0 a 2 segundo os critérios da *Eastern Clinical Oncology Group* (ECOG). Este estudo, *Lymphome Non Hodgkinien study 98-5* (LNH98-5), foi conduzido em 86 diferentes centros na França, Bélgica e Suíça, sendo avaliados 398 pacientes no total (202 randomizados para o subgrupo tratado com R-CHOP e 196 para o subgrupo tratado com CHOP). Após acompanhamento mediano de 24 meses, observou-se que o subgrupo tratado com esquema R-CHOP apresentou redução de 42% no risco de eventos (progressão, recidiva ou morte), melhora nas taxas de resposta (RC 76% vs. 63%, p 0,005), e melhora na sobrevida global (SG) (70% vs. 57%, p 0,007).¹⁴ Este estudo foi atualizado após 5 e 10 anos de acompanhamento, mantendo os benefícios originalmente observados.^{15,16}

Já o *MabThera International Trial (MInT) Group study* publicado em 2006, também comparou os esquemas R-CHOP e CHOP em pacientes com LDGCB, porém mais jovens (18-60 anos) e com características de bom prognóstico.¹⁷ Este estudo revelou após acompanhamento mediano de 34 meses que a utilização de R-CHOP aumentou a sobrevida livre de eventos (SLE) (79% vs. 59%, p<0,0001) e SG (93% vs. 84%, p 0,0001). Mesmo após 6 anos de acompanhamento os benefícios na SLE, sobrevida livre de progressão (SLP) e SG se mantiveram sem aumento no custo ou toxicidade.¹⁸

Estes estudos foram fundamentais para estabelecer a imunoquimioterapia com R-CHOP como o tratamento de primeira linha em

pacientes com LDGCB, o qual ainda se mantém até os dias de hoje. Apesar da significativa melhora na resposta terapêutica com a imunoquimioterapia, ainda há significativo percentual de pacientes que são refratários ao tratamento padrão, os quais frequentemente apresentarão progressão da doença e evoluirão para óbito. Portanto, a identificação precoce destes pacientes é fundamental para otimização do tratamento de primeira linha, assim como para o desenvolvimento de estratégias mais efetivas de resgate terapêutico.¹⁹

1.2 Estadiamento e avaliação da resposta terapêutica

O estadiamento define a localização e extensão da doença, que é útil como informação prognóstica, assim como serve de base para avaliar a resposta terapêutica e progressão da doença. É recomendado a utilização de tecnologias confiáveis e universalmente aplicáveis, que facilitam a comparação entre os pacientes e entre os resultados dos estudos clínicos, além de permitir a avaliação de resposta às novas terapias por agências reguladoras.

Os critérios para estadiamento foram desenvolvidos originalmente para casos de Linfoma de Hodgkin (LH), e em 1971 foi criada a classificação de Ann Arbor, que subdivide os pacientes em 4 diferentes estágios e subdivide em categorias A e B baseado na presença de sinais e sintomas como febre inexplicável maior que 38°C, perda de peso inexplicável maior que 10% nos últimos 6 meses e sudorese noturna.^{20,21} A classificação de Ann Arbor se mostrou relevante no estadiamento de pacientes com LH, porém devido a diversidade dos LNH e sua disseminação errática, esta revelou-se limitada nesta situação.²²

Os primeiros critérios de resposta terapêutica universalmente aceitos para os casos de LNH foram publicados pelo *National Cancer Institute Working Group* em 1999, com a definição de Remissão Completa (RC), Remissão Completa/não confirmada (RCu), Remissão Parcial (RP) e Progressão/Recidiva.²³

Contudo, recentemente Cheson et al. publicaram em 2014 as novas recomendações para avaliação inicial, estadiamento e estimativa de resposta terapêutica em pacientes com LH e LNH, incorporando ferramentas mais sensíveis como a tomografia por emissão de pósitrons (PET), que avalia a captação de 2-F18-fluoro-2-deoxi-glicose (FDG).²⁴

Nesta publicação, recomenda-se que o diagnóstico de linfoma seja realizado baseado em critérios morfológicos, imunofenotípicos e se necessários moleculares, com revisão do material por patologista com experiência na área. As biópsias incisional (BXi) ou excisional (BXe) com amostragem adequada de tecido neoplásico são preferíveis para a definição do diagnóstico inicial. Já a biópsia por agulha grossa (BAG) deve ser considerada apenas em casos em que a BXe não for factível ou em casos de recidiva tumoral, porém os casos de BAG com amostras não diagnósticas devem ser seguidas por BXe ou BXi.

A avaliação clínica inicial do paciente deve constar de história clínica completa, exame físico com avaliação de linfonodos e baço, exames laboratoriais para estratificação de risco e exames de imagem para definição dos sítios envolvidos pela doença (Tabela 2).

Tabela 2. Critérios para definição de sítios envolvidos

Sítio	Clínicos	Avidez FDG	Exame	Achados positivos
Linfonodos	Palpável	Doença FDG-ávida ¹	PET	Elevação da captação de FDG
		Doença não-ávida	TC	Aumento nodal inexplicável
Baço	Palpável	Doença FDG-ávida ¹	PET	Captção difusa de FDG, tumor solitário, lesões miliares, nódulos
		Doença não-ávida	TC	>13cm no eixo vertical, massa, nódulo
Fígado	Palpável	Doença FDG-ávida ¹	PET	Captção difusa de FDG, massa
		Doença não-ávida	TC	Nódulos
			TC	Lesão tumoral
SNC	Sinais, sintomas		RNM	Infiltração leptomeníngea, lesão tumoral
			LCR	Citologia, CF
Outros (TGI, pele, osso, MO, etc...)	Sítio dependente		PET, BX	Infiltração linfomatosa

FONTE: Cheson et al., 2014.²⁴

BX: biópsia; CF: citometria de fluxo; FDG: 2-F18-fluoro-2-deoxi-glicose; LCR: líquido cefalorraquidiano; MO: medula óssea; RNM: ressonância nuclear magnética; SNC: sistema nervoso central; TC: tomografia computadorizada; TGI: trato gastrointestinal.

O estadiamento anatômico deve ser baseado preferencialmente em estudos com PET nos casos de linfoma FDG-ávido, como por exemplo o LDGCB. A tomografia computadorizada (TC) deve ser utilizada como ferramenta de estadiamento naqueles casos que não são FDG-ávidos. Nos

¹ Doença FDG ávida: neoplasias linfoides hipermetabólicas com alta avidéz para FDG.

casos de linfomas nodais ou LDGCB extranodal que forem estadiados com PET, a captação focal de FDG em intensidade semelhante à captação do linfoma, tanto em sítio nodal como extranodal, é considerada como envolvimento pela neoplasia. Já nos pacientes estadiados com TC, deve-se identificar até seis dos maiores sítios envolvidos e mensuráveis em dois diâmetros (diâmetro mais longo e diâmetro mais curto), incluindo região mediastinal e retroperitoneal, para estimar volume tumoral. O linfonodo para ser considerado comprometido deve apresentar pelo menos 1,5cm no maior eixo, o baço 13,0cm e outro sítio extranodal deve apresentar lesão maior que 1,0cm.

A avaliação morfológica de biópsia de medula óssea (BMO) é recomendada para todos os casos de linfoma, a qual deve de ser unilateral, apresentar 2,5cm de comprimento e ser complementada com estudo imuno-histoquímico (IHQ) ou citometria de fluxo (CF). As exceções são os casos de LH estadiados com PET e também os casos de LDGCB em que o PET indica envolvimento ósseo ou medular. É recomendado a utilização da classificação de Ann Arbor modificada para descrição anatômica da extensão da doença (Tabela 3).

Tabela 3. Classificação de Ann Arbor modificada

Estágio	Envolvimento	Status Extranodal (E)
Limitado		
I	Um linfonodo ou uma região nodal ¹	Lesão extranodal única sem envolvimento nodal
II	Duas ou mais regiões nodais do mesmo lado do diafragma	Estágio I ou II nodal com envolvimento localizado por contiguidade de sítio extranodal
II bulky²	II com doença <i>bulky</i> (massa nodal com 10cm ou maior que 1/3 do diâmetro transtorácico)	Não se aplica
Avançado		
III	Linfonodos ou regiões nodais em ambos lados do diafragma; linfonodos ou regiões nodais acima do diafragma com envolvimento esplênico	Não se aplica
IV	Envolvimento extralinfático não-contiguo	Não se aplica

FONTE: Cheson et al., 2014.²⁴

Orienta-se acompanhar os casos de LDGCB com avaliações médicas a cada 3 meses pelos 2 primeiros anos, a cada 6 meses pelos 3 anos seguintes, e finalmente anualmente para identificar casos raros de recidiva tardia ou efeitos adversos pós-tratamento.²⁴ As taxas de resposta são definidas segundo foi determinado pelo *National Cancer Institute Working Group* em 2007 (Tabela 4).²⁵

¹ Tonsilas, anel de Waldeyer e baço são considerados região nodal.

² O estágio II “bulky” é considerado doença limitada ou avançada dependendo da histologia tumoral e número de fatores de risco.

Tabela 4. Critérios de resposta terapêutica

RESPOSTA & SÍTIO DE ENVOLVIMENTO	RESPOSTA PET-DETERMINADA	RESPOSTA TC-DETERMINADA
COMPLETA (RC)	Resposta metabólica completa	Resposta radiológica completa
Linfonodos e sítios extralinfáticos	Escore 1, 2, ou 3 no PET 5PS ¹ , com ou sem massa tumoral residual .	Linfonodos/massas nodais devem regredir para menos de 1,5cm no maior eixo. Ausência de doença extralinfática.
Lesão não-medida	Não se aplica	Ausente
Visceromegalia	Não se aplica	Regressão para tamanho normal
Novas lesões	Nenhuma	Nenhuma
Medula óssea (MO)	Ausência de evidência de doença FDG-ávida em MO	BMO negativa; se indeterminada, IHQ negativa
PARCIAL (RP)	Resposta metabólica parcial	Resposta radiológica parcial
Linfonodos e sítios extralinfáticos	Escore 4 ou 5 no PET 5PS ¹ , com diminuição na captação de FDG comparando com a captação original do linfoma; com massa tumoral residual	Diminuição maior ou igual a 50% do volume tumoral original
Lesão não-medida	Não se aplica	Ausente/normal, regressão, mas sem aumento
Visceromegalia	Não se aplica	Baço deve regredir mais que 50%
Novas lesões	Nenhuma	Nenhuma
Medula óssea (MO)	Captação de FDG residual maior que de MO normal, mas menor que a captação original do linfoma. Em caso de alterações focais residuais persistentes no contexto de resposta nodal, recomenda-se BMO ou RNM	Não se aplica

¹ PET 5PS: 1, sem captação maior que o “background”; 2, captação menor ou igual ao mediastino; 3, captação maior que a mediastinal, porém menor que a hepática; 4, captação moderadamente maior que a hepática; 5, captação acentuadamente maior que a hepática e/ou novas lesões; X, novas áreas de captação provavelmente não relacionadas ao linfoma.

Tabela 4. Critérios de resposta terapêutica (continuação)

RESPOSTA & SÍTIO DE ENVOLVIMENTO	RESPOSTA PET-DETERMINADA	RESPOSTA TC-DETERMINADA
SEM RESPOSTA (DE)	Ausência de resposta metabólica	Doença estável
Linfonodos e sítios extralinfáticos	Escore 4 ou 5 no PET 5PS ¹ , sem alteração significativa na captação de FDG comparando com a captação original do linfoma	Diminuição menor que 50% do volume tumoral original
Lesão não-medida	Não se aplica	Sem crescimento consistente com progressão
Visceromegalia	Não se aplica	Sem crescimento consistente com progressão
Novas lesões	Nenhuma	Nenhuma
Medula óssea (MO)	Sem mudança nos achados originais	Não se aplica
PROGRESSÃO (DP)	Doença metabólica progressiva	Doença radiológica progressiva
Linfonodos e sítios extralinfáticos	Escore 4 ou 5 no PET 5PS ¹ , com aumento na intensidade da captação de FDG comparando com a captação original do linfoma e/ou novo foco FDG-ávido consistente com linfoma	Aumento maior ou igual a 50% do volume tumoral original Esplenomegalia nova ou recorrente
Lesão não-medida	Nenhuma	Nova lesão ou progressão evidente de lesão pré-existente não medida
Novas lesões	Novo foco FDG-ávido consistente com linfoma, sendo relevante a exclusão de possíveis outras etiologias (infecciosas, inflamação). Nos casos de etiologia incerta, considerar BX	Resurgimento de lesão previamente resolvida Novas lesões significativas (linfonodo maior que 1,5cm ou foco extranodal maior que 1,0cm)
Medula óssea (MO)	Foco FDG-ávido novo ou recorrente	Envolvimento novo ou recorrente

FONTE: Cheson et al., 2014.²⁴

BMO: biópsia de medula óssea; BX: biópsia; DE: doença estável; DP: doença progressiva; FDG: 2-F18-fluoro-2-deoxi-glicose; IHQ: estudo imuno-histoquímica; MO: medula óssea; PET: tomografia por emissão de pósitrons; RNM: ressonância nuclear magnética; RC: remissão completa; RP: remissão parcial; TC: tomografia computadorizada.

¹ PET 5PS: 1, sem captação maior que o “background”; 2, captação menor ou igual ao mediastino; 3, captação maior que a mediastinal, porém menor que a hepática; 4, captação moderadamente maior que a hepática; 5, captação acentuadamente maior que a hepática e/ou novas lesões; X, novas áreas de captação provavelmente não relacionadas ao linfoma.

1.3 Estratificação de risco clínico

Há mais de 20 anos, modelos de estratificação de risco utilizando critérios clínico-laboratoriais vem sendo utilizados para pacientes com linfomas agressivos, inclusive com os casos de LDGCB. Estes modelos se mostraram ferramentas prognósticas robustas para os casos de LDGCB.²⁶ Entretanto, estes modelos prognósticos não refletem a biologia tumoral, consequentemente não evidenciam nenhuma via ou mecanismo genético possivelmente envolvido na oncogênese, não atingindo as metas da *medicina personalizada*, que pode ser relevante para os paciente com doença avançada, refratária ou recidivada.^{27,28}

1.3.1 Índice Prognóstico Internacional (IPI)

O Índice Prognóstico Internacional (IPI) é o modelo de estratificação de risco classicamente utilizado em pacientes com LNH agressivo, utilizando dados clínicos e laboratoriais, que refletem o crescimento tumoral e o seu potencial invasivo.

Em 1993, dezesseis instituições e grupos cooperativos distribuídos pelos Estados Unidos da América (EUA), Canadá e Europa participaram do projeto responsável pela criação do IPI.²⁹

Foram avaliados 3273 pacientes com LNH agressivos, dos quais 2031 apresentavam dados clínicos completos para o estudo. Os pacientes haviam sido diagnosticados com linfoma maligno difuso misto, difuso de grandes células ou imunoblástico de grandes células (classificação da *International Working Formulation*³⁰); linfoma difuso centroblástico-centrocítico, centroblástico, imunoblástico ou de alto grau inclassificável (classificação de Kiel³¹); linfoma difuso misto linfocítico-histiocítico ou difuso histiocítico

(classificação de Rappaport³²). Todos os pacientes foram tratados com quimioterapia contendo antracíclicos entre 1982 e 1987, com acompanhamento mínimo de 3 anos e mediano de 4,5 anos.

Os parâmetros clínicos avaliados foram: sexo, idade, estadiamento de Ann Arbor, status funcional segundo a *Eastern Cooperative Oncology Group scale* (Tabela 5), sintomas B, sítios envolvidos pelo linfoma, número de sítios extranodais envolvidos, tamanho da maior lesão tumoral, desidrogenase láctica (DHL) sérica, albumina sérica e β 2-microglobulina sérica.

Tabela 5. Status funcional pelo ECOG

GRAUS	DESCRIÇÃO
0	Completamente ativo, sem restrições
1	Restrito para atividades extenuantes, acompanhamento ambulatorial
2	Capaz de realizar atividades de autocuidado, incapaz de realizar atividades laborais, acompanhamento ambulatorial, <50% do dia acamado
3	Capacidade limitada de realizar atividades de autocuidado, $\geq$ 50% do dia confinado à cama ou cadeira
4	Completamente incapacitado, totalmente confinado à cama ou cadeira
5	Óbito

FONTE: modificado de Oken et al., 1982.³³

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group scale.

Os resultados evidenciaram cinco fatores prognósticos independentes: idade (≤ 60 vs. > 60 anos), estadiamento clínico de Ann Arbor (estágio I ou II/doença localizada vs. estágio III ou IV/doença avançada), número de sítios extranodais envolvidos (≤ 1 vs. > 1), status funcional (ECOG 0 ou 1 vs. ≥ 2) e DHL sérico (≤ 1 valor de referência normal vs. > 1 valor de referência normal). Baseado nestes parâmetros foi desenvolvido o modelo preditivo que viria a ser chamado de IPI, o qual identificou quatro grupos de risco: baixo, intermediário-baixo, intermediário-alto e alto (Tabela 6).

Tabela 6. Evolução clínica/ Grupos de risco definidos pelo IPI

Grupo de Risco	Fatores de Risco (n)	RC (%)	SLR-5 (%)	SLG-5 (%)
BAIXO	0 ou 1	87	70	73
BAIXO-INTERMEDIÁRIO	2	67	50	51
ALTO-INTERMEDIÁRIO	3	55	49	43
ALTO	4 ou 5	44	40	26

FONTE: PROJECT TIN-HLPFP, 1993.²⁹

IPI: Índice Prognóstico Internacional; RC: remissão completa; SLG-5: sobrevida livre global em 5 anos; SLR-5: sobrevida livre de recidiva em 5 anos.

Soma-se um ponto para cada fator de risco presente: idade > 60 anos; estágio Ann Arbor III/IV; > 1 sítio extranodal envolvido; ECOG ≥ 2; e DHL sérica elevada.

Apesar do IPI ter sido desenvolvido ainda na *era pré-Rituximab*, Ziepert et al. validaram sua força prognóstica em estudo com 1062 pacientes tratados com imunoquimioterapia padrão (R-CHOP).³⁴

1.3.2 Índice Prognóstico Internacional revisado (R-IPI)

O Índice Prognóstico Internacional revisado (R-IPI) foi proposto em 2007 por Sehn et al. como alternativa para estratificação dos pacientes com LDGCB tratados com imunoquimioterapia.³⁵

Este foi um estudo retrospectivo que avaliou 365 pacientes com LDGCB tratados com esquema R-CHOP, acompanhados por 7-64 meses (*follow-up* mediano de 33 meses). A idade mediana dos pacientes foi de 61 anos (16-90 anos).

Os resultados do trabalho comprovaram a força prognóstica do IPI, porém sem a identificação de 4 grupos de risco, pois os pacientes que haviam sido classificados como grupo de risco baixo e intermediário-baixo, e aqueles como intermediário-alto e alto, apresentaram curvas de sobrevida semelhantes. Contudo, utilizando-se os mesmos fatores de risco individualmente (idade > 60

anos; estágio Ann Arbor III/IV; >1 sítio extranodal envolvido; ECOG ≥ 2 ; e DHL sérica elevada), notou-se a presença de 3 grupos de risco bem definidos. Os pacientes com nenhum fator de risco presente ao diagnóstico exibiram o melhor prognóstico, já os pacientes com um ou dois fatores de risco apresentaram prognóstico intermediário, e prognóstico ruim naqueles com três ou mais fatores de risco (Tabela 7).

Tabela 7. Evolução clínica baseado no IPI e R-IPI

GRUPO DE RISCO	FATORES DE RISCO (n)	SLP-4 (%)	SLG-4 (%)
Índice Prognóstico Internacional (IPI)			
Baixo	0 ou 1	85	82
Intermediário-baixo	2	80	81
Intermediário-alto	3	57	49
Alto	4 ou 5	51	59
Índice Prognóstico Internacional revisado (R-IPI)			
Muito bom	0	94	94
Bom	1 ou 2	80	79
Ruim	3 ou 4 ou 5	53	55

FONTE: Sehn et al., 2007.³⁵

IPI: Índice Prognóstico Internacional; R-IPI: Índice Prognóstico Internacional revisado; SLG-4: sobrevida livre global em 4 anos; SLP-4: sobrevida livre de progressão em 4 anos.

Soma-se um ponto para cada fator de risco presente: idade >60 anos; estágio Ann Arbor III/IV; >1 sítio extranodal envolvido; ECOG ≥ 2 ; e DHL sérica elevada.

1.4 Estratificação de risco biológico

Nas últimas décadas, os avanços nas técnicas moleculares permitiram a melhor compreensão da diversidade biológica do LDGCB, com a descoberta de diferentes vias oncogênicas e possíveis novos alvos terapêuticos. Estas descobertas são as bases para o futuro progresso em que características biológicas específicas poderão ser exploradas seletivamente, permitindo estratégias terapêuticas mais eficazes e personalizadas.³⁶

1.4.1 Estudos do perfil de expressão gênica (PEG)/Subgrupos moleculares do LDGCB

Em meado da década de 90, foi desenvolvida a técnica que serviria de plataforma para os estudos moleculares do perfil de expressão gênica (PEG) em LDGCB, que viriam a transformar o conhecimento sobre a biologia desta entidade, ressaltando a sua já suspeitada heterogeneidade.

Schena et al. descreveram um sistema de alta capacidade para avaliar a expressão de múltiplos genes em paralelo.³⁷ Foram preparados *microarrays* utilizando DNA complementar (cDNA) de um organismo modelo (*Arabidopsis thaliana*, pequena planta com flor, que exibe o menor genoma de eucariota maior estudado à época). Pequenos volumes de RNA mensageiro (RNAm) foram utilizados para a hibridização, e a expressão dos 45 genes da *Arabidopsis* foram avaliados simultaneamente através de hibridização fluorescente com duas cores, revelando diferenças significativas na expressão gênica entre os tecidos radicular e foliáceo (Figura 1).

Figura 1. Expressão gênica monitorada com uso de microarrays de cDNA. Matriz única foi utilizada para hibridização com mistura 1:1 de cDNA de tecido radicular marcada com fluoresceína e cDNA de tecido foliáceo marcado com lissamina. A comparação da expressão gênica entre o tecido radicular e foliáceo revelou diferenças significativas entre 27 genes (modificado de Schena et al., 1995³⁷).

Em 2000 foi publicado o trabalho pioneiro de Alizadeh et al., avaliando a expressão gênica em casos de LNH.³⁸ Foi desenvolvido *microarray* com 17856 clones de cDNA, chamado de *Lymphochip*, que avalia genes expressos em células linfoides e genes importantes nos mecanismos imunológicos ou oncogênicos. Avaliaram-se 96 espécimes de controles normais e pacientes com LDGCB, LF e Leucemia Linfóide Crônica/Linfoma Linfocítico (LLC/LL), aplicando-se o *Lymphochip*.

Algoritmo de agrupamento hierárquico foi empregado para congregar os genes baseado nas similaridades do padrão de expressão, assim como para congregar os casos/espécimes baseado na expressão destes genes. Surpreendentemente o algoritmo discriminou, com poucas exceções, os diferentes tipos de LNH baseado exclusivamente no PEG (Figura 2).

Figura 2. Agrupamento hierárquico dos dados de expressão gênica da análise de 128 microarrays. O dendrograma à esquerda lista os espécimes estudados e sua relação com a expressão gênica. Cada linha representa o clone de cDNA do microarray e cada coluna o RNA mensageiro do espécime estudado (copiado de Alizadeh et al., 2000³⁸).

Contudo, o achado mais importante deste estudo foi a identificação de dois subgrupos de LDGCB, os quais apresentam diferenças tanto no comportamento clínico como no perfil de expressão gênica. O subgrupo de LDGCB chamado de célula B centrogerminativa simile (CG) exibiu PEG semelhante às células B centrogerminativas e diferente das células B em outras etapas de diferenciação. Estes casos apresentaram melhor resposta a quimioterapia baseada em antracíclicos. Já o outro subgrupo denominado como célula B ativada simile (CBA) exibiu expressão gênica similar às células B ativadas do sangue periférico, assim como apresentou uma resposta pior a quimioterapia baseada em antracíclico (Figura 3).

Figura 3. Subgrupos moleculares de LDGCB. A matriz localizada no canto superior esquerdo evidencia os subgrupos CG e CBA do LDGCB. A matriz à direita resalta as semelhanças entre a expressão gênica dos subgrupos de LDGCB com a expressão gênica de células-B normais em diferentes estágios de diferenciação. As curvas de Kaplan-Meier localizadas no canto inferior esquerdo ressaltam as diferenças na sobrevida global entre os diferentes subgrupos de LDGCB e grupos de risco pelo IPI (modificado de Alizadeh et al., 2000³⁸).

Ainda em 2002, Rosenwald et al. aplicaram a mesma tecnologia para estudar retrospectivamente o PEG em 240 pacientes com LDGCB tratados com quimioterapia baseada em antracíclicos.³⁹ Algoritmo de agrupamento hierárquico foi utilizado para definir os subgrupos de LDGCB, segundo a expressão de 100 genes capazes de diferenciar os subgrupos CG e CBA com nível de significância de $p < 0,001$. Desta maneira foram identificados 3 subgrupos de LDGCB: CG, CBA, e o *tipo 3* que não expressava nenhum dos grupos de genes característicos dos outros dois subgrupos de LDGCB. Os resultados revelaram que dois eventos oncogênicos, a translocação $t(14;18)$ envolvendo o gene BCL2 e a amplificação do locus *c-rel* no cromossomo 2p, ocorreram exclusivamente nos casos de LDGCB CG, corroborando a percepção que os subgrupos moleculares apresentavam diferentes vias de oncogênese. O estudo também ressaltou as diferenças de sobrevida entre os subgrupos moleculares, os casos de LDGCB CG apresentaram SG em 5 anos de 60%, e os casos de LDGCB *tipo 3* e CBA com 39% e 35% de SG em 5 anos, respectivamente. Além disso, os autores criaram um modelo preditor de resposta a quimioterapia convencional (CHOP), utilizando a expressão de 16 genes associados a quatro *assinaturas gênicas*¹ e do gene BMP6. As *assinaturas gênicas* correlacionadas a resposta favorável são aquelas associadas a *célula B centrogerminativa*, *MHC*² *classe II* e *linfonodo*. Já a *assinatura gênica proliferativa* e a expressão do gene BMP6 se correlacionam com resposta desfavorável (Figura 4).

¹ Assinatura gênica se refere a um grupo de genes expressos em uma linhagem celular específica ou estágio de diferenciação ou durante a resposta biológica particular.

² MHC: complexo de histocompatibilidade maior

Figura 4. Relação entre os subgrupos moleculares de LDGCB e o modelo preditor de resposta. A matriz localizada superiormente apresenta os diferentes níveis de expressão das variáveis do modelo preditor de resposta e os diferentes subgrupos moleculares identificados. As curvas de Kaplan-Meier localizadas inferiormente apresentam as curvas de SG entre os diferentes subgrupos moleculares identificados em relação a estratificação segundo o modelo preditor de resposta (modificado de Rosenwald et al., 2002³⁹).

Diferentes estudos também comprovaram o impacto prognóstico dos subgrupos moleculares em pacientes tratados com imunoquimioterapia. Tendo seus resultados recentemente avaliados em meta-análise publicada em 2014.⁴⁰

Após estas primeiras evidências robustas da existência de pelo menos dois subgrupos moleculares de LDGCB, diversos pesquisadores utilizando ferramentas moleculares mais modernas, especialmente técnicas de sequenciamento gênico de nova geração (SNG), ressaltaram a heterogeneidade do LDGCB, SOE. Revelaram diferentes mutações e alterações de vias genéticas importantes na oncogênese dos diferentes subgrupos moleculares de LDGCB, ratificando a existência de “duas doenças em uma”. Afinal, frequentemente os genes mutados e vias genéticas alteradas no subgrupo CG eram diferentes do subgrupo CBA.⁴¹

O LDGCB CG é caracterizado pela translocação t(14;18)(q32;q21), deleção do gene *Phosphatase and tensin homolog* (PTEN), amplificação do grupo de microRNA miR-17-92 (que inibe o gene PTEN), e mutação do gene “*Tumor protein p53*” (TP53).⁴² As principais vias de sinalização alteradas neste subgrupo são: (1) perda da expressão do PTEN resultando na ativação da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR, (2) desregulação do gene *B-Cell Lymphoma 6* (BCL6) induzindo a proliferação tumoral, comprometendo a resposta a danos no DNA, metabolismo celular e resistência a apoptose, e (3) translocação do gene *B-Cell Lymphoma 2* (BCL2) resultando na inibição da apoptose (Figura 5). Outras alterações genéticas frequentemente associadas ao LDGCB CG são as mutações pontuais somáticas do gene *Enhancer of zeste homolog 2* (EZH2). Estas mutações estimulam sua atividade histona metiltransferase, suscitando a metilação na lisina (K)-27 da histona H3 (H3K27), modificando a conformação da cromatina e promovendo repressão gênica, especialmente de genes supressores tumorais e antiproliferativos associados ao ciclo celular, como por exemplo o gene *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A* (CDKN1A).^{43,44}

Já o LDGCB CBA apresenta outras alterações genéticas como a translocação t(3;14)(q27;q32), trissomia do cromossomo 3, deleção do *locus INK4A-ARF* ou amplificação do BCL2.⁴² Contudo, a principal característica genética é a ativação constitutiva da via do *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B) secundário a diferentes mecanismos moleculares, que promovem a proliferação e diferenciação celular, além de suprimir a apoptose.^{43,45} Algumas alterações genéticas recorrentes foram descritas, incluindo mutações nos genes *Caspase Recruitment Domain Family Member 11* (CARD11), *Cluster of differentiation 79 B/A* (CD79B/A), *Myeloid*

differentiation primary response 88 (MYD88) e deleção bialélica do gene *Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Protein 3* (TNFAIP3).⁴⁴

Com a identificação dos mecanismos moleculares relacionados com a oncogênese dos diferentes subgrupos moleculares de LDGCB, novos horizontes e possibilidades de tratamentos surgem, os quais são fundamentais para melhora nas perspectivas terapêuticas, especialmente no contexto de doença refratária ou recidivada (Figuras 5 e 6).^{27,44,46,47}

Figura 5. LDGCB CG: as vias moleculares implicadas na oncogênese e progressão da doença, e os possíveis alvos terapêuticos.

BCL2: B-cell lymphoma 2; BCL6: B-cell lymphoma 6; mTOR: mammalian target of rapamycin; PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase; PTEN: fosfatase homóloga à tensina. (copiado de Roschewski et al. 2014⁴⁴).

Figura 6. LDGCB CBA: as vias moleculares implicadas na oncogênese e progressão da doença, e os possíveis alvos terapêuticos.

IRAK-4: interleukin-1 receptor-associated kinase 4; IRF-4, interferon regulatory factor 4; JAK, Janus activating kinase; mTOR: mammalian target of rapamycin; NF-κB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase (copiado de Roschewski et al. 2014⁴⁴).

1.4.2 Algoritmos imuno-histoquímicos/Subgrupos imuno-histoquímicos

Apesar da relevância dos estudos de PEG para definição do subgrupo molecular do LDGCB, este não foi adotado na prática diária para definição da terapia, tampouco como marcador prognóstico. Afinal, o alto custo para realização do teste, a exigência de material à fresco ou congelado, assim como a necessidade de equipe laboratorial especializada e o prolongado tempo para realização do exame, a sua aplicação para rotina fica limitada.

Consequentemente, diversos grupos desenvolveram estratégias para utilização de IHQ, no intuito de traduzir os achados identificados pelos estudos de PEG em exame simples, universalmente difundido, aplicável em tecido fixado em formalina e incluído em parafina (TFFP), por isso acessível para ser incorporado imediatamente à rotina diagnóstica/preditiva diária.

Os algoritmos desenvolvidos por diferentes grupos foram criados ora pareados com estudos de PEG ora não pareados, dos quais serão descritos três (03) algoritmos PEG pareados e dois (02) PEG não-pareados.

1.4.2.1 Algoritmo de *Hans*

No ano de 2004, Hans et al. publicaram o que viria a ser o *algoritmo clássico* para classificação IHQ do LDGCB.⁴⁸ Trata-se de estudo multicêntrico, retrospectivo, avaliando 152 pacientes com LDGCB *de novo*, dos quais 142 faziam parte das coortes dos estudos de PEG de Alizadeh et al.³⁸ e Rosenwald et al.³⁹ Todos os pacientes haviam recebido quimioterapia padrão com antracíclicos.

A avaliação IHQ foi realizada em lâminas de *tissue microarray* (TMA), que foram construídas com 2 a 5 fragmentos (média, 4) representativos do bloco original de parafina. Cada fragmento apresentava 0,6mm de diâmetro, e posteriormente foram seccionados com 5µm de espessura. Os anticorpos avaliados foram: BCL2 (clone 124 e diluição 1:10), BCL6 (policlonal e diluição 1:75), CD10 (clone 56C6 e diluição 1:1), CD20 (clone L26 e diluição 1:200), Ciclina D2 (policlonal e diluição 1:500), FOXP1 (clone JC12 e diluição 1:80), e MUM1 (clone MUM1p e diluição 1:10). As lâminas de TMA foram avaliadas independentemente por 2 patologistas. A positividade dos marcadores em células neoplásicas foi estimada com variações de 10%, e os casos discordantes foram resolvidos em análise conjunta. Os casos foram considerados como positivos quando exibissem 30% ou mais das células neoplásicas marcando para o anticorpo avaliado. A intensidade também foi analisada, porém não foi determinante da decisão dos resultados porque sua variabilidade poderia estar relacionada a artefatos pré-analíticos.

Os casos foram classificados baseado nos resultados da análise dos marcadores BCL6, CD10 e MUM1. Todos os casos foram subdivididos em LDGCB subgrupo célula B centrogerminativa simile (GCB) ou célula B não-centrogerminativa simile (NGCB). Os casos foram classificados como GCB quando apresentavam: (1) positividade para CD10, (2) dupla positividade para BCL6 e CD10, ou (3) positividade para BCL6 e negatividade para CD10 e MUM1. Já os casos foram classificados como NGCB quando apresentavam: (1) negatividade para BCL6, CD10 e MUM1, (2) negatividade para CD10 e positividade para BCL6 e MUM1, ou (3) positividade para MUM1 e negatividade para BCL6 e CD10 (Figura 7).

Figura 7. Árvore de decisão do algoritmo imuno-histoquímico de *Hans*.

GCB: subgrupo imuno-histoquímico célula B centrogerminativa simile; NGCB: subgrupo imuno-histoquímico célula B não-centrogerminativa simile.

Haviam 82 homens e 70 mulheres, com idade mediana de 63 anos (14-90 anos). O tempo de acompanhamento clínico mediano dos pacientes sobreviventes foi de 6,4 anos (0,8-21,8 anos). A SG em 5 anos foi de 52% e sobrevida livre de eventos (SLE) em 5 anos de 48%.

Os estudos de PEG previamente realizados revelaram 75 casos de subgrupo molecular CG, 41 de subgrupo molecular CBA e 26 *tipo 3*. Já a avaliação IHQ classificou 64 casos como GCB (42%) e 88 como NGCB (58%). Os casos de LDGCB classificado como GCB apresentaram melhores curvas

de SLE e SLG quando comparados com os classificados como NGCB. As curvas de sobrevida construídas tanto com a classificação IHQ como com a molecular exibiram resultados semelhantes.

Considerando a classificação molecular como padrão ouro para definição do subgrupo de LDGCB, o algoritmo de *Hans* apresentou: 79% de acurácia, 71% de sensibilidade para o subgrupo GCB e 88% para o subgrupo NGCB; 87% de valor preditivo positivo para o subgrupo GCB e 73% para o NGCB. Comparando os resultados do estudo de PEG e do algoritmo IHQ, 30 pacientes foram classificados de forma equivocada com o algoritmo IHQ, 8 foram classificados como GCB pelo IHQ e pelo PEG como CBA ou *tipo 3*, e 22 classificados como NGCB pelo IHQ e pelo PEG como CG. Neste estudo tanto o IPI como a classificação IHQ foram considerados fatores de risco independente em análise multivariada. Um dado intrigante deste trabalho foi que a classificação IHQ foi mais preditiva de sobrevida do que a classificação molecular.

1.4.2.2 Algoritmo de Choi

O mesmo grupo que havia desenvolvido o algoritmo de *Hans*, em 2009 desenvolveu o algoritmo de *Choi*, introduzindo mais marcadores relacionados ao centro germinativo e avaliando também pacientes tratados com imunoquimioterapia.⁴⁹ Choi et al. avaliaram retrospectivamente 110 pacientes com LDGCB *de novo* tratados com esquema CHOP e 68 tratados com esquema R-CHOP. Dos 110 pacientes tratados somente com quimioterapia, 84 haviam sido previamente classificados como subgrupo molecular CG (n=47, 43%) ou CBA (n=37, 34%), que comporiam o grupo de teste. No grupo de pacientes que haviam sido tratados com imunoquimioterapia, 63 haviam sido

classificados como CG (n=37, 54%) ou CBA (n=26, 38%), que formariam o grupo de validação.

Também foram construídos TMAs para a realização dos estudos de IHQ. Os anticorpos avaliados nos grupos de teste e validação foram: BCL6 (clone PG-B6p e diluição 1:60), CD3 (clone PS1 puro), CD10 (clone 56C6 puro), CD20 (clone L26 e diluição 1:200), FOXP1 (clone JC12 e diluição 1:80), GCET1 (clone RAM341 puro), e MUM1 (clone MUM1p e diluição 1:10). No grupo de estudo de teste também foram avaliados outros marcadores: BCL2 (clone 124 e diluição 1:20), BCL6 (policlonal e diluição 1:75), Ciclina D2 (policlonal e diluição 1:500), e MTA3 (policlonal e diluição 1:1200). As lâminas de TMA foram avaliadas independentemente por 3 patologistas. A positividade dos marcadores em células neoplásicas foi estimada com variações de 10%, e os casos discordantes foram resolvidos em análise conjunta.

A construção do algoritmo foi baseado nos resultados do estudo de PEG prévio, no intuito de identificar *cutoffs* com alta especificidade ($\geq 90\%$) e sensibilidade ($\geq 50\%$) para identificar tanto os subgrupos CG como para os CBA. Três marcadores preencheram estes critérios, CD10 e GCET1 para o subgrupo CG, e MUM1 para o subgrupo CBA. Foram acrescentados os anticorpos monoclonais BCL6 e FOXP1 para melhorar a sensibilidade do algoritmo para definir os subgrupos de LDCGB. Os valores de *cutoff* ficaram: $\geq 30\%$ para o CD10 e BCL6, e $\geq 80\%$ para FOXP1, GCET1 e MUM1. Os casos foram classificados como GCB quando apresentavam: (1) positividade para GCET1 e negatividade para MUM1, (2) positividade para CD10 e negatividade para GCET1, ou (3) positividade para BCL6 e negatividade para CD10, FOXP1 e GCET1. Já os casos classificados como CBA/NGCB apresentavam: (1)

positividade para GCET1 e MUM1, (2) negatividade para BCL6, CD10 e GCET1, ou (3) positividade para BCL6 e FOXP1, e negatividade para CD10 e GCET1 (Figura 8).

Figura 8. Árvore de decisão do algoritmo imuno-histoquímico de *Choi*.

ABC: célula B ativada; GCB: subgrupo imuno-histoquímico célula B centrogerminativa simile; NGCB: subgrupo imuno-histoquímico célula B não-centrogerminativa simile.

O grupo teste apresentava 46 homens (56%) e 38 mulheres (44%) com idade mediana de 63 anos (24-82 anos). Tempo mediano de acompanhamento de 6,4 anos (0,8-21,8 anos), 45 pacientes morreram (54%) e 39 estavam vivos no último contato (46%). O grupo de validação apresentava 29 homens (46%) e 34 mulheres (54%). Tempo mediano de acompanhamento de 2,6 anos (0,2-10,3 anos), 17 pacientes morreram (27%) e 46 estavam vivos no último contato (73%).

O algoritmo de *Choi* revelou concordância de 93% com a classificação molecular no grupo teste, e de 88% no grupo de validação. As análises de sobrevida revelaram que no grupo teste, os pacientes classificados como CG apresentaram SG em 5 anos de 64% e os classificados como CBA de 38% ($p=0,002$). Utilizando-se o algoritmo IHQ, os pacientes classificados como GCB apresentaram SG em 5 anos de 61% e aqueles classificados como NGCB 41%. No grupo de validação os resultados se confirmaram, os pacientes

classificados molecularmente como CG e CBA apresentaram SG em 3 anos de 92% e 44%, respectivamente ($p < 0,001$). Quando o algoritmo IHQ foi aplicado, os pacientes classificados como GCB apresentaram SG em 3 anos de 87% e aqueles classificados como NGCB 44% ($p < 0,001$). A análise multivariada ressaltou que tanto o IPI alto (≥ 3 fatores de risco) como a classificação em NGCB pelo algoritmo IHQ são preditores relevantes para SG.

1.4.2.3 Algoritmo de *Visco-Young*

Posteriormente outro grupo de pesquisadores propôs novo algoritmo IHQ também na tentativa de melhorar a correlação entre os estudos de PEG e IHQ. Visco et al. em 2012 avaliaram 475 casos de LDGCB *de novo* tratados com R-CHOP.⁵⁰

O estudo IHQ foi realizado em todos os pacientes, sendo utilizado TMA e cortes histológicos com 4 μ m. Os anticorpos avaliados são: ALK-1, BCL2, BCL6, CD3, CD5, CD10, CD20, CD30, CD79a, CD138, FOXP1, GCET1, GCET2 e MUM1. O estudo IHQ foi analisado independentemente por 6 patologistas/hematopatologistas, e os casos discordantes reavaliados em conjunto.

O estudo de PEG foi realizado nos 475 blocos TFFP. O modelo de classificação molecular foi desenvolvido com 47 espécimes de tecido congelado e pareado com TFFP, com taxa de confiança de 90,2–100% no material congelado e de 91,3–100% no TFFP.

Curvas ROC (Receiver operating characteristic) foram utilizadas para identificar as especificidades e sensibilidades de cada um dos marcadores (BCL6, CD10, FOXP1, GCET1 e MUM1) para classificar os casos em CG e CBA. Os valores de *cutoff* foram determinados através do cálculo do índice de

Youden das curvas ROC, o qual identifica o ponto na curva com o máximo de sensibilidade e especificidade de cada marcador. O índice de Youden apontou como valores ótimos de *cutoff* de 33% para BCL6, 35% para CD10, 75% para FOXP1, 45% para GCET1 e 58% para MUM1. O valor de *cutoff* aceito para o BCL6 e CD10 foi de 30%, por estar próximo do valor apontado pelo índice de Youden. E para evitar muitos valores diferentes, estabeleceu-se 60% como valor de *cutoff* para FOXP1, GCET1 e MUM1, sem que houvesse grandes alterações na sensibilidade e especificidade.

A construção do algoritmo começou com 5 marcadores (CD10, GCET1, FOXP1, MUM1 e BCL6) e após refinamento com ganho na concordância com os resultados do estudo de PEG, estabeleceu-se algoritmo IHQ simples com CD10, FOXP1 e BCL6. Os casos foram classificados como GCB quando apresentavam: (1) positividade para CD10, ou (2) positividade para BCL6 e negatividade para CD10 e FOXP1. Já os casos foram classificados como NGCB quando apresentavam: (1) positividade para FOXP1 e negatividade para CD10, ou (2) negatividade para BCL6, CD10 e FOXP1 (Figura 9). O novo algoritmo foi aplicado em grupo de validação contendo 574 pacientes com LDGCB (237 tratados com R-CHOP, e 337 com CHOP), utilizando TMA para o estudo IHQ, porém sem estudo de PEG.

Figura 9. Árvore de decisão do algoritmo imuno-histoquímico de Visco-Young.
GCB: subgrupo imuno-histoquímico célula B centrogerminativa simile; NGCB: subgrupo imuno-histoquímico célula B não-centrogerminativa simile.

Estudo de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi realizado em TMA para pesquisar rearranjo no gene C-MYC, utilizando sondas de fusão e de partição.

Os resultados evidenciaram concordância de 92,6% do novo algoritmo com 3 marcadores e a classificação molecular do estudo de PEG para definir tanto o subgrupo GCB como para o NGCB. Foram classificados como GCB 254 pacientes e NGCB 221 pacientes do grupo teste. Os casos classificados como NGCB apresentaram escores de IPI e faixa etária mais elevados quando comparados com os GCB ($p=0,04$ e $p=0,0002$, respectivamente).

A SG em 5 anos foi significativamente diferente entre os subgrupos moleculares definidos pelo estudo de PEG ($69\pm3\%$ para CG vs. $53\pm5\%$ para CBA vs. $60\pm4\%$ para inclassificáveis; $p=0,02$ de CG vs. CBA). O algoritmo proposto também mostrou força prognóstica semelhante à classificação molecular (SG em 5 anos de $71\pm3\%$ para GCB vs. $51\pm5\%$ para NGCB, $p=0,003$). O valor prognóstico do algoritmo de *Visco-Young* no grupo de validação foi mantido, tanto nos pacientes tratados com quimioterapia como naqueles tratados com imunoquimioterapia. A análise multivariada ressaltou que o IPI alto (≥ 3 fatores de risco), a classificação em NGCB pelo algoritmo de *Visco-Young* e a falha em se obter RC, são preditores independentes para SG.

Vinte e três pacientes apresentaram rearranjo do gene MYC (8%), os quais apresentaram SG significativamente inferior quando comparado com os pacientes sem o rearranjo ($p=0,03$). A presença do rearranjo foi mais frequente no subgrupo molecular CG.

1.4.2.4 Algoritmo de *Muris*

Muris et al. em 2006 desenvolveram algoritmo não pareado com estudo de PEG, baseado na expressão de preteínas relacionadas com CG/CBA (BCL6, CD10 e MUM1) e com proteínas alvo da via do NF- κ B e relacionadas com inibição da apoptose (BCL2, cFLIP e XIAP), objetivando identificar grupos prognósticos diferentes.⁵¹

Foram estudados retrospectivamente 71 pacientes com LDGCB nodal tratados com quimioterapia com antracíclicos. Foram utilizados os blocos de TFFP do diagnóstico original para o estudo IHQ. As lâminas foram confeccionadas com cortes de 3 μ m, e os anticorpos monoclonais estudados foram: BCL2 (anticorpo murino); BCL6 (anticorpo murino); CD10 (anticorpo murino); cFLIP (anticorpo murino); MUM1 (anticorpo murino); e XIAP (anticorpo murino). A positividade para os marcadores relacionados a CG/CBA (BCL6, CD10 e MUM1) foi estimada semiquantitativamente nas células tumorais com variação de 10%. Todos os marcadores foram avaliados independentemente por 2 patologistas, e os casos discordantes reavaliados em conjunto até o consenso. Já os valores de *cutoff* utilizados para os marcadores relacionados a inibição da apoptose (BCL2, cFLIP e XIAP), foram: >50% para BCL2 e XIAP, e 0% para cFLIP. A expressão positiva dos marcadores BCL2 e XIAP está associada a inibição da apoptose via caspase 9, e a expressão positiva de cFLIP com a inibição da apoptose associada a via da caspase 8. Utilizando de o modelo de regressão de Cox foi desenvolvido algoritmo para estratificar pacientes com prognóstico favorável (grupo 1/GCB) e aqueles com prognóstico desfavorável (grupo 2/NGCB), combinando os marcadores BCL2, CD10 e MUM-1. Os pacientes foram classificados como grupo 1/GCB quando

apresentaram: (1) negatividade para BCL2, denotando a não ativação da via do NF- κ B; (2) positividade para BCL2 e CD10; e (3) positividade para BCL2 e negatividade para CD10 e MUM1. Já o grupo 2/NGCB é definido pela negatividade para CD10 e positividade para BCL2 e MUM1.

Figura 10. Árvore de decisão do algoritmo imuno-histoquímico de *Muris*.

GCB: subgrupo imuno-histoquímico célula B centrogerminativa simile; NGCB: subgrupo imuno-histoquímico célula B não-centrogerminativa simile.

Os resultados do estudo confirmaram o poder prognóstico do algoritmo de *Hans*⁴⁸, e revelaram que tanto a expressão do BCL2 como do CD10 foram parâmetros prognósticos independentes. A separação dos casos de LDGCB nodal em grupo 1/GCB e grupo 2/NGCB apresentou diferença prognóstica na SG ($p < 0,0001$) e SLP ($p = 0,0006$).

1.4.2.5 Algoritmo de *Nyman*

Nyman et al. em 2009 propuseram algoritmo não pareado com estudo de PEG, baseado na expressão de marcadores relacionados ao fenótipo CBA, utilizando amostras integrais dos blocos de TFFP.⁵²

Trata-se de estudo retrospectivo com avaliação de 88 casos de LDGCB *de novo*, tratados uniformemente com R-CHOP. Foram utilizados os blocos de TFFP do diagnóstico original para o estudo IHQ. As lâminas foram confeccionadas com cortes de 4 μ m, e os anticorpos estudados foram: BCL2,

BCL6, CD10 e FOXP1. Os valores de *cutoff* considerados foram: $\geq 30\%$ para BCL6, CD10 e MUM1, 50% para BCL2 e 100% para FOXP1. Foram avaliados os algoritmos de *Hans*⁴⁸ e *Muris*⁵¹, além do algoritmo proposto pelos autores e chamado de “algoritmo célula-B ativada modificado”, aqui denominado como *algoritmo de Nyman*. O algoritmo de *Nyman* classifica os casos de LDGCB em ABC/NGCB quando forem positivos para MUM1 ($\geq 30\%$ das células tumorais) e/ou FOXP1 (100% das células tumorais); em todas outras situações os casos de LDGCB foram classificados como outros/GCB (Figura 11).

Figura 11. Árvore de decisão do algoritmo imuno-histoquímico de *Nyman*. ABC: célula B ativada; GCB: subgrupo imuno-histoquímico célula B centrogerminativa simile; NGCB: subgrupo imuno-histoquímico célula B não-centrogerminativa simile.

Os resultados mostraram que o algoritmo de *Nyman* classificou 46 pacientes como subgrupo ABC/NGCB e 42 como outros/GCB. Os pacientes classificados como ABC/NGCB apresentaram mais doença extranodal quando comparados com o grupo outros/GCB ($p=0,059$) e tendência a serem mais velhos (não significativo estatisticamente), além de exibirem pior curva de sobrevida livre de falha terapêutica ($p=0,048$) e tendência a pior curva de SG ($p=0,110$). O algoritmo de *Nyman* apresentou boa concordância com o algoritmo de *Hans* (coeficiente Kappa: 0,727).

O estudo IHQ tornou-se relevante tanto para o diagnóstico do LDGCB como para sua subclassificação em GCB e NGCB, utilizando os diferentes

algoritmos desenvolvidos, especialmente os algoritmos PEG pareados (Tabela 8). Os quais devem ser utilizados até que os estudos de PEG utilizando TFFP estejam universalmente disponíveis.⁵³⁻⁵⁵

Tabela 8. Algoritmos imuno-histoquímicos para classificação do LDGCB e os marcadores utilizados para definir a origem celular (GCB vs. NGCB).

ALGORITMOS	MARCADORES GCB	MARCADORES NGCB	PEG PAREADO
Hans et al., 2004	BCL6 (Policlonal; diluição 1:75) Cutoff 30% CD10 (56C6; diluição 1:1) Cutoff 30%	MUM1 (MUM1p; diluição 1:10) Cutoff 30%	SIM
Choi et al., 2009	BCL6 (PG-B6p; diluição 1:60) Cutoff 30% CD10 (56C6; puro) Cutoff 30% GCET1 (RAM341; puro) Cutoff 80%	FOXP1 (JC12; diluição 1:80) Cutoff 80% MUM1 (MUM1p; diluição 1:10) Cutoff 80%	SIM
Visco et al., 2012	BCL6 (LN22; diluição 1:100) Cutoff 30% CD10 (56C6; diluição 1:100) Cutoff 30%	FOXP1 (JC12; diluição 1:16000) Cutoff 60%	SIM
Muris et al., 2006	CD10 (56C6) Cutoff 30%	BCL2 (124) Cutoff 50% MUM1 (MUM1p) Cutoff 30%	NÃO
Nyman et al., 2009		FOXP1 (JC12; diluição 1:80) Cutoff 100% MUM1 (MUM1p; diluição 1:100) Cutoff 30%	NÃO

GCB: subtipo imuno-histoquímico célula B centrogerminativa simile; LDGCB: linfoma difuso de grandes células B; NGCB: subtipo imuno-histoquímico célula B não-centrogerminativa simile.

1.4.3 Biomarcadores

O estudo IHQ também tornou-se importante ferramenta para avaliar a expressão de proteínas relacionadas à oncogênese, progressão de doença e refratariedade terapêutica, podendo ser utilizado para identificar os pacientes que eventualmente se beneficiariam de estratégias terapêuticas diferentes do esquema padrão de tratamento.

1.4.3.1 CD30

O CD30 é uma proteína membro da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral (RTNF) e a sua ativação produz efeitos pleiotrópicos através da translocação nuclear de membros da família do fator de transcrição NF- κ B e da via *mitogen activated protein kinase* (MAPK), entre outros. Em estudos *in vitro* demonstraram que o CD30 pode desempenhar um papel na coestimulação das células-T, na secreção de citocinas e quimiocinas, além de regular a *class-switch* em células-B e desempenhar um papel tanto na proliferação como na apoptose celular. A expressão de CD30 podem ser induzidas em células B normais expostas a vários agentes de ativação.⁵⁶

O CD30 foi originalmente identificado como antígeno em células de Hodgkin e células de Reed-Sternberg (HRS) no Linfoma de Hodgkin clássico (LHC). Além disso, o CD30 é expresso por diferentes LNH de células-T e células-B, tais como Linfoma de grandes células anaplásicas (LGCA), Linfoma de grandes células B do mediastino/tímico (LGCB-Med), doenças linfoproliferativas relacionadas ao vírus Epstein-Barr (EBV), bem como em condições reativas.⁵⁷

Hu et al. avaliaram 903 pacientes com LDGCB *de novo* tratados com imunoquimioterapia (461 pacientes do grupo teste e 442 do grupo de validação), sugerindo que os casos de LDGCB CD30-positivos podem representar um novo subgrupo de LDGCB, com melhor prognóstico e expressão gênica distinta.⁵⁸ Os casos de LDGCB EBV-positivos foram avaliados separadamente dos casos EBV-negativos. O estudo IHQ foi realizado em TMA, sendo avaliados: BCL2, BCL6, CD10, CD30, FOXP1, GCET1, Ki67, MUM1, MYC, p21 e p53. Os valores de *cutoff* foram definidos

utilizando curvas ROC, sendo 20% para CD30, p21 e p53; 30% para BCL6 e CD10; 40% para MYC; 60% para FOXP1, GCET1 e MUM1; 70% para Ki67 e BCL2. O estudo de PEG foi realizado em 445 casos do grupo teste e 442 do grupo de validação, utilizando os blocos TFFP. Todos os pacientes foram classificados em diferentes subgrupos moleculares e/ou IHQ (algoritmo de *Visco-Young*). Estudos de FISH foram realizados em todos os casos para avaliação dos rearranjos nos genes BCL2, BCL6 e MYC. O gene TP53 foi sequenciado em todos os pacientes do grupo teste (461 pacientes). Os resultados revelaram positividade para CD30 em 14% dos pacientes no grupo teste (n=65), os quais apresentaram melhores taxas de SG e SLP em 5 anos quando comparados com os casos de LDGCB CD30 negativos (SG-5 79% vs. 59%, $p=0,0013$; SLP-5 73% vs. 57%, $p=0.003$). Este achados foram confirmados no grupo de validação. Os estudos de PEG ressaltaram que os casos CD30 positivos seriam caracterizados por ativação de genes supressores da via do NF- κ B, genes relacionados as vias do RTNF e citocinas, genes relacionados a moléculas de adesão e a vias de sinalização do receptor das células B (BCR). Contudo, quando avaliou-se o impacto prognóstico da expressão do CD30 em pacientes com LDGCB EBV-positivo, revelou-se que a positividade para o CD30 neste contexto implica em pior prognóstico.

Estudo posteriormente publicado, que avaliou o impacto da expressão do CD30 no prognóstico de pacientes com LDGCB tratados com imunoquimioterapia, apresentou resultados semelhantes em relação ao prognóstico dos pacientes CD30 positivos.⁵⁹

Além disso, a avaliação da expressão do CD30 em casos de LDGCB pode ser relevante, devido ao desenvolvimento de uma nova droga chamada

de Brentuximabe-vedotin (SGN-35), que combina um anticorpo monoclonal anti-CD30 e o agente antitubulina monometil-auristatina-E. Esta droga cria novas possibilidades terapêuticas, incluindo a sua utilização em combinação com os esquemas padrão de tratamento ou como opção terapêutica num cenário de doença recidivada ou refratária.⁶⁰

1.4.3.2 BCL2

BCL2 é uma proteína anti-apoptótica relevante para o desenvolvimento normal de células B. A hiperexpressão do BCL2 é observado em cerca de 40-60% dos pacientes com LDGCB, e tem sido associada a prognóstico desfavorável.⁶¹

No início, foi proposto que a hiperexpressão do BCL2 estaria associada a pior prognóstico nos casos de LDGCB em geral.⁶² Posteriormente, ainda na *era CHOP* foi demonstrado que a hiperexpressão estimada por estudo IHQ (BCL2, clone 124) teria relevância prognóstica apenas nos casos de LDGCB CBA, mas não no subtipo CG.⁶³ O oposto foi demonstrado com a introdução da imunoquimioterapia com R-CHOP, pois o impacto negativo da hiperexpressão do BCL2 estimada por estudo IHQ (BCL2, clone 124) no prognóstico estaria restrito aos pacientes com subtipo CG.^{64,65} Estes resultados paradoxais podem ser explicados pelos diferentes mecanismos de hiperexpressão do BCL2 nos subgrupos moleculares do LDGCB e no mecanismo de ação do Rituximabe. A hiperexpressão do BCL2 nos casos de LDGCB CG está relacionada a presença da translocação t(14; 18), e a resistência terapêutica BCL2-induzida nestes casos não pode ser superada pelo uso de Rituximabe. Nos casos de LDGCB CBA, a hiperexpressão do BCL2 é devido a amplificação do gene

BCL2 ou a ativação constitutiva da via do NF- κ B, a qual pode ser inibida pelo Rituximabe.⁴²

1.4.3.3 MYC

MYC (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog) é um fator de transcrição que age sobre genes mediadores do metabolismo, biossíntese e progressão do ciclo celular. A sua hiperexpressão aberrante está associada ao crescimento celular, divisão celular e metastases, enquanto a perda de expressão ou inibição da expressão do MYC bloqueia o crescimento celular, induz a diferenciação celular e sensibiliza as células ao dano no DNA. Outros alvos transcricionais também regulados pelo MYC são inúmeros microRNAs (miRNAs), incluindo miRNAs supressores e oncogênicos.^{66,67}

O LDGCB pode apresentar diferentes aberrações genéticas com ativação oncogênica do gene MYC, levando a sua hiperexpressão. Esta ativação pode ocorrer por alterações diretas no gene como translocações e ampliações gênicas, ou secundária a desregulação *upstream* da via de sinalização. A translocação do gene MYC pode ser identificada em 10-15% dos casos de LDGCB, sendo frequentemente os genes parceiros os genes das cadeias leve da imunoglobulina ou genes não-imunoglobulina, além de usualmente estarem associados a cariótipo complexo.⁶⁸

A presença de rearranjo do gene MYC já é reconhecido como importante marcador de prognóstico desfavorável nos casos de LDGCB tratados com imunoterapia padrão (R-CHOP).⁶⁹⁻⁷¹ Contudo, a pesquisa do rearranjo do MYC em todos os casos de LDGCB nem sempre é possível no Brasil, tanto por condições econômicas quanto pela disponibilidade técnica do exame. Portanto, o desenvolvimento do anticorpo monoclonal que permite a avaliação

da expressão proteica do MYC criou a oportunidade da avaliação do status do gene em espécimes de TFFP na rotina diária, com metodologia universalmente disponível.

Tapia et al. em 2011 estimaram a expressão de anticorpo monoclonal comercialmente disponível (clone Y69) e a correlacionou com o status do gene MYC, na tentativa de defini-la como ferramenta de triagem.⁷² Foram avaliados retrospectivamente 56 pacientes com LNH agressivos, sendo 9 casos de Linfoma de Burkitt (LB), 45 casos de LDGCB e 2 casos de Linfoma de células B inclassificável, com características intermediárias entre o LDGCB e o Linfoma de Burkitt (LBI-LDGCB/LB). Estes casos já tinham o status do gene MYC conhecido por pesquisa realizada durante a avaliação inicial dos pacientes. O estudo IHQ foi realizado na amostra original de TFFP, sendo avaliados os seguintes anticorpos: BCL2 (clone 124 e diluição 1:200), BCL 6 (clone PG-P6p e diluição 1:30), CD3 (clone PS1 e diluição 1:30), CD10 (clone 56C6 e diluição 1:20), CD20 (clone L26 e diluição 1:300), Ki67 (clone MIB1 e diluição 1:800), e MUM1 (clone MUM1p e diluição 1:40). Os casos foram classificados em GCB ou NGCB de acordo com o algoritmo de *Hans*⁴⁸. A avaliação do anticorpo MYC (clone Y69 e diluição 1:100) foi realizada em TMA, sendo estimado percentual de células neoplásicas positivas por dois patologistas. Os resultados discordantes foram discutidos em conjunto até consenso.

O FISH para avaliação do status do gene MYC havia sido realizado, utilizando-se sondas de partição. Os resultados revelaram rearranjo do gene MYC em 8 casos de LB (88,9%) e aumento no número de cópias do gene (4 cópias/célula) no caso sem o rearranjo. Em ambos casos de LBI-LDGCB/LB foram identificados rearranjo do gene. Entre os casos de LDGCB, 9

apresentaram rearranjo do gene (20%) e outros 9 casos (20%) apresentaram aumento no número de cópias do gene (3-5 cópias/célula). Os casos de LDGCB sem rearranjo do gene MYC (n=36) foram classificados como: 16 casos (44%) de subgrupo GCB e 20 casos (56%) como subgrupo NGCB. Nos casos de LDGCB com rearranjo do MYC (n=9), 5 casos (56%) foram classificados como GCB e 4 casos (44%) como NGCB. A análise estatística não revelou relação significativa entre a classificação IHQ e o rearranjo do gene MYC. A estimativa da expressão da proteína MYC com a utilização do anticorpo monoclonal revelou positividade nuclear em 70% das células tumorais em todos os casos de LNH agressivos com rearranjo do gene, enquanto nos casos sem o rearranjo a positividade foi de 28%. Houve relação significativa entre rearranjo do gene e expressão proteica do MYC ($0 < 0,001$). Não foi identificada diferença na expressão do MYC entre os casos com alteração no número de cópias do gene e aqueles com status normal no gene (31% vs. 28%, respectivamente).

Kluk et al. em 2012 também avaliaram a expressão do MYC, utilizando o mesmo anticorpo monoclonal (clone Y69 e concentração de 0,56µg/mL), em 56 pacientes com LDGCB *de novo* e 21 pacientes com LDGCB secundários (recidiva ou transformação).⁷³ Neste trabalho também foi realizado FISH para avaliar o status do gene MYC e estudo de PEG para avaliar a expressão dos genes alvo do MYC. Os resultados revelaram que todos os casos de LDGCB *de novo* e secundário com rearranjo do gene MYC apresentaram positividade nuclear de forte intensidade em >50% das células tumorais (60-90%). Houveram 6 casos de LDGCB *de novo* ou secundário sem rearranjo do MYC que expressaram positividade nuclear forte em em >50% das células tumorais.

Os estudos de expressão gênica comprovaram que tanto o gene MYC como os seu genes alvo estavam ativados nos casos de LDGCB com MYC hiperexpresso (>50% das células tumorais), independente do status do gene. Outro achado relevante foi o impacto prognóstico negativo da hiperexpressão do MYC em pacientes tratados com R-CHOP ($p=0,01$).

Outros estudos utilizando valores de *cutoff* diferentes (10 e 30%) para definir a hiperexpressão do MYC também confirmaram o seu impacto prognóstico negativo.^{74,75}

1.4.3.4 Coexpressão BCL2 e MYC/Linfoma Duplo-expressor (LDE)

Nos últimos anos, os LNH com rearranjos genéticos recorrentes ativando múltiplos oncogenes ficaram conhecidos como *linfomas double-hit* (LDH), os quais são caracterizados por curso clínico agressivo e resposta insatisfatória à terapia padrão. Os LDH mais conhecidos são aqueles com rearranjo simultâneo dos genes MYC e BCL2, os quais geralmente mostram um espectro morfológico amplo, com a maioria dos casos sendo classificados como LDGCB ou como LBI-LDGCB/LB, entidade provisória da classificação da OMS 2008.^{76,77}

Finalmente em 2012, dois estudos foram publicados simultaneamente por grupos diferentes no *Journal of Clinical Oncology*, os quais foram fundamentais para criação do conceito de *linfoma duplo-expressor* (LDE), expandindo o entendimento sobre os LDH.

Johnson et al. estudaram retrospectivamente grupo teste de 167 pacientes com LDGCB *de novo* tratados com R-CHOP, além de grupo de validação com 140 pacientes com LDGCB.⁷⁸ O estudo IHQ foi realizado em TMA, sendo utilizados: BCL2 (clone 124 e diluição 1:10) e MYC (clone Y69 e

diluição 1:50). A positividade foi estimada semiquantitativamente nas células tumorais com variação de 10%. Os valores de *cutoff* foram definidos utilizando *X-Tile statistical software*, que identifica o valor ótimo para associação do biomarcador e a SG. Os valores identificados foram: $\geq 40\%$ para o MYC, e $\geq 50\%$ para o BCL2. Estudos de FISH foram realizados para avaliação do rearranjo dos genes BCL2 e MYC, além de estudo de PEG. Os resultados revelaram que 29% dos pacientes do grupo de validação apresentaram hiperexpressão do MYC (n=48 de 167), 11% exibiram rearranjo do MYC (n=18 de 167) e 11% exibiram alta expressão de RNAm (n=19 de 167). No grupo de validação os resultados foram similares, 37% dos pacientes apresentaram hiperexpressão do MYC (n=52 de 140) e 13% rearranjo do MYC (n=16 de 123). Um achado interessante foi que os casos que apresentavam o rearranjo do gene MYC também exibiram um percentual maior de células positivas no estudo IHQ (valor médio: 61% vs. 29%, $p < 0,01$). A hiperexpressão do BCL2 associou-se com o subtipo molecular CBA, e o rearranjo do gene BCL2 com o subtipo CG. A hiperexpressão isolada do MYC ou mesmo o seu rearranjo isolado não revelaram importância prognóstica no grupo teste. Os fatores que influenciaram o prognóstico em análise univariada foram o IPI alto, subtipo molecular CBA, MYC RNAm alto e hiperexpressão do BCL2. Outro achado relevante foi identificar que os casos que apresentavam desregulação do MYC (rearranjo do MYC, MYC RNAm alto ou hiperexpressão do MYC) de pior prognóstico eram aqueles que também apresentavam hiperexpressão do BCL2. Na coorte de validação a coexpressão do MYC e BCL2 também se relacionou com pior SG e SLP. Mesmo após análise multivariada e ajuste ao

IPI, o fenótipo LDE se mostrou relevante marcador prognóstico em pacientes com LDGCB tratados com imunoquimioterapia.

Green et al. avaliaram retrospectivamente grupo teste de 193 pacientes com LDGCB *de novo* tratados com R-CHOP, e grupo de validação com 116 pacientes com LDGCB tratados com R-CHOP.⁷⁹ O estudo IHQ foi realizado em TMA, sendo avaliados: BCL2 (clone 124 e diluição 1:10), BCL6 (clone LN22 e diluição 1:40), CD10 (clone 56C6 e diluição 1:10), MUM1 (clone MUM1p e diluição 1:20), e MYC (clone Y69 e diluição 1:100). A positividade foi estimada semiquantitativamente nas células tumorais com variação de 10%. Os valores de *cutoff* para o BCL2 e MYC foram definidos baseado nos valores medianos encontrados no grupo teste, sendo de 40% para MYC e 70% para BCL2. Estudos de FISH foram realizados para avaliação do rearranjo dos gene BCL2 e MYC. Os resultados evidenciaram que 29% dos pacientes do grupo teste apresentaram fenótipo LDE (n=54 de 185), dos quais 54% (n=29 de 54) exibiram rearranjo gênico pelo FISH (4 casos com rearranjo apenas do MYC; 16 casos apenas do BCL2; e 9 casos com rearranjo do BCL2 e MYC). O fenótipo LDE identificou 90% dos casos LDH no grupo teste (n=9 de 11). A hiperexpressão isolada de BCL2 ou MYC não impactaram no prognóstico dos pacientes tanto no grupo teste quanto no grupo de validação, porém o fenótipo LDE se mostrou importante marcador prognóstico independente do IPI e do subtipo molecular.

Diante do exposto, tornou-se importante estabelecer o valor das diversas estratégias de estratificação de risco no LDGCB, utilizando metodologia universalmente disponível e aplicável em um país com população miscigenada como a brasileira, levando em consideração a realidade econômica e

geográfica do país. Além de estimar a real utilidade e aplicabilidade destas diferentes estratégias no contexto da prática diária com avaliação dos diferentes tipos de espécimes utilizados na rotina diagnóstica. Afinal, a maioria dos trabalhos foram desenvolvidos em países com realidades econômica e étnica diferentes da brasileira, assim como frequentemente utilizaram amostras mais homogêneas, que são típicas nos estudos com TMA. Portanto, a realização deste trabalho é relevante para elevar o nível das evidências para utilização das diferentes estratégias IHQ para classificação do LDGCB e avaliação de biomarcadores na nossa realidade, avaliando coorte de pacientes uniformemente tratados e protocolarmente avaliados e acompanhados em centro de referência nacional no tratamento de LNH.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal

Avaliar os fatores prognósticos/preditivos utilizando-se a detecção de marcadores moleculares através da técnica de IHQ em coorte de pacientes com LDGCB, SOE *de novo*, tratados uniformemente com esquema R-CHOP e R-CHOP-simile, acompanhados protocolarmente em centro de referência brasileiro no tratamento de LNH.

2.2 Objetivos secundários

2.2.1 Avaliar o poder prognóstico da classificação IHQ do LDGCB através de cinco algoritmos IHQ diferentes (*Hans, Choi, Visco-Young, Muris e Nyman*), utilizando o material original do diagnóstico em cortes histológicos integrais.

2.2.2 Avaliar a concordância entre os cinco algoritmos IHQ diferentes, PEG pareados (*Hans, Choi e Visco-Young*) e PEG não-pareados (*Muris e Nyman*).

2.2.3 Avaliar o valor prognóstico da hiperexpressão de biomarcadores (BCL2, CD30 e MYC) utilizando estudo IHQ.

2.2.4 Identificar subgrupo de pacientes com LDGCB,SOE tratados com esquema padrão de terapia e com maior risco de morte, os quais seriam possíveis candidatos de novas estratégias terapêuticas.

3 MÉTODOS

Este estudo retrospectivo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob número 0274/11 (Apêndice).

3.1 Seleção dos pacientes

Foram selecionados os pacientes com LDGCB *de novo*, previamente não tratados e diagnosticados entre agosto de 2008 e agosto de 2011. Todos os pacientes foram tratados e acompanhados na Divisão de Hematologia do Hospital das Clínicas/Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e Instituto do Câncer do Estado de São Paulo/Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICESP/FMUSP).

Todos os pacientes foram tratados com esquema de imunoquimioterapia padrão (esquema R-CHOP ou R-CHOP-simile), assim como foram avaliados inicialmente, estadiados e acompanhados conforme recomendações protocolares²⁴.

Os critérios de exclusão do estudo foram: (1) pacientes com história prévia de linfoma indolente e subsequente transformação; (2) tumores relacionados a imunodeficiência primária ou adquirida; (3) tumores primários da pele, sistema nervoso central (SNC), primário de efusões ou primário do mediastino; (4) história de quimioterapia prévia, ou diagnóstico de outro

câncer prévio ou sincrônico; e (5) dados clínicos incompletos ou material disponível insuficiente para realizar os estudos IHQ.

História clínica, dados de tratamento e resposta foram obtidos dos prontuários eletrônicos pela equipe da Hematologia/FMUSP que colaborou com este estudo.

3.2 Avaliação morfológica

Todo material disponível dos pacientes selecionados presente nos arquivos da Divisão de Anatomia Patológica/HCFMUSP (DAP/HCFMUSP) e do Serviço de Anatomia Patológica/ICESP foi identificado e separado, incluindo blocos de TFFP e lâminas.

Novas lâminas para estudo morfológico foram confeccionadas com o material disponível do diagnóstico original, sendo realizados cortes histológicos com 4 μ m de espessura e coradas com coloração de hematoxilina e eosina (HE), conforme protocolo padrão de coloração da DAP/HCFMUSP (Figura 12).

Figura 12. Aspecto morfológico de casos de linfoma difuso de grandes células B, SOE *de novo* incluídos no grupo de estudo. Coloração de Hematoxilina-Eosina e aumento de 20x.

Foram incluídos na avaliação morfológica os espécimes do diagnóstico original, podendo corresponder a amostra de peça cirúrgica, BXe, BXi e BAG, assim como foram reavaliadas as BMO do estadiamento inicial.

Todos os casos selecionados que apresentaram material disponível para estudo morfológico foram reavaliados por três patologistas com experiência na área e reclassificados de acordo com os critérios da OMS 2008⁷.

3.3 Estudo imuno-histoquímico

O estudo IHQ foi realizado em todos os casos selecionados e confirmados de LDGCB. A reação foi realizada em cortes histológicos de 4µm de espessura, dispostos em lâminas histológicas previamente tratadas com o aderente 3-aminopropil-trietoxisilano, seguindo-se a técnica de amplificação com polímero e contracoloração pela Hematoxilina. Realizou-se a desparafinação em xilol seguida de hidratação em solução aquosa de álcool etílico e lavagem com água. Após o bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada a 3%, por vinte minutos, os cortes histológicos foram colocados em solução de ácido cítrico a 0.01M, pH 6,0 e submetidos calor úmido em panela de pressão para a recuperação antigênica por 2 a 3 minutos dependendo do antígeno avaliado. Após descanso de 20 minutos, incubou-se o anticorpo primário por 18 horas a 4°C em câmara úmida. Após a lavagem das lâminas em solução salina tamponada, foi adicionado polímero (NOVOLINKTM MAX POLYMER DETECTION SYSTEM – REF RE 7280-K), incubando-o em duas etapas de 30 minutos. A reação foi revelada com DAB por cinco minutos e contracorada com hematoxilina.

Os anticorpos estudados foram: BCL2, BCL6, CD3, CD5, CD10, CD20, CD21, CD30, Ciclina D1, EBV/LMP1, FOXP1, GCET1, Ki67, MUM-1 e MYC (Tabela 9). A reação IHQ de todos anticorpos nem sempre foi realizada em

todos os casos selecionados e incluídos no estudo, devido a desgaste e esgotamento do material disponível.

Tabela 9. Dados técnicos dos anticorpos estudados.

<i>ANTÍGENO</i>	<i>CLONE</i>	<i>MARCA</i>	<i>DILUIÇÃO</i>
BCL2	124	Dako	1:2000
BCL2	E17	Epitomics	1:100
BCL6	PIF6	Novocastra	1:100
CD3	F7.2.38	Dako	1:500
CD5	4C7	Novocastra	1:500
CD10	56C6	Novocastra	1:500
CD20	L26	Dako	1:10000
CD21	2G9	Novocastra	1:5000
CD30	BER-H2	Dako	1:4000
CICLINA D1	SP4	Labvision	1:500
EBV/LMP1	CS.1-4	Dako	1:100
FOXP1	JC12	Abcam	1:500
GCET1	RAM341	Abcam	1:100
Ki-67	KiS5	Dako	1:500
MUM1	MUM1p	Dako	1:3000
MYC	Y69	Epitomics	1:50

BCL2: B-cell lymphoma 2; BCL6: B-cell lymphoma 6; CD3: Cluster of Differentiation 3; CD5: Cluster of Differentiation 5; CD10: Cluster of Differentiation 10; CD20: Cluster of Differentiation 20; CD21: Cluster of Differentiation 21; CD30: Cluster of Differentiation 30; EBV: Vírus Epstein-Barr; LMP1: Virus latent membrane protein 1; FOXP1: Forkhead box protein P1; GCET1: Germinal center B cell-expressed transcript-1; MUM1: Multiple myeloma oncogene 1; MYC: V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog.

As lâminas do estudo IHQ foram confeccionadas com cortes histológicos integrais, as quais foram avaliadas independentemente por 2 patologistas. A positividade dos marcadores em células neoplásicas foi estimada semiquantitativamente com variações de 10% em áreas representativas do tumor. Nos casos em que a reação IHQ se mostrou

heterogênea devido a artefatos técnicos, foram avaliadas as áreas mais representativas do tumor que apresentavam melhores fixação e reação IHQ, sendo avaliados 3 a 5 campos de grande aumento (CGA). Todos os casos discordantes foram reavaliados em conjunto sendo considerados os resultados consensuais.

Os casos foram classificados em GCB e NGCB baseado nos critérios de três algoritmos IHQ PEG pareados (*Hans, Choi e Visco-Young*)⁴⁸⁻⁵⁰ e dois algoritmos IHQ PEG não-pareados (*Muris e Nyman*)^{51,52}. O valor de *cutoff* no algoritmo de *Hans* para BCL6, CD10 e MUM1 é de $\geq 30\%$; no algoritmo de *Choi* os valores de *cutoff* são $\geq 30\%$ para o CD10 e BCL6, e $\geq 80\%$ para FOXP1, GCET1 e MUM1; no algoritmo de *Visco-Young* os valores de *cutoff* são de $\geq 30\%$ para o CD10 e BCL6, e $\geq 60\%$ para FOXP1; no algoritmo de *Muris* os valores de *cutoff* são de $\geq 50\%$ para BCL2, e $\geq 30\%$ para CD10 e MUM1; e no algoritmo de *Nyman* os valores de *cutoff* são de $\geq 30\%$ para MUM1, e 100% para FOXP1.

Os biomarcadores avaliados com estudo IHQ foram o BCL2 (clone 124 e clone E17), CD30 e MYC. Curvas ROC foram construídas para identificar as especificidades e sensibilidades de cada um dos marcadores para prever a SG. Os valores de *cutoff* foram determinados através do cálculo do índice de Youden das curvas ROC, o qual identifica o ponto na curva com o máximo de sensibilidade e especificidade de cada marcador (Anexos A, B e C). O índice de Youden apontou como valores ótimos de *cutoff*: 70% para BCL2/clone 124 e BCL2/clone E17, 80% para CD30 e 40% para MYC.

3.4 Hibridização “in situ” (HIS) para vírus Epstein-Barr (EBV)

A hibridização “in situ” (HIS) foi realizada para pesquisar a presença de dois transcritos nucleares do RNA codificado pelo vírus Epstein-Barr (EBV), EBER1 e EBER2.

Foi utilizado produto comercial composto por quatro sondas marcadas com fluoresceína complementares a partes do EBER1 e EBER2 (Dako, código Y5200). As sondas foram aplicadas em cortes histológicos de 4µm de espessura, dispostas em lâminas histológicas previamente tratadas com o aderente 3-aminopropil-trietoxisilano,. Foi realizada digestão proteica com proteinase K, durante 25 minutos em câmara úmida e em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em água Milli-Q¹ por 3 minutos, depois mergulhadas em etanol por 10 segundos e secaram em temperatura ambiente. Incubou-se com isotiocianato de fluoresceína (FITC) conjugado a sonda EBER por 90 minutos. As lâminas foram posteriormente lavadas novamente em água Milli-Q e colocadas em solução de lavagem em Banho Maria à 55°C por 25 minutos. Após este período, as lâminas foram passadas no TBS por 10 segundos e incubadas com anticorpo conjugado com fosfatase alcalina anti-FITC e 4-tetrazólio nitroazul substrato de fosfato/cloreto de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo combinado com levamisol (Dako, código K5201). As instruções do fabricante foram seguidas cuidadosamente, e contaminação com RNAses foi evitado estritamente. Os controles positivos e negativos foram incluídos em cada série, como recomendado pelo fabricante.

¹ Água Milli-Q: água deionizada que foi purificada em um sistema Milli-Q.

As células que apresentam marcação nuclear foram considerados positivas. Os casos que apresentaram positividade na maioria das células tumorais (>50%) foram classificados como LDGCB EBV-relacionado.

3.5 Análise estatística

As variáveis categóricas foram analisadas utilizando o teste chi-quadrado (χ^2) de Pearson, calculada a partir do método da máxima verossimilhança. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando os valores de p foram menores que 0,05. Os Intervalos de confiança foram construídos com *coeficiente de confiança* de 95%.

A SG foi estimada da data do diagnóstico original até a data do óbito ou até a data do último dia de acompanhamento. Os paciente que morreram por causas não relacionadas à doença foram censurados. Foi empregado a metodologia de Kaplan-Meier para construção das curvas de sobrevida global, e as diferenças entre elas foram analisadas com o teste de Breslow. As curvas estratificadas segundo IPI foram ajustadas a partir do modelo de regressão de Cox.

A concordância entre os diferentes algoritmos IHQ para classificação do LDGCB foi determinada com a aplicação da *Estatística κ* , considerada medida robusta, a qual considera o risco de concordância ao acaso. Landis e Koch⁸⁰ propuseram os seguintes padrões do coeficiente kappa para interpretação do grau de concordância: nenhuma ($\text{kappa} \leq 0$), fraca ($\text{kappa} = 0,01-0,20$), sofrível ($\text{kappa} = 0,21-0,40$), regular ($\text{kappa} = 0,41-0,60$), boa ($\text{kappa} = 0,61-0,80$) e quase perfeito ($\text{kappa} = 0,81-1,0$).

As curvas ROC foram obtidas através do pacote pROC. Os intervalos de credibilidade foram obtidos utilizando a técnica de bootstrap (pacote boot). Os valores ótimos utilizando o método de Youden foram obtidos com o pacote Optimal Cutpoints.

4 RESULTADOS

4.1 Características clínicas e evolução

Originalmente foram selecionados cento e setenta e cinco (175) pacientes diagnosticados como LDGCB entre agosto de 2008 e agosto de 2011, os quais foram submetidos a avaliação inicial, estadiamento e acompanhamento recomendado por Cheson et al.²⁴. Noventa e seis (96) pacientes foram excluídos do grupo de estudo, dos quais sessenta e três (63) não apresentavam material disponível para realização de estudo IHQ (13 BAG com amostra desgastada e 50 espécimes externos indisponíveis nos arquivos). Vinte e nove (29) pacientes foram reclassificados ou apresentavam antecedente de LNH indolente prévio com subsequente transformação para LDGCB. Quatro (04) pacientes não apresentavam todos os dados clínicos disponíveis no arquivo eletrônico. As características clínicas disponíveis do grupo de pacientes excluídos está resumida em Anexo D.

O grupo de estudo foi composto pelos setenta e nove (79) pacientes remanescentes do grupo originalmente selecionado. As características clínicas destes pacientes encontra-se resumida na Tabela 10. Foram estudados quarenta e nove (49/62%) pacientes do sexo feminino e trinta (30/38%) do sexo masculino, com relação feminino/masculino 1,63:1,00. As idades média e mediana foram de 56 e 58 anos (17-82 anos), respectivamente. A idade média das mulheres foi de 57,3 anos e dos homens de 55,2 anos, sem diferença significativa entre as médias etárias ($p=0,65$). Quarenta e três (54%) apresentavam idade menor que sessenta (60/54%) anos. Vinte e sete

pacientes (27/34%) exibiram apresentação nodal do LDGCB, e cinquenta e dois (52/66%) exibiram apresentação extranodal.

Trinta e dois (32/40,5%) pacientes foram estadiados como doença localizada, quarenta e sete (47/59,5%) como doença avançada, segundo a classificação de Ann Arbor. Onze (11/13,9%) pacientes foram classificados como estágio I, vinte e um (21/26,6%) como estágio II, dez (10/12,7%) como estágio III, e trinta e sete (37/46,8%) como estágio IV.

Os pacientes foram estratificados segundo o IPI, sendo que vinte e quatro (24/30,4%) foram classificadas como baixo risco (0-1 fator de risco), vinte e seis (26/32,9%) classificados como risco intermediário/baixo (2 fatores de risco), vinte (20/25,3%) classificados como intermediário/alto (3 fatores de risco), e nove (9/11,4%) classificados como alto risco (4-5 fatores de risco). Baseado no R-IPI, onze (11/13,9%) pacientes foram classificados como grupo de risco muito bom (0 fator de risco), trinta e nove (39/49,4%) no grupo de risco bom (1-2 fatores de risco), e vinte e nove (29/36,7%) estratificados como grupo de risco ruim (3-5 fatores de risco).

Todos os pacientes foram tratados com imunoquimioterapia padrão com intuito curativo. Trinta e dois (32/40,5%) pacientes foram tratados com esquema R-CHOP; trinta e três (33/41,8%) tratados com R-CHOP e RTCE; três (3/3,8%) pacientes foram tratados com mini-R-CHOP e RTCE; três (3/3,8%) foram tratados com R-CHOMP¹, e oito (8/10,1%) pacientes foram tratados com R-CHOMP e RTCE. Cinquenta e cinco (55/69,6%) pacientes atingiram RC, dezesseis (16/20,3%) pacientes RP, e oito (8/10,1%) pacientes foram refratários ao tratamento ou exibiram progressão da doença.

¹ R-CHOMP: rituximabe, ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina, metotrexato e prednisona.

Tabela 10. Características clínicas entre os pacientes do grupo de estudo

Pacientes (n=79)	
Idade mediana	58 anos (17-82)
<60 anos	43 (54%)
Sexo (n)	
Masculino	30 (38%)
Feminino	49 (62%)
Apresentação	
Nodal	27 (34,2%)
Extranodal	52 (65,8%)
Tratamento	
R-CHOP	32 (40,5%)
R-CHOP + RTCE	33 (41,8%)
mini-R-CHOP + RTCE	3 (3,8%)
R-CHOMP	3 (3,8%)
R-CHOMP + RTCE	8 (10,1%)
Resposta terapêutica	
Remissão completa (RC)	55 (69,6%)
Remissão parcial (RP)	16 (20,3%)
Sem resposta/Progressão	8 (10,1%)
Estadiamento anatômico/Ann Arbor	
Estágio I	11 (13,9%)
Estágio II	21 (26,6%)
Estágio III	10 (12,7%)
Estágio IV	37 (46,8%)
Grupos prognósticos	
IPI	
Baixo (0-1 fator de risco)	24 (30,4%)
Intermediário/baixo (2 fatores de risco)	26 (32,9%)
Intermediário/alto (3 fatores de risco)	20 (25,3%)
Alto (4-5 fatores de risco)	9 (11,4%)
R-IPI	
Muito bom (0 fator de risco)	11 (13,9%)
Bom (1-2 fatores de risco)	39 (49,4%)
Ruim (3-5 fatores de risco)	29 (36,7%)

IPI: Índice Prognóstico Internacional; R-CHOP: rituximabe, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona; R-CHOMP: rituximabe, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, metotrexato e prednisona; R-IPI: Índice Prognóstico Internacional revisado; RTCE: radioterapia de campo envolvido. Fatores de risco do IPI e R-IPI: idade>60 anos; estágio Ann Arbor III/IV; >1 sítio extranodal envolvido; ECOG ≥2; e DHL sérica elevada.

O tempo de duração do acompanhamento clínico variou de 2,1 a 65,1 meses, com acompanhamento mediano de 41,1 meses. Durante este período, nove (9/11,4%) pacientes apresentaram progressão de doença e catorze (14/17,7%) pacientes morreram devido ao LDGCB. A taxa de sobrevida global em 5 anos (SG-5) foi de 75,1%, com média estimada de 38,1 meses (Figura 13).

Figura 13. Curva Kaplan-Meier estimando sobrevida global dos pacientes com LDGCB diagnosticados entre agosto de 2008 e agosto de 2011, tratados com imunoquimioterapia padrão.

4.2 Estratificação de risco clínico

Ambos modelos de estratificação de risco clínico, IPI e R-IPI, se mostraram preditivos de SG nos pacientes tratados com imunoquimioterapia padrão (Figura 14). Os pacientes estratificados pelo IPI apresentaram estimativa de sobrevida de: 63,5 meses ($\pm 1,5$, 95% IC=60,5 – 66,4) nos casos classificados como baixo risco (0-1 fator de risco); 52,9 meses ($\pm 3,1$, 95% IC=46,9 – 58,9) naqueles classificados como risco intermediário/baixo (2 fatores de risco); 45 meses ($\pm 4,3$, 95% IC=36,6 – 53,4) nos classificados como

risco intermediário/alto (3 fatores de risco); e 35,9 meses ($\pm 7,8$, 95% IC=20,7 – 51,2) nos classificados como risco alto (4-5 fatores de risco). A estratificação dos pacientes pelo R-IPI apresentaram estimativa de sobrevida de: 55,8 meses ($\pm 1,5$, 95% IC=52,9 – 58,8) nos pacientes classificados como grupo de risco muito bom (0 fator de risco); 59,7 meses ($\pm 2,4$, 95% IC=55,2– 64,7) naqueles classificados como grupo de risco bom (1-2 fatores de risco); 42,7 meses ($\pm 3,9$, 95% IC=35,2 – 50,3) no classificados como grupo de risco ruim (3-5 fatores de risco).

Figura 14. Curvas de Kaplan-Meier, estimativa de sobrevida global de acordo com modelos clínicos de estratificação de risco, nos pacientes com LDGCB tratados com imunoterapia padrão. (A) IPI: baixo risco (0-1 fator de risco), curva verde; risco intermediário/baixo (2 fatores de risco), curva amarela; risco intermediário/alto (3 fatores de risco), curva roxa; e risco alto (4-5 fatores de risco), curva vermelha. (B) R-IPI: grupo de risco muito bom (0 fator de risco), curva verde; grupo de risco bom (1-2 fatores de risco), curva azul; e grupo de risco ruim (3-5 fatores de risco), curva vermelha.

IPI: Índice Prognóstico Internacional; prednisona; R-IPI: Índice Prognóstico Internacional revisado.

Fatores de risco do IPI e R-IPI: idade >60 anos; estágio Ann Arbor III/IV; >1 sítio extranodal envolvido; ECOG ≥ 2 ; e DHL sérica elevada.

4.3 Estudo IHQ e HIS para EBV/EBER

O espectro de positividade dos antígenos estudados encontra-se exposto na Figura 15. Todos os casos foram difusamente positivos para CD20,

assim como foram negativos para CD3 e CD5. A marcação com CD21 não evidenciou áreas nodulares definidas por trama de células dendríticas foliculares (CDFs) nos casos incluídos no grupo de estudo. Nenhum caso do grupo de estudo apresentou associação com o vírus Epstein-Barr, todos foram negativos para EBV/LMP1 e EBV/EBER.

Figura 15. Variação da positividade nas células tumorais dos marcadores estudados.

4.3.1 Algoritmos IHQ/Subgrupos IHQ do LDGCB

O total de pacientes classificáveis segundo cada algoritmo estudado, a distribuição dos pacientes e a expectativa de sobrevida de acordo com a classificação IHQ (GCB vs. NGCB) é demonstrado na Tabela 11. A distribuição dos casos de acordo com a classificação dos subgrupos IHQ exibiu proporção semelhante entre os algoritmos de *Hans* e *Choi*, com predomínio de casos classificados como NGCB. A proporção dos casos classificados como NGCB foram significativamente maiores quando utilizados os algoritmos de *Visco-Young* e *Nyman* (GCB vs. NGCB, 20,0% vs. 80,0%, e 17,7% vs. 82,3%, respectivamente). No algoritmo de *Muris*, utilizando ambos clones (124 e E17), a maioria dos casos foi classificado como subgrupo GCB. No entanto, quando o clone E17 foi utilizado para definir a hiperexpressão do BCL2, notou-se maior proporção de casos classificados como NGCB, comparando com o clone 124.

Tabela 11. Distribuição da classificação IHQ do LDGCB segundo diferentes algoritmos estudados e estimativa de sobrevida em pacientes tratados com imunoquimioterapia.

Algoritmo IHQ	Casos classificáveis	GCB (%)	NGCB (%)	Estimativa de sobrevida média GCB vs. NGCB (meses); valor de p
Hans	75	22 (29,3%)	53 (70,7%)	54,8 vs. 50,8; 0.899
Choi	74	22 (29,7%)	52 (70,3%)	57,8 vs. 50,1; 0.541
Visco-Young	75	15 (20,0%)	60 (80,0%)	54,1 vs. 53,2; 0.639
Muris/ clone 124	76	61 (80,3%)	15 (19,7%)	55.3 vs. 48,0; 0.624
Muris/ clone E17	75	51 (68,0%)	24 (32,0%)	55.5 vs. 49.2; 0.931
Nyman	79	14 (17,7%)	65 (82,3%)	55.4 vs. 49.1; 0.522

GCB: subgrupo imuno-histoquímico célula-B centrogerminativa-simile; IHQ: imuno-histoquímica; LDGCB: linfoma difuso de grandes células B; NGCB: subgrupo imuno-histoquímico célula-B não-centrogerminativa-simile.

4.3.1.1 Subgrupos IHQ e valor prognóstico

Nenhum dos algoritmos estudados, tanto os PEG pareados (*Hans*, *Choi* e *Visco-Young*) como os PEG não-pareados (*Muris* e *Nyman*), apresentou poder preditivo de sobrevida no pacientes do grupo de estudo, como pode ser observado nas curvas de Kaplan-Meier em Anexo E.

4.3.1.2 Correlação entre os algoritmos IHQ

Os coeficientes κ entre os diferentes algoritmos estudados estão listados na Figura 16. Os graus de concordância entre os algoritmos PEG pareados são de regular a bom (*Hans* vs. *Choi*, $\kappa=0.511$; *Hans* vs. *Visco-Young*, $\kappa=0.612$; *Choi* vs. *Visco-Young*, $\kappa=0.424$). O nível de concordância entre o algoritmo de *Muris*/clone E17 e *Muris*/clone 124 revelou-se bom ($\kappa=0.732$), como esperado. Contudo, em geral os algoritmos PEG não-pareados apresentaram nível de concordância fraca ou sofrível. O algoritmo de *Hans* exibiu o maior grau de consistência entre os algoritmos estudados.

Kappa	Algoritmos imuno-histoquímicos					
	Hans	Muris/E17	Muris/124	Nyman	Choi	Visco-Young
Hans						
Muris/E17	0.317					
Muris/124	0.196	0.732				
Nyman	0.283	0.189	0.110			
Choi	0.511	0.141	0.073	0.208		
Visco-Young	0.612	0.161	0.084	0.020	0.424	

Kappa	Nenhuma	Fraca	Sofrível	Regular	Boa	Quase perfeita
	≤ 0	0.01–0.20	0.21–0.40	0.41–0.60	0.61–0.80	0.81–1.0

Figura 16. Grau de concordância entre os cinco algoritmos IHQ estudados.

4.3.2 Biomarcadores

4.3.2.1 CD30

Quatro pacientes (4/78, 5,1%) exibiram hiperexpressão do CD30 considerando 80% como valor de *cutoff*. Outros quatro pacientes (4/78, 5,1%) exibiram alguma positividade para CD30 em níveis menores que o valor de *cutoff*, variando entre 10 e 69% das células tumorais positivas. Os demais pacientes (70/78, 89,8%) foram negativos para expressão do CD30 (Figura 17).

Figura 17. Estudo imuno-histoquímico com avaliação da expressão do CD30 em casos de linfoma difuso de grandes células B, SOE *de novo* incluídos no grupo de estudo. (A) CD30 negativo (0-10% das células tumorais); (B) CD30 positivo (90-100% das células tumorais).

A análise univariada não apresentou diferença significativa na SG entre os pacientes com hiperexpressão do CD30 e os outros, porém a análise das curvas de Kaplan-Meier construídas para avaliar a SG destes pacientes revela tendência a melhor prognóstico dos pacientes com hiperexpressão do CD30 (Figura 18).

O teste de associação entre a expressão do CD30 e os modelos de estratificação de risco clínico não evidenciou associação significativa (CD30 e IPI, $\chi^2=10,586$ com $p=0,102$; CD30 e R-IPI, $\chi^2=13,289$ com $p=0,348$).

Figura 18. Curvas de Kaplan-Meier da sobrevida global (SG) de pacientes com LDGCB e tratados com imunoterapia de acordo com a expressão do CD30.

4.3.2.2 BCL2

Utilizando o valor de *cutoff* de 70% das células tumorais positivas para o BCL2, tanto para o clone 124 como para o clone E17, vinte e três casos (23/79, 29,1%) exibiram hiperexpressão do BCL2/clone 124, e trinta e dois casos (32/79, 40,5%) apresentaram hiperexpressão do BCL2/clone E17 (Figura 19).

Todos os casos com hiperexpressão do BCL2 identificados com o BCL2/clone 124 também foram reconhecidos com o BCL2/clone E17. Dentre os nove casos discordantes, que hiperexpressaram o BCL2/clone E17 (positividade $\geq 70\%$ das células tumorais) e não o BCL2/clone 124 (positividade $< 70\%$ das células tumorais), apenas um caso (1/9, 11,1%) foi negativo para BCL2/clone 124. Os demais casos discordantes exibiram expressão do BCL2/clone 124 nas células tumorais em níveis inferiores ao valor de *cutoff*, com variação de positividade entre 10 e 69%.

Figura 19. Estudo imuno-histoquímico com avaliação da expressão do BCL2 em casos de linfoma difuso de grandes células B, SOE *de novo* incluídos no grupo de estudo. (A) BCL2/clone 124 negativo (0-10% das células tumorais); (B) BCL2/clone 124 positivo (70-80% das células tumorais); (C) BCL2/clone E17 negativo (0-10% das células tumorais); (D) BCL2/clone E17 positivo (90-100% das células tumorais).

No entanto, a hiperexpressão do BCL2 isoladamente não mostrou poder prognóstico para SG em análise univariada, como pode ser observado nas curvas de sobrevida construídas com a metodologia de Kaplan-Meier (Anexo F).

O teste de associação entre a expressão do BCL2 e os modelos de estratificação de risco clínico não evidenciou associação significativa (BCL2/clone 124 e IPI, $\chi^2=5,239$ com $p=0,813$; BCL2/clone 124 e R-IPI, $\chi^2=12,740$ com $p=0,807$; BCL2/clone E17 e IPI, $\chi^2=13,611$ com $p=0,106$; BCL2/clone E17 e R-IPI, $\chi^2=17,353$ com $p=0,363$).

4.3.2.3 MYC

Trinta pacientes (30/74, 40,5%) exibiram hiperexpressão do MYC baseado no valor de *cutoff* de 40% de positividade nas células tumorais.

Dezesseis casos (16/74, 21,6%) foram negativos para expressão do MYC nas células tumorais, e vinte e oito pacientes (28/74, 37,9%) exibiram alguma expressão do MYC nas células tumorais variando entre 10 e 39% (Figura 20).

Figura 20. Estudo imuno-histoquímico com avaliação da expressão do MYC em casos de linfoma difuso de grandes células B, SOE *de novo* incluídos no grupo de estudo. (A) MYC negativo (10-20% das células tumorais); (B) MYC negativo (30-40% das células tumorais); (C) MYC positivo (40-50% das células tumorais); (D) MYC positivo (80-90% das células tumorais).

No entanto, a hiperexpressão do MYC isoladamente não revelou poder prognóstico para SG em análise univariada, como pode ser observado nas curvas de sobrevida construídas com a metodologia de Kaplan-Meier (Anexo G).

O teste de associação entre a expressão do MYC e os modelos de estratificação de risco clínico não evidenciou associação significativa (MYC e IPI, $\chi^2=13,508$ com $p=0,141$; MYC e R-IPI, $\chi^2=28,073$ com $p=0,061$).

4.3.2.4 Coexpressão BCL2 e MYC/*Linfoma Duplo-expressor (LDE)*

Baseado nos valores de *cutoff* de 70% para BCL2 e 40% para MYC, e considerando o fenótipo LDE os casos de LDGCB com hiperexpressão concomitante do BCL2 e MYC, onze pacientes (11/74, 14,9%) apresentaram fenótipo LDE quando utilizado o BCL2/clone 124, e doze pacientes (12/74, 16,2%) quando utilizado o BCL2/E17. Todos os casos identificados com o BCL2/clone 124 também foram identificados com o BCL2/clone E17.

As características clínicas e imunofenotípicas dos pacientes com LDGCB exibindo fenótipo LDE, quando utilizado o BCL2/clone 124, estão expostas na Tabela 12. Neste grupo com fenótipo LDE houve predomínio de pacientes do sexo feminino (6 mulheres e 5 homens), idade ≥ 60 anos (7 pacientes com idade ≥ 60 anos, e 4 pacientes com idade < 60 anos), apresentação extranodal (8 extranodal, 3 nodal), IPI-baixo (0-2 fatores de risco, incluindo os riscos baixo e intermediário/baixo do IPI), doença avançada (estágio III ou IV de Ann Arbor) e classificação IHQ de NGCB. Contudo, a comparação destas características entre o grupo de pacientes com fenótipo LDE e o grupo de pacientes negativos para o fenótipo LDE (NLDE), não revelou diferença significativa entre eles. O parâmetro que revelou tendência a associação com o fenótipo LDE foi o subgrupo NGCB quando classificado com o algoritmo de *Choi*. A estimativa de sobrevida média para os pacientes com fenótipo LDE foi de 40,7 meses, e para os pacientes NLDE foi de 56,7 meses ($p=0,041$). O caso identificado como LDE utilizando o BCL2/clone E17, que não foi classificado como tal quando utilizado o BCL/clone 124, é representado por paciente do sexo feminino, com idade ≥ 60 anos, apresentação nodal, grupo de risco intermediário/alto do IPI, grupo de risco ruim do R-IPI, doença avançada segundo estadiamento de Ann

Arbor (estágio III) e classificado como subgrupo NGCB (algoritmos de *Hans*, *Choi* e *Visco-Young*).

Tabela 12. Características clínicas e imunofenotípicas de pacientes com LDGCB tratados com imunoterapia em relação ao fenótipo *linfoma duplo-expressor* (LDE)

	Fenótipo LDE	Fenótipo NLDE	p
Sexo			
Masculino	5	23	0,736
Feminino	6	40	
Idade			
≥60 anos	7	27	0,105
<60 anos	4	36	
Apresentação			
Nodal	3	22	0,915
Extranodal	8	41	
Grupo prognóstico			
Índice Prognóstico Internacional (IPI)			
IPI-baixo (0-2 fatores de risco)	7	41	0,658
IPI-alto (3-5 fatores de risco)	4	22	
Índice Prognóstico Internacional revisado (R-IPI)			
Muito bom (0 fator de risco)	1	10	0,751
Bom (1-2 fatores de risco)	6	31	
Ruim (3-5 fatores de risco)	4	22	
Estadiamento anatômico/Ann Arbor			
I/II	5	25	0,251
III/IV	6	38	
Classificação imuno-histoquímica/Subgrupos imuno-histoquímicos			
Hans			
GCB	4	18	0,678
NGCB	7	42	
Choi			
GCB	1	21	0,057
NGCB	10	38	
Visco-Young			
GCB	3	12	0,596
NGCB	8	48	
Sobrevida global			
Sobrevida média estimada (meses)	40,67	56,68	0,041

GCB: subgrupo imuno-histoquímico célula-B centrogerminativa-simile; LDE: *linfoma Duplo-expressor*; NGCB: subgrupo imuno-histoquímico célula-B não-centrogerminativa-simile; NLDE: *linfoma não-duplo-expressor*.

IPI-baixo: 0-2 fatores de risco, incluindo os grupos de risco baixo e intermediário/baixo do IPI; IPI-alto: 3-5 fatores de risco, incluindo os grupos risco intermediário/alto e alto do IPI.

Fatores de risco do IPI e R-IPI: idade>60 anos; estágio Ann Arbor III/IV; >1 sítio extranodal envolvido; ECOG ≥2; e DHL sérica elevada.

A análise da sobrevida global utilizando as curvas de Kaplan-Meier revelaram valor preditivo para o fenótipo LDE, especialmente quando o

BCL2/clone 124 foi utilizado (Figura 21A). Quando o BCL2/clone E17 foi utilizado, observou-se tendência a pior prognóstico nos casos com fenótipo LDE, porém não significante estatisticamente (Figura 21B).

Figura 21. Curvas de Kaplan-Meier da sobrevida global (SG) de pacientes com LDGCB e tratados com imunoquimioterapia de acordo com o fenótipo LDE. (A) Imunofenótipo LDE definido com BCL2/clon 124; (B) Imunofenótipo LDE definido com BCL2/clon E17. LDE: *linfoma Duplo-expressor*; NLDE: *linfoma não-duplo-expressor*.

Análise adicional para avaliar o impacto prognóstico do fenótipo LDE utilizando BCL2/clon 124 foi realizada para estimar a sua dependência em relação ao IPI. Os pacientes com IPI-baixo (0-2 fatores de risco) que expressaram o fenótipo LDE apresentaram pior prognóstico, com SG

significativamente menor que aqueles com fenótipo NLDE (Figura 22A). Já os casos com IPI-alto (3-5 fatores de risco) que expressaram o fenótipo LDE também apresentaram pior prognóstico, porém sem significância estatística (Figura 22B).

Figura 22. Curvas de Kaplan-Meier da sobrevida global (SG) de pacientes com LDGCB e tratados com imunoquimioterapia de acordo com o fenótipo LDE e IPI. (A) Imunofenótipo LDE definido com BCL2/clone 124 em pacientes com IPI-baixo; (B) Imunofenótipo LDE definido com BCL2/clone 124 em pacientes com IPI-alto.

LDE: *linfoma Duplo-expressor*; NLDE: *linfoma não-duplo-expressor*.

IPI-baixo: 0-2 fatores de risco, incluindo os grupos de risco baixo e intermediário/baixo do IPI; IPI-alto: 3-5 fatores de risco, incluindo os grupos risco intermediário/alto e alto do IPI.

Fatores de risco do IPI e R-IPI: idade >60 anos; estágio Ann Arbor III/IV; >1 sítio extranodal envolvido; ECOG ≥2; e DHL sérica elevada.

A análise conjunta do IPI e do fenótipo LDE com o BCL2/clone 124 permitiu identificar 3 subgrupos prognósticos diferentes, conforme observado na Figura 23: (I) subgrupo com prognóstico bom (estimativa de sobrevida global média de 61,4 meses), caracterizado por IPI-baixo (0-2 fatores de risco) e fenótipo NLDE; (II) subgrupo com prognóstico ruim (estimativa de sobrevida global média de 32,9 meses), caracterizado por IPI-alto (3-5 fatores de risco) e fenótipo LDE; e subgrupo com prognóstico intermediário, caracterizado por IPI-baixo (0-2 fatores de risco) e fenótipo LDE (estimativa de sobrevida global média de 44,8 meses) ou IPI-alto (3-5 fatores de risco) e fenótipo NLDE (estimativa de sobrevida global média de 42,7 meses).

Figura 23. Curvas de Kaplan-Meier da sobrevida global (SG) de pacientes com LDGCB e tratados com imunoquimioterapia de acordo com os subgrupos de risco segundo o fenótipo LDE e IPI. Subgrupo de prognóstico bom, caracterizado por IPI-baixo e fenótipo NLDE com BCL2/clon 124; subgrupo de prognóstico intermediário, caracterizado por IPI-baixo e fenótipo LDE com BCL2/clon 124, ou IPI-alto e fenótipo NLDE com BCL2/clon 124; e subgrupo de prognóstico ruim, caracterizado por IPI-alto e fenótipo LDE com BCL2/clon 124.

LDE: *linfoma Duplo-expressor*; NLDE: *linfoma não-duplo-expressor*.

IPI-baixo: 0-2 fatores de risco, incluindo os grupos de risco baixo e intermediário/baixo do IPI; IPI-alto: 3-5 fatores de risco, incluindo os grupos risco intermediário/alto e alto do IPI.

Fatores de risco do IPI e R-IPI: idade >60 anos; estágio Ann Arbor III/IV; >1 sítio extranodal envolvido; ECOG ≥2; e DHL sérica elevada.

5 DISCUSSÃO

A associação do rituximab à quimioterapia com antracíclicos impactou de forma marcante o tratamento do LDGCB, transformando suas perspectivas.⁸¹⁻⁸⁴ Contudo, ainda há percentual significativo de pacientes que são refratários à terapia de primeira linha e aqueles que recidivam precoce ou tardiamente, os quais representam as vítimas desta doença.^{85,86} Fato corroborado pelos achados deste estudo, que evidenciaram SG-5 de 75,1%, taxa de refratariedade primária de 10,1% e índice de mortalidade de 17,7%, semelhantes aos identificados na literatura. Portanto, a identificação precoce dos pacientes em risco é fundamental para que novos passos rumo a cura do LDGCB sejam dados.

Ambos modelos de estratificação de risco clínico, IPI e R-IPI, foram capazes de reconhecer grupos de risco diferentes entre os pacientes com LDGCB, SOE tratados com imunoquimioterapia na coorte avaliada neste estudo. Estes resultados corroboram as evidências que estes modelos são ferramentas prognósticas robustas na *era R-CHOP*.^{87,88}

Em contraste, os algoritmos IHQ avaliados nesta pesquisa, tanto os PEG pareados (*Hans, Choi e Visco-Young*) como os PEG não-pareados (*Muris e Nyman*), falharam em provar seu valor prognóstico na coorte de pacientes estudada. Estes resultados contribuem para aumentar a controvérsia da utilização destes algoritmos como preditores de SG. Afinal, existem trabalhos que validaram o valor prognóstico destes algoritmos⁸⁹⁻⁹³ e vários outros que exibiram resultados semelhantes ao resultados deste estudo.⁹⁴⁻¹⁰¹ No entanto,

vale ressaltar que atualmente há a percepção que a classificação IHQ não seria ferramenta prognóstica relevante, e sim a classificação molecular em CG e CBA baseado em estudos de PEG, conforme recente publicação de meta-análise.⁴⁰ Parte desta inconsistência da classificação IHQ pode ser explicada pela baixa reprodutibilidade dos resultados, especialmente por questões técnicas^{102,103}, como falta de padronização das reações, utilização de anticorpos diferentes, métodos de amplificação e recuperação antigênica diferentes, como pode ser observado na Tabela 13.

Todavia os estudos que compararam a correlação da classificação IHQ e a classificação molecular, revelaram que geralmente os algoritmos IHQ desenvolvidos pareados com estudos de PEG exibiram correlação significativa com a classificação molecular.^{89,90,94,96} Além disso, os estudos que avaliaram a correlação entre os diferentes algoritmos IHQ ressaltaram que os algoritmos IHQ PEG pareados também apresentaram maior concordância entre si^{97-99,101}, achados semelhantes aos deste estudo.

O conjunto destes dados sugere que apesar do poder prognóstico dos algoritmos IHQ ser questionável, sua utilização na rotina para definir subgrupos fenotípicos diferentes de LDGCB pode ser útil, especialmente os algoritmos PEG pareados, pelo menos enquanto métodos moleculares mais específicos não se tornarem mais acessíveis e disponíveis⁵³⁻⁵⁵. Afinal, no período que se aproxima, a *era da terapia personalizada*, o valor prognóstico destes algoritmos assume relevância secundária à classificação do LDGCB em GCB e NGCB, a qual possivelmente poderá guiar futuras terapias direcionadas para as diferentes vias de oncogênese destes subgrupos.^{46,104}

Tabela 13. Estudos com algoritmos imuno-histoquímicos para classificação do LDGCB (GCB vs. NGCB) com lista de anticorpos/clones e diluição utilizados.

Autores	BCL2 (clone/ diluição)	BCL6 (clone/ diluição)	CD10 (clone/ diluição)	FOXP1 (clone/ diluição)	GCET1 (clone/ diluição)	MUM1 (clone/ diluição)	VALOR PROGNÓSTICO
Hans et al., 2004⁴⁸	124 (1:200)	Policlonal (1:75)	56C6 (1:1)	JC12 (1:80)	NA	MUM1p (1:10)	SIM
Choi et al., 2009⁴⁹	124 (1:20)	Policlonal (1:75) PG-B6p (1:60)	56C6 (Puro)	JC12 (1:80)	RAM341 (Puro)	MUM1p (1:10)	SIM
Visco et al., 2012⁵⁰	NA	LN22 (1:100)	56C6 (1:100)	JC12 (1:16000)	RAM341 (1:4)	MUM1p (1:20)	SIM
Muris et al., 2006⁵¹	124	PG-B6p	56C6	NA	NA	MUM1p	SIM
Nyman et al., 2009⁵²	124 (1:100)	PG-B6p (1:20)	56C6 (1:200)	JC12 (1:80)	NA	MUM1p (1:100)	SIM
Haarer et al., 2006⁹⁰	NA	PG-B6p	SP67	NA	NA	Policlonal MUM1p	SIM
Meyer et al., 2011⁹¹	NA	PG-B6p (PPU)	SP67 (PPU)	JC12 (1:80)	RAM341 (1:1)	MUM1p (1:800)	SIM
Habara et al., 2012⁹²	3.1 (1:400)	Policlonal (1:300)	56C6 (1:100)	JC12 (1:500)	RAM341 (1:100)	MUM1p (1:200)	SIM
Chen et al., 2011⁹³	NA	PG-B6p	56C6	NA	NA	MUM1p	SIM
Culpin et al., 2013⁹⁴	100/D5	LN22	56C6	JC12	RAM341	MUM1p	SIM
Moskowitz et al., 2005⁹⁵	NI	NI	NI	NA	NA	NI	NÃO
Seki et al., 2009⁹⁶	124	P1F6	56C6	NA	NA	MUM1p	NÃO
Gutiérrez-Garcia et al., 2011⁹⁷	124 (1:75)	ST42B (1:25)	56C6 (1:25)	JC12 (1:25)	RAM341 (1:1)	MUM1p (1:400)	NÃO
Hwang et al., 2013⁹⁸	124 (1:100)	GI191/A8 (1:200)	56C6 (1:25)	JC12 (1:500)	RAM341 (1:25)	MUM1p (1:100)	NÃO
Coutinho et al., 2013⁹⁹	124 (1:200)	LN22 (1:500)	56C6 (1:250)	JC12 (1:500)	RAM341 (1:100)	MUM1p (1:400)	NÃO
Hwang et al., 2014¹⁰⁰	124 (1:100)	GI191/A8 (1:200)	56C6 (1:100)	JC12 (1:500)	RAM341 (1:50)	MUM1p (1:100)	NÃO
Hong et al., 2011¹⁰¹	124	PG-B6p	56C6	JC12	RAM341	MUM1p	NÃO
Lu et al., 2015¹⁰²	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NÃO
Estudo atual	124 (1:2000) E17 (1:100)	PIF6 (1:100)	56C6 (1:500)	JC12 (1:500)	RAM341 (1:100)	MUM1p (1:3000)	NÃO

BCL2: B-cell lymphoma 2; BCL6: B-cell lymphoma 6; CD10: Cluster of Differentiation 10; FOXP1: Forkhead box protein P1; GCET1: Germinal center B cell-expressed transcript-1; MUM1: Multiple myeloma oncogene 1; NA: não avaliado; NI: não informado;

Outro achado interessante desta pesquisa foi a identificação de maior proporção de casos classificados como NGCB definidos pelos algoritmos PEG pareados e pelo algoritmo de *Nyman*, semelhante ao observado em países asiáticos.¹⁰⁵ Esta diferença entre as proporções dos subgrupos NGCB e GCB do LDGCB pode ser explicada por fatores étnicos e também pela menor incidência de LF tanto nos países asiáticos como no Brasil quando comparados com outros países ocidentais desenvolvidos, pois parte dos LDGCB subgrupo GCB provavelmente são casos transformados de LF. Pode-se explicar também a maior proporção do subgrupo NGCB em relação ao GCB neste trabalho pelo critério de exclusão de todos os casos com história prévia de LNH indolente e posterior transformação para LDGCB, excluindo desta forma os casos de LF transformados, assim como pela pesquisa ativa da associação do LF com LDGCB. Afinal, a utilização de cortes integrais do TFFP para os estudos IHQ e a utilização do marcador CD21 para identificar áreas nodulares delimitadas por CDFs nos espécimes, permitiram a exclusão mais objetiva dos casos de LDGCB associados ao LF. Outra possível causa para a maior proporção de casos classificados no subgrupo NGCB, seria a maior proporção da apresentação extranodal da doença nos pacientes da coorte estudada, pois existem alguns estudos sugerindo que os casos de LDGCB primários de sítios extranodais apresentariam fenótipo predominantemente NGCB.¹⁰⁶⁻¹⁰⁹ Apesar disso, não é bem estabelecido que a apresentação do LDGCB (nodal vs. extranodal) influenciaria no fenótipo da neoplasia, ou seja, na diferença entre subgrupos GCB e NGCB.^{105,110}

O estudo atual apresentou prevalência de casos de LDGCB CD30+ semelhante a outros estudos realizados previamente. Foram identificados oito

pacientes (8/78, 10,2%) com expressão positiva para CD30 em $\geq 10\%$ das células tumorais, e quatro pacientes (4/78, 5,1%) com expressão acima do valor de *cutoff* ($\geq 80\%$ das células tumorais). Achados esses semelhantes aos resultados do *The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study*, que identificou 14% de positividade do CD30 (positividade $\geq 20\%$ das células tumorais) em casos de LDGCB *de novo*.⁵⁸ Nossos resultados também foram semelhantes aos de um estudo realizado de base populacional que apresentou prevalência de positividade para CD30 em 25% dos casos de LDGCB *de novo*, baseado no valor de *cutoff* $>0\%$, porém apenas 12% exibiram positividade em $\geq 10\%$ das células tumorais e 6% em $\geq 80\%$ das células tumorais.⁵⁹ No entanto, um estudo que avaliou a prevalência da expressão do CD30 em pacientes com LDGCB independente do status do EBV, baseado no valor de *cutoff* de 20%, apresentou 21% de casos de LDGCB CD30 positivos (CD30+), sendo que metade destes pacientes apresentou positividade em $\geq 80\%$ das células tumorais.¹¹¹ A diferença da prevalência do estudo de Campuzano-Zuluaga et al.¹¹¹, com os estudos de Hu et al.⁵⁸, Slack et al.⁵⁹ e o nosso, provavelmente está relacionada a inclusão de casos EBV associados, pois os casos de LDGCB EBV-associados frequentemente são CD30 positivos.^{112,113}

Nosso estudo mostrou tendência a melhor prognóstico dos pacientes com LDGCB, SOE tratados com R-CHOP que exibiram hiperexpressão do CD30 (valor de *cutoff* de 80%), porém estatisticamente não significante. Nosso resultado se assemelha com o de Slack et al.⁵⁹, que em conjunto corroboram os achados de Hu et al.⁵⁸. Contudo, nossos resultados e de Slack et al.⁵⁹, sugerem que o poder prognóstico da expressão do CD30 provavelmente é

sutil, pois não exibe significância estatística quando avaliado em coortes com menos pacientes. O mecanismo que a expressão do CD30 protege os pacientes com LDGCB possivelmente está relacionado a ativação de genes reguladores/inibidores da via do NF- κ B, e inibição de genes relacionados a proliferação celular e via de sinalização do receptor de células-B (BCR), conferindo às células neoplásica sensibilidade à quimioterapia e induzindo a apoptose.⁵⁸ Além disso, aparentemente a expressão de CD30 está relacionada com menor frequência da coexpressão MYC/BCL2 e das alterações do gene MYC (rearranjo ou amplificação).^{58,114}

Finalmente, a expressão do CD30 em casos de LDGCB, SOE possibilita a investigação de novas estratégias terapêuticas, incluindo o uso de Brentuximab-vedotin em combinação com imunoquimioterapia padrão em primeira linha de tratamento ou como alternativa para tratamento de pacientes com doença refratária ou recidivada.¹¹⁵

A expressão do BCL2 identificada com estudo IHQ em casos de LDGCB pode ser explicada apenas parcialmente pela presença do rearranjo ou amplificação do gene BCL2. Afinal, a expressão do BCL2 em casos de LDGCB é bem mais prevalente que a presença da translocação t(14;18) ou amplificação do 18q21.^{116,117} Pode-se utilizar diferentes anticorpos para avaliar a expressão do gene BCL2 através do estudo IHQ, os quais se ligam a diferentes epítomos da proteína BCL2.¹¹⁸ Este estudo avaliou dois anticorpos diferentes para estimar a expressão do BCL2, um anticorpo monoclonal murino padrão, o clone 124, e outro anticorpo alternativo monoclonal de coelho, o clone E17. Os resultados deste trabalho mostraram que o clone E17 é mais sensível que o clone 124 para identificar casos com hiperexpressão do BCL2,

em concordância com estudo anterior que avaliou a sensibilidade da expressão de três anticorpos diferentes (clones 124, E17 e SP66).¹¹⁸ A maior sensibilidade do clone E17 em relação ao clone 124 está em parte justificada pela sua maior capacidade de identificar os casos com hiperexpressão do BCL2 pela amplificação do gene BCL2 (18q21). Assim como pela sua capacidade de identificar os casos negativos para BCL2/clone 124 devido a mutação ou fosforilação do epítipo de ligação do anticorpo com a proteína BCL2, o que induz alteração conformacional na proteína inibindo a ligação do anticorpo.¹¹⁸

Já o impacto prognóstico da hiperexpressão do BCL2 na SG dos pacientes com LDGCB, SOE tratados com imunoquimioterapia padrão é controverso. Existem estudos que confirmam a significância prognóstica da hiperexpressão do BCL2 (valor de *cutoff* de 50%) neste contexto^{64,65,119}, e outros que não confirmam tal relação.^{95,120} Nossos resultados também não foram capazes de mostrar impacto prognóstico da expressão do BCL2 na SG dos pacientes estudados, independente do clone avaliado (124 ou E17), semelhante ao resultado de Kendrick et al.¹¹⁸

Um novo anticorpo monoclonal para o MYC permite a avaliação da expressão proteica do gene utilizando estudo IHQ em TFFP.^{72,73} Estudos prévios que utilizaram o mesmo valor de *cutoff* que o estudo corrente ($\geq 40\%$), exibiram incidência de hiperexpressão do MYC variando entre 13% e 65% dos pacientes com LDGCB^{75,78,121-124}, sendo que o estudo atual revelou incidência compatível com aproximadamente a média deste valores (40,5%). A hiperexpressão do MYC está relacionada com a ativação do gene, porém nem sempre associada com o seu rearranjo, especialmente nos casos de LDGCB

CBA/NGCB. Esta ativação está associada ao aumento ou decréscimo da expressão de genes e proteínas envolvidas na proliferação celular, apoptose, diferenciação celular, resposta imune, microambiente, RNAs não-codificantes e microRNAs.¹²⁵ Contudo, o impacto prognóstico desta hiperexpressão isolada ainda é controverso. O estudo atual e outros^{78,79} que também utilizaram o valor de *cutoff* de 40%, não demonstraram relevância prognóstica da hiperexpressão do MYC em pacientes com LDGCB tratados com imunoquimioterapia padrão. No entanto, existem alguns estudos que também utilizaram o mesmo *cutoff*, demonstrando resultados opostos.¹²¹⁻¹²⁴

Apesar da polêmica em relação ao impacto prognóstico da hiperexpressão do BCL2 e do MYC avaliados isoladamente, há fortes evidências que a coexpressão destas proteínas seja importante fator prognóstico. Além dos dois grupos originais que mostraram este impacto em 2012^{78,79}, vários outros grupos também avaliaram o impacto prognóstico do fenótipo LDE, utilizando diferentes valores de *cutoff*, variando de 0 a 70% para BCL2 e de 40 a 50% para MYC. Os nossos resultados e os destes trabalhos corroboram as evidências que o fenótipo LDE é um importante marcador prognóstico nos casos de LDGCB tratados com esquema R-CHOP^{75,119,121-123,126-129}, e também em casos recidivados tratados com esquema de resgate¹³⁰. A maioria dos estudos avaliaram a expressão do BCL2 utilizando o clone 124, assim como o nosso estudo também utilizou (Tabela 14).

Tabela 14. Estudos com avaliação do fenótipo LDE em pacientes com LDGCB.

Autores	Coorte LDGCB (n)	BCL2 clone (diluição)	MYC clone (diluição)	Frequência LDE	Valor Prognóstico LDE	TMA
Johnson et al., 2012 ⁷⁸	304 ¹	124 (1:10) Cutoff: 50%	Y69 (1:50) Cutoff: 40%	21,0%	Piores SG e SLP	SIM
Green et al., 2012 ⁷⁹	299 ¹	124 (1:10) Cutoff: 70%	Y69 (1:100) Cutoff: 40%	29,8%	Piores SG e SLP	SIM
Valera et al., 2013 ⁷⁵	120	124 (1:10) Cutoff: 50%	Y69 (NI) Cutoff: 10%	26,7%	Piores SG e SLP	SIM
Bellas et al., 2014 ¹¹⁹	100	124 (1:50) ² E17 (1:100) Cutoff: 50%	Y69 (1:50) Cutoff: 50%	21,0%	Pior SG	SIM
Horn et al., 2013 ¹²¹	135	MO887 (1:150) Cutoff: >0%	Y69 (1:50) Cutoff: >40%	NA	Piores SG e SLP ³	SIM
Hu et al., 2013 ¹²²	700 ¹	124 (NI) Cutoff: 70%	Y69 (NI) Cutoff: 40%	33,3%	Piores SG e SLP	SIM
Yan et al., 2014 ¹²³	336	124 (1:200) Cutoff: 70%	Y69 (1:100) Cutoff: 40%	28,3%	Piores SG e SLP	SIM
Perry et al., 2014 ¹²⁶	205 ¹	124 (PPU) Cutoff: >30%	Y69 (1:50) Cutoff: >50%	27,0%	Piores SG e SLP	SIM
Clark Schneider et al., 2015 ¹²⁷	69	124 (NI) SP66 (PPU) Cutoff: >30%, 50% e 70%	Y69 (PPU) Cutoff: 40% e >50%	14,5%	Pior SG ⁴	SIM
Fiskvik et al., 2015 ¹²⁸	49	124 (NI) Cutoff: >1+ ⁵	Y69 (NI) Cutoff: >50%	12,2%	Piores SG e SLP	SIM
Kendrick et al., 2015 ¹²⁹	56	124 (NI) SP66 (NI) Cutoff: 50%	Y69 (NI) Cutoff: 40%	26% (clone 124) 35% (cone SP66)	Piores SDE e SLP ⁴	SIM
Miura et al., 2015 ¹³⁰	38 ⁶	124 (NI) Cutoff: 50%	Y69 (NI) Cutoff: 40%	44,7%	Pior SG, SLP e taxas de resposta terapêutica.	NÃO
ESTUDO ATUAL	74	124 (1:2000) E17 (1:100) Cutoff: 70%	Y69 (1:50) Cutoff: 40%	14,9% (clone 124) 16,2% (cone SP66)	Pior SG ⁷	NÃO

BCL2: B-cell lymphoma 2; LDE: *linfoma duplo expressor*, definido pela coexpressão BCL2 e MYC; LDGCB: *linfoma difuso de grandes células B*; MYC: V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog; NA: não avaliado; NI: não informado; PPU: pronto para uso; SDE: sobrevida doença-específica; SG: sobrevida global; SLP: sobrevida livre de progressão; TMA: *tissue microarray*.

Nosso estudo evidenciou que o fenótipo LDE quando utilizado o BCL2/clone 124 apresenta valor prognóstico independente do IPI, sendo identificados três subgrupos prognósticos diferentes baseados no IPI e fenótipo LDE: (1) grupo de bom prognóstico (estimativa média de sobrevida de 61,4

¹ Número total de pacientes (grupo de estudo e grupo de validação).

² Não foi relatado qual clone foi utilizado para definir o fenótipo LDE.

³ Grupo de risco: hiperexpressão BCL2 e MYC, e BCL6 negativo ($\leq 25\%$).

⁴ O valor prognóstico foi observado tanto com a utilização do clone 124 quanto com o clone SP66.

⁵ O escore de expressão do BCL2 é resultado da estimativa do número de células tumorais positivas e a intensidade de marcação (3 graus): 0 (negativo), 1+ (≤ 100), 2+ (>100 e ≤ 200), e 3+ (>200 e ≤ 300).

⁶ Linfomas B agressivos refratários ou recidivados (27 LDGCB e 11 LF grau3/transformados).

⁷ Valor prognóstico identificado no fenótipo LDE quando clone 124 foi utilizado.

meses), definido por IPI-baixo (0-2 fatores de risco) e negatividade para o fenótipo LDE; (2) grupo de prognóstico intermediário, definido por IPI-baixo (0-2 fatores de risco) e positividade para fenótipo LDE (estimativa média de sobrevida de 44,8 meses), ou IPI-alto (3-5 fatores de risco) e negatividade para fenótipo LDE (estimativa média de sobrevida de 42,7 meses); e subgrupo de prognóstico ruim, caracterizado por IPI-alto (3-5 fatores de risco) e positividade para o fenótipo LDE (estimativa média de sobrevida de 32,9 meses). Hu et al.¹²² identificaram os mesmos subgrupos, evidenciando maior risco para os pacientes com fenótipo LDE e IPI-alto.

Um achado intrigante de nosso estudo foi a perda do valor prognóstico do fenótipo LDE quando utilizado o BCL2/clone E17, apesar da sua maior sensibilidade, e em contraste com resultado anterior de Kendrick et al.¹¹⁸ Esta divergência entre os estudos pode ser justificada tanto pelo menor número de pacientes avaliados no estudo atual, que pode ter limitado seu poder estatístico, assim como pela utilização do valor de *cutoff* diferente daquele utilizado anteriormente. Contudo, esta perda de poder prognóstico do fenótipo LDE com o BCL2/clone E17 pode ser explicada pelos possíveis mecanismos da sua maior sensibilidade em relação ao clone BCL2/clone 124, sendo que este clone identifica mais casos com hiperexpressão do BCL2 devido a mecanismos diferentes da translocação gênica.¹¹⁸ Afinal, há evidências que o poder prognóstico da hiperexpressão do BCL2 está relacionada a presença concomitante da translocação do gene.⁶⁵

Clark Schneider et al. avaliaram a coexpressão do BCL2 e MYC utilizando dois clones diferentes para estimar a expressão do BCL2, o clone 124 e o clone SP66,¹²⁷ que é um anticorpo monoclonal de coelho

aparentemente mais sensível que o clone 124 (padrão) e o E17.¹¹⁸ Além disso, este estudo também avaliou diferentes *cutoffs* para BCL2 e MYC (>30% e >50%; 50% e 40%; e 70% e 40%). Os resultados deste trabalho revelaram que independentemente do clone de BCL2 utilizado, o fenótipo LDE confere pior SG aos pacientes com LDGCB e tratados com R-CHOP, porém apenas quando foram aplicados os valores de *cutoff* de 50% e 40% ou 70% e 40% para BCL2 e MYC, respectivamente. Afinal, a utilização dos valores de *cutoff* de >30% e >50% para BCL2 e MYC falharam em comprovar o valor prognóstico do fenótipo LDE. Nesta coorte, quando aplicados os valores de *cutoff* de 50% para BCL2 e 40% para MYC, apenas um caso foi reclassificado como LDE com a utilização do clone 124. Entretanto, não houve discrepância entre os casos classificados como LDE relacionado ao clone de BCL2 utilizado quando foram utilizados os valores de *cutoff* de 70% e 40% para BCL2 e MYC, respectivamente. Kendrick et al. também avaliaram os clones 124 e SP66, utilizando os valores de *cutoff* de 50% e 40% para BCL2 e MYC, confirmando pior prognóstico do fenótipo LDE independente do clone utilizado para estimar a expressão do BCL2.¹²⁹

Apesar da natureza retrospectiva deste estudo, do limitado número de pacientes na coorte avaliada e ausência da correlação dos achados com estudos moleculares, este estudo é muito importante para validação do uso da IHQ na rotina laboratorial como ferramenta diagnóstica e prognóstica/preditiva nos casos de LDGCB.

Este estudo provavelmente representa o primeiro realizado no Brasil para avaliar estes marcadores prognósticos através de IHQ, utilizando espécimes do diagnóstico original em cortes histológicos integrais de pacientes

com LDGCB,SOE uniformemente tratados com esquema padrão de imunoquimioterapia e também acompanhados protocolarmente em um único centro de referência nacional no tratamento de LNH. Ele identificou subgrupo com prognóstico desfavorável dentre os pacientes com LDGCB,SOE tratados com esquema R-CHOP, utilizando ferramenta clínica de estratificação de risco e estudo IHQ, o qual poderá e deverá ser objeto de novas estratégias terapêuticas futuramente. Além disso, este estudo também revelou a presença de subgrupo de LDGCB CD30+, que exibe tendência a melhor prognóstico e também é provável alvo de nova droga desenvolvida recentemente (Brentuximab-vedotin), especialmente no contexto de doença refratária ou recidivada. Este estudo também demonstrou que apesar da falta de significância prognóstica dos algoritmos IHQ avaliados para classificar os casos de LDGCB em GCB e NGCB, os algoritmos PEG pareados tem maior concordância entre si. O algoritmo de *Hans* mostrou-se o mais consistente entre eles, podendo e devendo ser utilizado como ferramenta de identificação das prováveis vias genéticas envolvidas na oncogênese e de possíveis alvos terapêuticos, pelo menos enquanto métodos moleculares mais específicos não se tornarem mais acessíveis e disponíveis na rotina da avaliação clínica dos pacientes portadores de LDGCB.

6 CONCLUSÕES

6.1 Nenhum dos cinco algoritmos IHQ avaliados (*Hans, Choi, Visco-Young, Muris e Nyman*) mostrou valor prognóstico em coorte de pacientes com LDGCB,SOE *de novo*, tratados uniformemente com imunoquimioterapia e seguidos protocolarmente em centro de referência brasileiro no tratamento de LNH.

6.2 Os algoritmos PEG pareados (*Hans, Choi e Visco-Young*) apresentam concordância regular a boa entre si, porém os PEG não-pareados (*Muris e Nyman*) apresentaram nível de concordância fraca ou sofrível. O algoritmo de *Hans* se mostrou o mais consistente entre os algoritmos avaliados.

6.3 Nenhum dos biomarcadores (BCL2, CD30 e MYC) avaliados isoladamente utilizando estudo IHQ exibiram poder prognóstico. Contudo, a coexpressão do BCL2 e MYC (fenótipo LDE) revelou ser importante marcador prognóstico.

6.4 O subgrupo de pacientes com LDGCB,SOE que exibem fenótipo LDE e apresentam IPI-alto (3-5 fatores de risco) representam aqueles com maior risco de morte, os quais seriam possíveis candidatos a novas estratégias terapêuticas.

7 ANEXOS

Anexo A: Curvas ROC para o BCL2 clone E17 e clone 124

Anexo B: *Curvas ROC para o CD30*

Anexo C: Curva ROC para o MYC

Anexo D: Características clínicas do grupo de pacientes excluídos do estudo.

Pacientes (n=96)	
Idade mediana	59 anos (20-86)
<60 anos	48 (50%)
Sexo (n)	
Masculino	48 (50%)
Feminino	48 (50%)
Apresentação	
Nodal	40 (41,7%)
Extranodal	52 (54,2%)
Não avaliável	4 (4,1%)
Tratamento	
R-CHOP	35 (36,4%)
R-CHOP + RTCE	19 (19,8%)
mini-R-CHOP + RTCE	2 (2,1%)
R-CHOMP	2 (2,1%)
R-CHOMP + RTCE	3 (3,1%)
Quimioterapia sem Rituximabe	12 (12,5%)
Não avaliável	23 (24,0%)
Resposta terapêutica	
Remissão completa (RC)	40 (41,7%)
Remissão parcial (RP)	10 (10,4%)
Sem resposta/Progressão	22 (22,9%)
Não avaliável	24 (25,0%)
Estadiamento anatômico/Ann Arbor	
Estágio I	5 (13,9%)
Estágio II	20 (26,6%)
Estágio III	13 (12,7%)
Estágio IV	42 (46,8%)
Grupos prognósticos	
IPI	
Baixo (0-1 fator de risco)	24 (25,0%)
Intermediário/baixo (2 fatores de risco)	16 (16,7%)
Intermediário/alto (3 fatores de risco)	19 (19,8%)
Alto (4-5 fatores de risco)	17 (17,7%)
Não avaliável	20 (20,8%)
R-IPI	
Muito bom (0 fator de risco)	9 (9,4%)
Bom (1-2 fatores de risco)	31 (32,3%)
Ruim (3-5 fatores de risco)	36 (37,5%)
Não avaliável	20 (20,8%)

Anexo E: Curvas de Kaplan-Meier da SG de pacientes com LDGCB tratados com imunoquimioterapia de acordo com subgrupos IHQ. (A) Algoritmo de *Hans*; (B) algoritmo de *Choi*; (C) algoritmo de *Visco-Young*; (D) algoritmo de *Muris/clone 124*; (E) algoritmo de *Muris/clone E17*; (D) algoritmo de *Nyman*.

Continuação – Anexo E: Curvas de Kaplan-Meier da SG de pacientes com LDGCB tratados com imunoquimioterapia de acordo com subgrupos IHQ. (A) Algoritmo de *Hans*; (B) algoritmo de *Choi*; (C) algoritmo de *Visco-Young*; (D) algoritmo de Muris/clone 124; (E) algoritmo de *Muris/clone E17*; (D) algoritmo de *Nyman*.

Continuação – Anexo E: Curvas de Kaplan-Meier da SG de pacientes com LDGCB tratados com imunoquimioterapia de acordo com subgrupos IHQ. (A) Algoritmo de *Hans*; (B) algoritmo de *Choi*; (C) algoritmo de *Visco-Young*; (D) algoritmo de Muris/clone 124; (E) algoritmo de *Muris/clone E17*; (D) algoritmo de *Nyman*.

Anexo F: Curvas de Kaplan-Meier da SG de pacientes com LDGCB tratados com imunoquimioterapia de acordo com a expressão do BCL2. (A) BCL2/clone 124; (B) BCL2/clone E17.

Anexo G: Curvas de Kaplan-Meier da SG de pacientes com LDGCB tratados com imunoquimioterapia de acordo com a expressão do MYC.

8 REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional do Câncer/INCA. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/linfoma_nao_hodgkin
2. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Campo E, Pileri SA, Swerdlow SH. Introduction and overview of the classification of the lymphoid neoplasms. In Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Eds): WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: IARC, 2008:158–166.
3. Gouveia GR, Siqueira SA, Pereira J. Pathophysiology and molecular aspects of diffuse large B-cell lymphoma. Rev Bras Hematol Hemoter. 2012; 34(6):447-451.
4. Gurbaxani S, Anastasi J, Hyjek E. Diffuse Large B Cell Lymphoma – more than a diffuse collection of large B cells. Arch Pathol Lab Med. 2009; 133(7):1121-1134.
5. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC, Grogan TM, Isaacson PG, Knowles DM, Mason DY, Muller-Hermelink HK, Pileri SA, Piris MA, Ralfkiaer E, Warnke RA. A revised European-American classification of lymphoid

neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. Blood.1994; 84(5):1361-1392.

6. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (Eds). Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press: 2001.

7. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Eds). WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC: Lyon 2008.

8. Menon MP, Pittaluga S, Jaffe ES. The histological and biological spectrum of diffuse large B-cell lymphoma in the World Health Organization classification. Cancer J. 2012; 18(5):411-420.

9. Martelli M, Ferreri AJ, Agostinelli C, Di Rocco A, Pfreundschuh M, Pileri SA. Diffuse large B-cell lymphoma. Crit Rev Oncol Hematol. 2013; 87(2):146-171.

10. Gatter K, Pezzella F. Diffuse large B-cell lymphoma. Diagnostic Histopathology. 2010;16:69-81.

11. Couderc B, Dujols JP, Mokhtari F, Norkowski JL, Slawinski JC, Schlaifer D. The management of adult aggressive non-Hodgkin's lymphomas. Crit Rev Oncol Hematol. 2000; 35(1):33-48.

12. Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, Newman RA, Hanna N, Anderson DR. Depletion of B Cells In Vivo by a Chimeric Mouse Human Monoclonal Antibody to CD20. *Blood*. 1994; 83(2):435-445.
13. Cartron G, Watier H, Golay J, and Philippe Solal-Celigny P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood*. 2004; 104(9):2635-2642.
14. Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, Morel P, Van Den Neste E, Salles G, Gaulard P, Reyes F, Lederlin P, Gisselbrecht C. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002; 346(4):235-242.
15. Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, Solal-Celigny P, Bouabdallah R, Fermé C, Christian B, Lepage E, Tilly H, Morschhauser F, Gaulard P, Salles G, Bosly A, Gisselbrecht C, Reyes F, Coiffier B. 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*. 2005; 23(18):4117-4126.
16. Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, Lepeu G, Plantier I, Castaigne S, Lefort S, Marit G, Macro M, Sebban C, Belhadj K, Bordessoule D, Fermé C, Tilly H. Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the

first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood*. 2010; 116(12):2040-2045.

17. Pfreundschuh M, Trümper L, Osterborg A, Pettengell R, Trneny M, Imrie K, Ma D, Gill D, Walewski J, Zinzani PL, Stahel R, Kvaloy S, Shpilberg O, Jaeger U, Hansen M, Lehtinen T, López-Guillermo A, Corrado C, Scheliga A, Milpied N, Mendila M, Rashford M, Kuhnt E, Loeffler M; MabThera International Trial Group. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol*. 2006; 7(5):379-391.

18. Pfreundschuh M, Kuhnt E, Trümper L, Osterborg A, Trneny M, Shepherd L, Gill DS, Walewski J, Pettengell R, Jaeger U, Zinzani PL, Shpilberg O, Kvaloy S, de Nully Brown P, Stahel R, Milpied N, López-Guillermo A, Poeschel V, Grass S, Loeffler M, Murawski N; MabThera International Trial (MInT) Group. CHOP-like chemotherapy with or without rituximab in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: 6-year results of an open-label randomised study of the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol*. 2011; 12(11):1013-1022.

19. Sehn LH, Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood*. 2015; 125(1):22-32.

20. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res.* 1971; 31(11):1860-1861.
21. Rosenberg SA, Boiron M, DeVita VT Jr, Johnson RE, Lee BJ, Ultmann JE, Viamonte M Jr. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Procedures. *Cancer Res.* 1971; 31(11):1862-1863.
22. Rosenberg SA. Validity of the Ann Arbor staging classification for the non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Treat Rep.* 1977; 61(6):1023-1027.
23. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, Lister TA, Vose J, Grillo-López A, Hagenbeek A, Cabanillas F, Klippensten D, Hiddemann W, Castellino R, Harris NL, Armitage JO, Carter W, Hoppe R, Canellos GP. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *J Clin Oncol.* 1999;17(4):1244-1253.
24. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, Lister TA. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol.* 2014; 32(27):3059-3068.
25. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, Gascoyne RD, Specht L, Horning SJ, Coiffier B, Fisher RI, Hagenbeek A, Zucca E, Rosen ST, Stroobants S,

Lister TA, Hoppe RT, Dreyling M, Tobinai K, Vose JM, Connors JM, Federico M, Diehl V. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol*. 2007; 25(5):579-586.

26. Olszewski AJ, Winer ES, Castillo JJ. Validation of clinical prognostic indices for diffuse large B-cell lymphoma in the National Cancer Data Base. *Cancer Causes Control*. 2015; 26(8):1163-1172.

27. Roschewski M, Dunleavy K, Wilson WH. Moving beyond rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone for diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2014; 55(11):2428-2437.

28. King RL, Bagg A. Genetics of diffuse large B-cell lymphoma: paving a path to personalized medicine. *Cancer J*. 2014; 20(1):43-47.

29. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med* 1993; 329(14):987-994.

30. National cancer institute sponsored study of classifications of non-hodgkin's lymphomas. Summary and description of a working formulation for clinical usage. *Cancer*. 1982; 49(10):2112-2135.

31. Lennert K, Mohri N, Stein H, Kaiserling E. The histopathology of malignant lymphoma. *Br J Haematol* 1975;31(Suppl 1):193-203.

32. Rappaport H. Tumors of the hematopoietic system. Sec. 3, Fasc. 8 of Atlas of tumor pathology. Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology, 1966.
33. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*. 1982; 5(6):649-655.
34. Ziepert M, Hasenclever D, Kuhnt E, Glass B, Schmitz N, Pfreundschuh M, Loeffler M. 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(14):2373-2380.
35. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P, Klasa R, Savage KJ, Shenkier T, Sutherland J, Gascoyne RD, Connors JM. The revised International Prognostic Index (R- IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*. 2007; 109(5):1857-1861.
36. Sehn LH, Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood*. 2015;125(1):22-32.

37. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995;270(5235):467-470.
38. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503-511.
39. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, Gascoyne RD, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Giltner JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Yang L, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Powell J, Duffey PL, Longo DL, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Montserrat E, López-Guillermo A, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Delabie J, Holte H, Krajci P, Stokke T, Staudt LM. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346(25):1937-1947.
40. Read JA, Koff JL, Nastoupil LJ, Williams JN, Cohen JB, Flowers CR. Evaluating cell-of-origin subtype methods for predicting diffuse large B-cell lymphoma survival: a meta-analysis of gene expression profiling and

immunohistochemistry algorithms. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2014;14(6):460-467.

41. Carbone A, Gloghini A, Kwong YL, Younes A. Diffuse large B cell lymphoma: using pathologic and molecular biomarkers to define subgroups for novel therapy. Ann Hematol. 2014;93(8):1263-1277.

42. Lenz G, Staudt LM. Aggressive lymphomas. N Engl J Med. 2010;362(15):1417-1429.

43. Nogai H, Dörken B, Lenz G. Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma. J Clin Oncol. 2011;29(14):1803-1811.

44. Roschewski M, Staudt LM, Wilson WH. Diffuse large B-cell lymphoma-treatment approaches in the molecular era. Nat Rev Clin Oncol. 2014;11(1):12-23.

45. Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, et al. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. J Exp Med. 2001;194:1861-1874.

46. Dunleavy K, Grant C, Wilson WH. Using biologic predictive factors to direct therapy of diffuse large B-cell lymphoma. Ther Adv Hematol. 2013;4(1):43-57.

47. Wilson WH. Treatment strategies for aggressive lymphomas: what works? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:584-590.
48. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Müller-Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES, Pan Z, Farinha P, Smith LM, Falini B, Banham AH, Rosenwald A, Staudt LM, Connors JM, Armitage JO, Chan WC. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004;103(1):275-282.
49. Choi WW, Weisenburger DD, Greiner TC, Piris MA, Banham AH, Delabie J, Braziel RM, Geng H, Iqbal J, Lenz G, Vose JM, Hans CP, Fu K, Smith LM, Li M, Liu Z, Gascoyne RD, Rosenwald A, Ott G, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Jaye DL, Staudt LM, Chan WC. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res*. 2009;15(17):5494-5502.
50. Visco C, Li Y, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Green TM, Li Y, Tzankov A, Wen W, Liu WM, Kahl BS, d'Amore ES, Montes-Moreno S, Dybkær K, Chiu A, Tam W, Orazi A, Zu Y, Bhagat G, Winter JN, Wang HY, O'Neill S, Dunphy CH, Hsi ED, Zhao XF, Go RS, Choi WW, Zhou F, Czader M, Tong J, Zhao X, van Krieken JH, Huang Q, Ai W, Etzell J, Ponzoni M, Ferreri AJ, Piris MA, Møller MB, Bueso-Ramos CE, Medeiros LJ, Wu L, Young KH. Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype

classification in diffuse large B-cell lymphoma: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Leukemia*. 2012;26(9):2103-2113.

51. Muris JJ, Meijer CJ, Vos W, van Krieken JH, Jiwa NM, Ossenkoppele GJ, Oudejans JJ. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J Pathol*. 2006;208(5):714-723.

52. Nyman H, Jerkeman M, Karjalainen-Lindsberg ML, Banham AH, Leppä S. Prognostic impact of activated B-cell focused classification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. *Mod Pathol*. 2009;22(8):1094-1101.

53. Rimsza LM, Wright G, Schwartz M, Chan WC, Jaffe ES, Gascoyne RD, Campo E, Rosenwald A, Ott G, Cook JR, Tubbs RR, Brazier RM, Delabie J, Miller TP, Staudt LM. Accurate classification of diffuse large B-cell lymphoma into germinal center and activated B-cell subtypes using a nuclease protection assay on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Clin Cancer Res*. 2011;17(11):3727-3732.

54. Scott DW, Wright GW, Williams PM, Lih CJ, Walsh W, Jaffe ES, Rosenwald A, Campo E, Chan WC, Connors JM, Smeland EB, Mottok A, Brazier RM, Ott G, Delabie J, Tubbs RR, Cook JR, Weisenburger DD, Greiner TC, Glinnsman-Gibson BJ, Fu K, Staudt LM, Gascoyne RD, Rimsza LM.

Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood*. 2014;123(8):1214-1217.

55. Scott DW, Mottok A, Ennishi D, Wright GW, Farinha P, Ben-Neriah S, Kridel R, Barry GS, Hother C, Abrisqueta P, Boyle M, Meissner B, Telenius A, Savage KJ, Sehn LH, Slack GW, Steidl C, Staudt LM, Connors JM, Rimsza LM, Gascoyne RD. Prognostic Significance of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cell of Origin Determined by Digital Gene Expression in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Biopsies. *J Clin Oncol*. 2015;33(26):2848-2856.

56. Schneider C, Hübinger G. Pleiotropic signal transduction mediated by human CD30: a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family. *Leuk Lymphoma*. 2002;43(7):1355-1366.

57. de Leval L, Gaulard P. CD30+ lymphoproliferative disorders. *Haematologica*. 2010;95(10):1627-1630.

58. Hu S, Xu-Monette ZY, Balasubramanyam A, Manyam GC, Visco C, Tzankov A, Liu WM, Miranda RN, Zhang L, Montes-Moreno S, Dybkær K, Chiu A, Orazi A, Zu Y, Bhagat G, Richards KL, Hsi ED, Choi WW, Han van Krieken J, Huang Q, Huh J, Ai W, Ponzoni M, Ferreri AJ, Zhao X, Winter JN, Zhang M, Li L, Møller MB, Piris MA, Li Y, Go RS, Wu L, Medeiros LJ, Young KH. CD30 expression defines a novel subgroup of diffuse large B-cell

lymphoma with favorable prognosis and distinct gene expression signature: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood*. 2013;121(14):2715-2724.

59. Slack GW, Steidl C, Sehn LH, Gascoyne RD. CD30 expression in de novo diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study from British Columbia. *Br J Haematol*. 2014;167(5):608-617.

60. Sotomayor EM, Young KH, Younes A. Clinical roundtable monograph: CD30 in lymphoma: its role in biology, diagnostic testing, and targeted therapy. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2014;12(4 Suppl 10):1-22.

61. Sehn LH. Paramount prognostic factors that guide therapeutic strategies in diffuse large B-cell lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:402-409.

62. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, Krajewska M, Horsman DE, Tolcher AW, O'Reilly SE, Hoskins P, Coldman AJ, Reed JC, Connors JM. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997;90(1):244-251.

63. Iqbal J, Neppalli VT, Wright G, Dave BJ, Horsman DE, Rosenwald A, Lynch J, Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Campo E, Ott G, Müller-Hermelink HK, Delabie J, Jaffe ES, Grogan TM, Connors JM,

Vose JM, Armitage JO, Staudt LM, Chan WC. BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Oncol*. 2006;24(6):961-968.

64. Iqbal J, Meyer PN, Smith LM, Johnson NA, Vose JM, Greiner TC, Connors JM, Staudt LM, Rimsza L, Jaffe E, Rosenwald A, Ott G, Delabie J, Campo E, Braziel RM, Cook JR, Tubbs RR, Gascoyne RD, Armitage JO, Weisenburger DD, Chan WC. BCL2 predicts survival in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP-like therapy and rituximab. *Clin Cancer Res*. 2011;17(24):7785-7795.

65. Visco C, Tzankov A, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Tai YC, Li Y, Liu WM, d'Amore ES, Li Y, Montes-Moreno S, Dybkær K, Chiu A, Orazi A, Zu Y, Bhagat G, Wang HY, Dunphy CH, His ED, Zhao XF, Choi WW, Zhao X, van Krieken JH, Huang Q, Ai W, O'Neill S, Ponzoni M, Ferreri AJ, Kahl BS, Winter JN, Go RS, Dirnhofer S, Piris MA, Møller MB, Wu L, Medeiros LJ, Young KH. Patients with diffuse large B-cell lymphoma of germinal center origin with BCL2 translocations have poor outcome, irrespective of MYC status: a report from an International DLBCL rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Haematologica*. 2013;98(2):255-263.

66. Sewastianik T, Prochorec-Sobieszek M, Chapuy B, Juszczynski P. MYC deregulation in lymphoid tumors: molecular mechanisms, clinical consequences and therapeutic implications. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1846(2):457-467.

67. Petrich AM, Nabhan C, Smith SM. MYC-associated and double-hit lymphomas: a review of pathobiology, prognosis, and therapeutic approaches. *Cancer*. 2014;120(24):3884-3895.
68. Lin P, Medeiros LJ. The impact of MYC rearrangements and "double hit" abnormalities in diffuse large B-cell lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep*. 2013;8(3):243-52.
69. Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S, Connors JM, Sehn LH, Farinha P, Horsman DE, Gascoyne RD. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood*. 2009;114(17):3533-3537.
70. Zhang HW, Chen ZW, Li SH, Bai W, Cheng NL, Wang JF. Clinical significance and prognosis of MYC translocation in diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol*. 2011;29(4):185-189.
71. Barrans S, Crouch S, Smith A, Turner K, Owen R, Patmore R, Roman E, Jack A. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J Clin Oncol*. 2010;28(20):3360-3365.
72. Tapia G, Lopez R, Muñoz-Mármol AM, Mate JL, Sanz C, Marginet R, Navarro JT, Ribera JM, Ariza A. Immunohistochemical detection of MYC

protein correlates with MYC gene status in aggressive B cell lymphomas. *Histopathology*. 2011;59(4):672-678.

73. Kluk MJ, Chapuy B, Sinha P, Roy A, Dal Cin P, Neuberg DS, Monti S, Pinkus GS, Shipp MA, Rodig SJ. Immunohistochemical detection of MYC-driven diffuse large B-cell lymphomas. *PLoS One*. 2012;7(4):e33813.

74. Gupta M, Maurer MJ, Wellik LE, Law ME, Han JJ, Ozsan N, Micallef IN, Dogan A, Witzig TE. Expression of Myc, but not pSTAT3, is an adverse prognostic factor for diffuse large B-cell lymphoma treated with epratuzumab/R-CHOP. *Blood*. 2012;120(22):4400-4406.

75. Valera A, López-Guillermo A, Cardesa-Salzmann T, Climent F, González-Barca E, Mercadal S, Espinosa I, Novelli S, Briones J, Mate JL, Salamero O, Sancho JM, Arenillas L, Serrano S, Erill N, Martínez D, Castillo P, Rovira J, Martínez A, Campo E, Colomo L. MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica*. 2013;98(10):1554-1562.

76. Aukema SM, Siebert R, Schuuring E, van Imhoff GW, Kluin-Nelemans HC, Boerma EJ, Kluin PM. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood*. 2011;117(8):2319-2331.

77. Li S, Lin P, Young KH, Kanagal-Shamanna R, Yin CC, Medeiros LJ. MYC/BCL2 double-hit high-grade B-cell lymphoma. *Adv Anat Pathol*. 2013;20(5):315-326.
78. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, Scott DW, Tan KL, Steidl C, Sehn LH, Chan WC, Iqbal J, Meyer PN, Lenz G, Wright G, Rimsza LM, Valentino C, Brunhoeber P, Grogan TM, Braziel RM, Cook JR, Tubbs RR, Weisenburger DD, Campo E, Rosenwald A, Ott G, Delabie J, Holcroft C, Jaffe ES, Staudt LM, Gascoyne RD. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*. 2012;30(28):3452-3459.
79. Green TM, Young KH, Visco C, Xu-Monette ZY, Orazi A, Go RS, Nielsen O, Gadeberg OV, Mourits-Andersen T, Frederiksen M, Pedersen LM, Møller MB. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*. 2012;30(28):3460-3467.
80. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977; 33:159-174.
81. Molina A. A decade of rituximab: improving survival outcomes in non-Hodgkin's lymphoma. *Annu Rev Med*. 2008;59:237-250.

82. Flowers CR, Armitage JO. A decade of progress in lymphoma: advances and continuing challenges. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2010;10(6):414-423.
83. Cabanillas F. Front-line management of diffuse large B cell lymphoma. *Curr Opin Oncol.* 2010;22(6):642-645.
84. Kubuschok B, Held G, Pfreundschuh M. Management of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Cancer Treat Res.* 2015;165:271-288.
85. Sarkozy C, Coiffier B. Primary refractory diffuse large B cell lymphoma in the rituximab era. *Curr Opin Oncol.* 2015;27(5):377-383.
86. Van Den Neste E, Schmitz N, Mounier N, Gill D, Linch D, Trneny M, Milpied N, Radford J, Ketterer N, Shpilberg O, Dührsen U, Ma D, Brière J, Thieblemont C, Salles G, Moskowitz CH, Glass B, Gisselbrecht C. Outcome of patients with relapsed diffuse large B-cell lymphoma who fail second-line salvage regimens in the International CORAL study. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51(1):51-57.
87. Öztürk E, Özbalak M, Berk S, Erdoğan I, Avşar E, Dolgun A, Çetiner M, Mandel NM, Yalnız FF, Elverdi T, Salihoğlu A, Eşkazan AE, Ar MC, Öngören Ş, Başlar Z, Aydın Y, Soysal T, Ferhanoğlu B. Comparison of International Prognostic Index and NCCN-IPI in 324 patients with de novo diffuse large B-

cell lymphoma: a multi-center retrospective analysis. *Leuk Lymphoma*. 2015 Oct 12:1-4. [Epub ahead of print]

88. El-Galaly TC, Villa D, Alzahrani M, Hansen JW, Sehn LH, Wilson D, de Nully Brown P, Loft A, Iyer V, Johnsen HE, Savage KJ, Connors JM, Hutchings M. Outcome prediction by extranodal involvement, IPI, R-IPI, and NCCN-IPI in the PET/CT and rituximab era: A Danish-Canadian study of 443 patients with diffuse-large B-cell lymphoma. *Am J Hematol*. 2015;90(11):1041-1046.

89. Haarer CF, Roberts RA, Frutiger YM, Grogan TM, Rimsza LM. Immunohistochemical classification of de novo, transformed, and relapsed diffuse large B-cell lymphoma into germinal center B-cell and nongerminal center B-cell subtypes correlates with gene expression profile and patient survival. *Arch Pathol Lab Med*. 2006;130(12):1819-1824.

90. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, Delabie J, Gascoyne RD, Ott G, Rosenwald A, Braziel RM, Campo E, Vose JM, Lenz G, Staudt LM, Chan WC, Weisenburger DD. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol*. 2011;29(2):200-207.

91. Habara T, Sato Y, Takata K, Iwaki N, Okumura H, Sonobe H, Tanaka T, Orita Y, Abd Al-Kader L, Asano N, Ennishi D, Yoshino T. Germinal center

B-cell-like versus non-germinal center B-cell-like as important prognostic factor for localized nodal DLBCL. *J Clin Exp Hematop*. 2012;52(2):91-99.

92. Chen Z, Du Z, Chen J, Chen Z, Bao Y, Tang F. Prognostic evaluation of immunohistochemical profiles in diffuse large B-cell lymphoma: a Chinese study. *Med Oncol*. 2011;28(1):241-248.

93. Culpin RE, Sieniawski M, Angus B, Menon GK, Proctor SJ, Milne P, McCabe K, Mainou-Fowler T. Prognostic significance of immunohistochemistry-based markers and algorithms in immunochemotherapy-treated diffuse large B cell lymphoma patients. *Histopathology*. 2013;63(6):788-801.

94. Moskowitz CH, Zelenetz AD, Kewalramani T, Hamlin P, Lessac-Chenen S, Houldsworth J, Olshen A, Chaganti R, Nimer S, Teruya-Feldstein J. Cell of origin, germinal center versus nongerminal center, determined by immunohistochemistry on tissue microarray, does not correlate with outcome in patients with relapsed and refractory DLBCL. *Blood*. 2005;106(10):3383-3385.

95. Seki R, Ohshima K, Fujisaki T, Uike N, Kawano F, Gondo H, Makino S, Eto T, Moriuchi Y, Taguchi F, Kamimura T, Tsuda H, Ogawa R, Shimoda K, Yamashita K, Suzuki K, Suzushima H, Tsukazaki K, Higuchi M, Utsunomiya A, Iwahashi M, Imamura Y, Tamura K, Suzumiya J, Yoshida M, Abe Y, Matsumoto T, Okamura T. Prognostic impact of immunohistochemical

biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Cancer Sci.* 2009;100(10):1842-1847.

96. Gutiérrez-García G, Cardesa-Salzmänn T, Climent F, González-Barca E, Mercadal S, Mate JL, Sancho JM, Arenillas L, Serrano S, Escoda L, Martínez S, Valera A, Martínez A, Jares P, Pinyol M, García-Herrera A, Martínez-Trillos A, Giné E, Villamor N, Campo E, Colomo L, López-Guillermo A. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood.* 2011;117(18):4836-4843.

97. Hwang HS, Yoon DH, Suh C, Park CS, Huh J. Prognostic value of immunohistochemical algorithms in gastrointestinal diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Res.* 2013;48(4):266-273.

98. Coutinho R, Clear AJ, Owen A, Wilson A, Matthews J, Lee A, Alvarez R, Gomes da Silva M, Cabeçadas J, Calaminici M, Gribben JG. Poor concordance among nine immunohistochemistry classifiers of cell-of-origin for diffuse large B-cell lymphoma: implications for therapeutic strategies. *Clin Cancer Res.* 2013;19(24):6686-6695.

99. Hwang HS, Park CS, Yoon DH, Suh C, Huh J. High concordance of gene expression profiling-correlated immunohistochemistry algorithms in diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. *Am J Surg Pathol.* 2014;38(8):1046-1057.

100. Hong J, Park S, Park J, Kim HS, Kim KH, Ahn JY, Rim MY, Jung M, Sym SJ, Cho EK, Shin DB, Lee JH. Evaluation of prognostic values of clinical and histopathologic characteristics in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone therapy. *Leuk Lymphoma*. 2011;52(10):1904-1912.
101. Lu TX, Gong QX2, Wang L, Fan L, Zhang XY, Chen YY, Wang Z, Xu W, Zhang ZH, Li JY. Immunohistochemical algorithm alone is not enough for predicting the outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(1):275-286.
102. de Jong D, Rosenwald A, Chhanabhai M, Gaulard P, Klapper W, Lee A, Sander B, Thorns C, Campo E, Molina T, Norton A, Hagenbeek A, Horning S, Lister A, Raemaekers J, Gascoyne RD, Salles G, Weller E. 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*. 2007;25(7):805-812.
103. de Jong D, Xie W, Rosenwald A, Chhanabhai M, Gaulard P, Klapper W, Lee A, Sander B, Thorns C, Campo E, Molina T, Hagenbeek A, Horning S, Lister A, Raemaekers J, Salles G, Gascoyne RD, Weller E. 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 Pathol*. 2009;62(2):128-138.

104. Camicia R, Winkler HC, Hassa PO. Novel drug targets for personalized precision medicine in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma: a comprehensive review. *Mol Cancer*. 2015 Dec 11;14(1):207.

105. Shiozawa E, Yamochi-Onizuka T, Takimoto M, Ota H. The GCB subtype of diffuse large B-cell lymphoma is less frequent in Asian countries. *Leuk Res*. 2007;31(11):1579-1583.

106. Camilleri-Broët S, Crinière E, Broët P, Delwail V, Mokhtari K, Moreau A, Kujas M, Raphaël M, Iraqi W, Sautès-Fridman C, Colombat P, Hoang-Xuan K, Martin A. A uniform activated B-cell-like immunophenotype might explain the poor prognosis of primary central nervous system lymphomas: analysis of 83 cases. *Blood*. 2006;107(1):190-196.

107. Murase T, Yamaguchi M, Suzuki R, Okamoto M, Sato Y, Tamaru J, Kojima M, Miura I, Mori N, Yoshino T, Nakamura S. Intravascular large B-cell lymphoma (IVLBCL): a clinicopathologic study of 96 cases with special reference to the immunophenotypic heterogeneity of CD5. *Blood*. 2007;109(2):478-485.

108. Yoshida S, Nakamura N, Sasaki Y, Yoshida S, Yasuda M, Sagara H, Ohtake T, Takenoshita S, Abe M. Primary breast diffuse large B-cell

lymphoma shows a non-germinal center B-cell phenotype. *Mod Pathol.* 2005;18(3):398-405.

109. Al-Abbadi MA, Hattab EM, Tarawneh MS, Amr SS, Orazi A, Ulbright TM. Primary testicular diffuse large B-cell lymphoma belongs to the nongerminal center B-cell-like subgroup: A study of 18 cases. *Mod Pathol.* 2006;19(12):1521-1527.

110. Kim MK, Bae SH, Bae YK, Kum YS, Ryoo HM, Cho HS, Lee KH, Koh SA, Lee HY, Yun SY, Choi JH, Hyun MS. Biological characterization of nodal versus extranodal presentation of diffuse large B-Cell lymphoma using immunohistochemistry. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2011;11(5):403-408.

111. Campuzano-Zuluaga G, Cioffi-Lavina M, Lossos IS, Chapman-Fredricks JR. Frequency and extent of CD30 expression in diffuse large B-cell lymphoma and its relation to clinical and biologic factors: a retrospective study of 167 cases. *Leuk Lymphoma.* 2013;54(11):2405-2411.

112. Adam P, Bonzheim I, Fend F, Quintanilla-Martínez L. Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphomas of the elderly. *Adv Anat Pathol.* 2011;18(5):349-355.

113. Ok CY, Li L, Xu-Monette ZY, Visco C, Tzankov A, Manyam GC, Montes-Moreno S, Dybkaer K, Chiu A, Orazi A, Zu Y, Bhagat G, Chen J, Richards KL, Hsi ED, Choi WW, van Krieken JH, Huh J, Ai W, Ponzoni M,

Ferreri AJ, Farnen JP, Møller MB, Bueso-Ramos CE, Miranda RN, Winter JN, Piris MA, Medeiros LJ, Young KH. Prevalence and clinical implications of epstein-barr virus infection in de novo diffuse large B-cell lymphoma in Western countries. *Clin Cancer Res.* 2014;20(9):2338-2349.

114. Wang XJ, Seegmiller AC, Reddy NM, Li S. CD30 expression and its correlation with MYC rearrangement in de novo diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol.* 2015 Sep 5. [Epub ahead of print]

115. Jacobsen ED, Sharman JP, Oki Y, Advani RH, Winter JN, Bello CM, Spitzer G, Palanca-Wessels MC, Kennedy DA, Levine P, Yang J, Bartlett NL. Brentuximab vedotin demonstrates objective responses in a phase 2 study of relapsed/refractory DLBCL with variable CD30 expression. *Blood.* 2015;125(9):1394-1402.

116. Monni O, Joensuu H, Franssila K, Klefstrom J, Alitalo K, Knuutila S. BCL2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 1997;90(3):1168-1174.

117. Monni O, Franssila K, Joensuu H, Knuutila S. BCL2 overexpression in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 1999;34(1-2):45-52.

118. Kendrick SL, Redd L, Muranyi A, Henricksen LA, Stanislaw S, Smith LM, Perry AM, Fu K, Weisenburger DD, Rosenwald A, Ott G, Gascoyne RD, Jaffe ES, Campo E, Delabie J, Braziel RM, Cook JR, Tubbs RR, Staudt LM,

Chan WC, Steidl C, Grogan TM, Rimsza LM. BCL2 antibodies targeted at different epitopes detect varying levels of protein expression and correlate with frequent gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Hum Pathol*. 2014;45(10):2144-2153.

119. Bellas C, García D, Vicente Y, Kilany L, Abaira V, Navarro B, Provencio M, Martín P. Immunohistochemical and molecular characteristics with prognostic significance in diffuse large B-cell lymphoma. *PLoS One*. 2014 Jun 2;9(6):e98169.

120. Fu K, Weisenburger DD, Choi WW, Perry KD, Smith LM, Shi X, Hans CP, Greiner TC, Bierman PJ, Bociek RG, Armitage JO, Chan WC, Vose JM. 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*. 2008;26(28):4587-4594.

121. Horn H, Ziepert M, Becher C, Barth TF, Bernd HW, Feller AC, Klapper W, Hummel M, Stein H, Hansmann ML, Schmelter C, Möller P, Cogliatti S, Pfreundschuh M, Schmitz N, Trümper L, Siebert R, Loeffler M, Rosenwald A, Ott G. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2013;121(12):2253-2263.

122. Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Green T, Wu L, Balasubramanyam A, Liu WM, Visco C, Li Y, Miranda RN, Montes-Moreno S, Dybkaer K, Chiu A, Orazi A, Zu Y, Bhagat G, Richards KL, Hsi ED, Choi WW, Zhao X, van

Krieken JH, Huang Q, Huh J, Ai W, Ponzoni M, Ferreri AJ, Zhou F, Slack GW, Gascoyne RD, Tu M, Variakojis D, Chen W, Go RS, Piris MA, Møller MB, Medeiros LJ, Young KH. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood*. 2013;121(20):4021-4031.

123. Yan LX, Liu YH, Luo DL, Zhang F, Cheng Y, Luo XL, Xu J, Cheng J, Zhuang HG. MYC expression in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in Chinese patients with diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. *PLoS One*. 2014 Aug 4;9(8):e104068.

124. Cook JR, Goldman B, Tubbs RR, Rimsza L, Leblanc M, Stiff P, Fisher R. Clinical significance of MYC expression and/or "high-grade" morphology in non-Burkitt, diffuse aggressive B-cell lymphomas: a SWOG S9704 correlative study. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(4):494-501.

125. Xu-Monette ZY, Dabaja BS, Wang X, Tu M, Manyam GC, Tzankov A, Xia Y, Zhang L, Sun R, Visco C, Dybkaer K, Yin L, Chiu A, Orazi A, Zu Y, Bhagat G, Richards KL, Hsi ED, Choi WW, van Krieken JH, Huh J, Ponzoni M, Ferreri AJ, Møller MB, Parsons BM, Zhao X, Winter JN, Piris MA, McDonnell TJ, Miranda RN, Li Y, Medeiros LJ, Young KH. Clinical features, tumor biology, and prognosis associated with MYC rearrangement and Myc

overexpression in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab-CHOP. *Mod Pathol*. 2015;28(12):1555-1573.

126. Perry AM, Alvarado-Bernal Y, Laurini JA, Smith LM, Slack GW, Tan KL, Sehn LH, Fu K, Aoun P, Greiner TC, Chan WC, Bierman PJ, Bociek RG, Armitage JO, Vose JM, Gascoyne RD, Weisenburger DD. MYC and BCL2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *Br J Haematol*. 2014;165(3):382-391.

127. Clark Schneider KM, Banks PM, Collie AM, Lanigan CP, Manilich E, Durkin LM, Hill BT, Hsi ED. Dual expression of MYC and BCL2 proteins predicts worse outcomes in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2015 Dec 23:1-9. [Epub ahead of print]

128. Fiskvik I, Beiske K, Delabie J, Yri O, Spetalen S, Karjalainen-Lindsberg ML, Leppä S, Liestøl K, Smeland EB, Holte H. Combining MYC, BCL2 and TP53 gene and protein expression alterations improves risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(6):1742-1749.

129. Kendrick S, Tus K, Wright G, Jaffe ES, Rosenwald A, Campo E, Chan WC, Connors JM, Braziel RM, Ott G, Delabie J, Cook JR, Weisenburger DD, Greiner TC, Fu K, Staudt LM, Gascoyne RD, Scott DW, Rimsza LM. Diffuse large B-cell lymphoma cell-of-origin classification using the Lymph2Cx assay in the context of BCL2 and MYC expression status. *Leuk Lymphoma*. 2015 Oct 5:1-4. [Epub ahead of print]

130. Miura K, Takahashi H, Nakagawa M, Izu A, Sugitani M, Kurita D, Sakagami M, Ohtake S, Uchino Y, Hojo A, Kodaira H, Yagi M, Kobayashi Y, Iriyama N, Kobayashi S, Kiso S, Hirabayashi Y, Hatta Y, Takei M. Clinical significance of co-expression of MYC and BCL2 protein in aggressive B-cell lymphomas treated with a second line immunochemotherapy. *Leuk Lymphoma*. 2015 Oct 22:1-7. [Epub ahead of print]

APÊNDICE

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 13/07/2011, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0274/11**, intitulado: **"LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B REVISITADO: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DIAGNÓSTICOS E PROGNÓSTICOS EM COORTE DE PACIENTES UNIFORMEMENTE TRATADOS COM R-CHOP"** apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Maria Cláudia Nogueira Zerbini**

Pesquisador (a) Executante: **Henrique Moura**

Co-autores: **Sheila A.C. Siqueira, Juliana Pereira, Iberê Cauduro Soares**

CAPPesq, 22 de Julho de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
 Coordenador
 Comissão de Ética para Análise de
 Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492
 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

THE AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jan 15, 2016

This is a License Agreement between Henrique M de Paula ("You") and The American Association for the Advancement of Science ("The American Association for the Advancement of Science") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by The American Association for the Advancement of Science, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3790040298135
License date	Jan 15, 2016
Licensed content publisher	The American Association for the Advancement of Science
Licensed content publication	Science
Licensed content title	Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray
Licensed content author	Mark Schena,Dari Shalon,Ronald W. Davis,Patrick O. Brown
Licensed content date	Oct 20, 1995
Volume number	270
Issue number	5235
Type of Use	Thesis / Dissertation
Requestor type	Scientist/individual at a research institution
Format	Print and electronic
Portion	Figure
Number of figures/tables	2
Order reference number	None
Title of your thesis / dissertation	Diffuse large B-cell lymphoma, NOS: prognostic significance of immunohistochemical algorithms and biomarkers in newly diagnosed patients treated with rituximab plus a CHOP-like regimen.
Expected completion date	May 2016
Estimated size(pages)	200
Total	0.00 USD

Terms and Conditions

American Association for the Advancement of Science TERMS AND CONDITIONS

Regarding your request, we are pleased to grant you non-exclusive, non-transferable permission, to republish the AAAS material identified above in your work identified above, subject to the terms and conditions herein. We must be

NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jan 15, 2016

This is a License Agreement between Henrique M de Paula ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3790020236094
License date	Jan 15, 2016
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature
Licensed content title	Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling
Licensed content author	Ash A. Alizadeh, Michael B. Eisen, R. Eric Davis, Chi Ma, Izidore S. Lossos et al.
Licensed content date	Feb 3, 2000
Volume number	403
Issue number	6769
Type of Use	reuse in a dissertation / thesis
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	2
Figures	Figure 1: Hierarchical clustering of gene expression data. Figure 4: Relationship of DLBCL subgroups to normal B-lymphocyte differentiation and activation. Figure 5: Clinically distinct DLBCL subgroups defined by gene expression profiling.
Author of this NPG article	no
Your reference number	None
Title of your thesis / dissertation	Diffuse large B-cell lymphoma, NOS: prognostic significance of immunohistochemical algorithms and biomarkers in newly diagnosed patients treated with rituximab plus a CHOP-like regimen.
Expected completion date	May 2016
Estimated size (number of pages)	200
Total	0.00 USD

DID YOU KNOW? A personal subscription to NEJM includes the iPad Edition, 20 FREE Online CME exams & more. [SUBSCRIBE NOW >>>](#)

HOME ARTICLES & MULTIMEDIA ISSUES SPECIALTIES & TOPICS FOR AUTHORS CME

Keyword, Title, Author, or Citation **Advanced Search**

About NEJM Permissions

Submit Your Permission Request Using Rightslink

If you are seeking permission to copy/reproduce/publish content from NEJM and are not the author of that content, you may use the Copyright Clearance Center's Rightslink® service. Simply visit NEJM.org and locate the article from which you seek to reuse content.

Once you have located and accessed the article you are looking for on NEJM.org:

- Click on the Permission link in the article toolbox (if you are looking at the full-text), or click on the Permissions link in the middle of the page (if you are viewing the abstract or first 100 words of the article because you don't have a subscription)
- The RightsLink® window will pop up, with information about content you have selected.
- Follow the prompts to obtain a free price quote OR
- Sign-in to your existing RightsLink® account, or create an account if you do not already have one, and follow the prompts to secure permission.

Confirmation of your permission and a copy of the permission terms and conditions will be sent to you instantly via e-mail for most requests. Some requests may require Publisher review.

If you have questions about using the Rightslink® service, please contact Rightslink® Customer Support at (877) 622-5543 (toll free) or (978) 777-9925, or e-mail customer-care@copyright.com.

For other general questions about NEJM Permissions, e-mail permissions@nejm.org.

Permission for Authors

If you are the author of the article that was published in The New England Journal of Medicine ("NEJM"), please visit the [NEJM Author Center](#).

Reuse of Content within a Thesis or Dissertation

Content (full-text or portions thereof) may be used in print and electronic versions of your dissertation or thesis without formal permission from the Massachusetts Medical Society, Publisher of the New England Journal of Medicine.

The following credit line must be printed along with the copyrighted material:

"Reproduced with permission from (scientific reference citation), Copyright Massachusetts Medical Society.

Third-Party Content

Grants of permissions apply only to copyrighted material that the MMS owns, and not to copyrighted text or illustrations for other sources.

Prohibited Uses

The New England Journal of Medicine (and its logo design) are registered trademarks of the Massachusetts Medical Society. We do not grant permission for our logo, cover or brand identity to be used in materials. Permission will not be granted for photographs depicting identifiable individuals.

Access Provided By:
USP

NEJM Information

[Past and Present](#)
[Editors and Publishers](#)
[Editorial Policies](#)
[Permissions](#)
[Reprints](#)
[Upcoming Medical Conventions](#)
[Privacy Policy](#)
[Cookie Information](#)
[Terms of Use](#)
[Copyright Information](#)
[Frequently Asked Questions](#)
[Help Index](#)
[Contact Us](#)

Content and Features

[Overview](#)
[Mobile](#)
[What's New at NEJM.org?](#)

Subscriptions and Access Options

[Products and Services Overview](#)
[Online Access Levels](#)
[Access from Outside the U.S.](#)

Continuing Medical Education

[Program Overview](#)
[Weekly CME Program](#)
[Review CME Program](#)

Information For

[Advertisers](#)
[Authors](#)
[Institutions](#)
[Media](#)
[Subscribers](#)

About NEJM Group

[NEJM](#)
[NEJM Knowledge+](#)
[NEJM Journal Watch](#)
[NEJM CareerCenter](#)

Sign up for FREE >>
Alerts and Updates

NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jan 15, 2016

This is a License Agreement between Henrique M de Paula ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3790101339834
License date	Jan 15, 2016
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Reviews Clinical Oncology
Licensed content title	Diffuse large B-cell lymphoma[mdash]treatment approaches in the molecular era
Licensed content author	Mark Roschewski, Louis M. Staudt, Wyndham H. Wilson
Licensed content date	Nov 12, 2013
Volume number	11
Issue number	1
Type of Use	reuse in a dissertation / thesis
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	2
High-res required	no
Figures	Figure 2 The key signalling pathways implicated in GCB DLBCL with targeted novel agents in clinical development. Figure 3 The key signalling pathways implicated in ABC DLBCL with targeted novel agents in clinical development.
Author of this NPG article	no
Your reference number	None
Title of your thesis / dissertation	Diffuse large B-cell lymphoma, NOS: prognostic significance of immunohistochemical algorithms and biomarkers in newly diagnosed patients treated with rituximab plus a CHOP-like regimen.
Expected completion date	May 2016
Estimated size (number of pages)	200
Total	0.00 USD

December 11, 2014

TO CONTACT PERSON: Henrique de Paula

FROM: David B. Kaminsky, MD, FIAC, Executive Vice-President

Laure W. Lamp, MD, Education Committee Chairman

Presenting Author: Henrique de Paula

Abstract Confirmation #: 3032

Abstract Publication #: 1385

Title: Diffuse Large B-Cell Lymphoma, NOS: Prognostic Significance of Immunohistochemical Algorithms and Biomarkers in Newly Diagnosed Patients Treated With Rituximab Plus a CHOP-Like Regimen

Platform Presentation – HEMATOPATHOLOGY

SECTION C at 2:45 pm on Monday Afternoon

Congratulations! The above listed abstract has been accepted for presentation at the USCAP 104th Annual Meeting which will be held in Boston, MA, March 21-27, 2015. Your abstract is scheduled for platform presentation as shown above. The Program Book for this meeting will be posted on the USCAP website by early February. Please check the website at that time to confirm the time and room location. The USCAP website address is (www.uscap.org). All presenters are required to pay the General Registration Fee for the meeting. All advanced meeting registration must be done online through the USCAP web site at - www.uscap.org.

Please be aware that only electronic projection will be available for abstract platform presentations. In January you will receive an e-mail from someone at PSAV (the AV Company for this meeting) which will contain instructions on how to submit your presentation electronically. You must do this prior to the meeting and you will have a chance to review it in the Speaker Preview Room at the meeting before your presentation. A professional projectionist will be available for AV assistance.

Paper presentations are ten minutes in duration with five additional minutes for questions. You are expected to adhere to this time limit and presentations which go beyond the allotted time will be ended by the moderator(s).

At the time of presentation, all speakers are expected to disclose to the audience any commercial or financial relationship(s) that may have a direct bearing on the subject of the presentation and which may be perceived as a real, or apparent, conflict of interest for the previous 12 months. This applies to the presenter as well as their spouse or partner. Speakers should also disclose any "off-label" use of investigational products prior to the presentation.

Submission Confirmation

Thank you for your submission

Submitted to Leukemia and Lymphoma

Manuscript ID GLAL-2016-0441

Title Diffuse large B-cell lymphoma, NOS de novo: prognostic significance of immunohistochemical algorithms and biomarkers in patients treated with rituximab and a CHOP-like regimen

Authors DE PAULA, HENRIQUE
Siqueira, Stella
Pereira, Juliana
Lago, Luis
Xavier, Flávia
Costa, Renata
Zerbini, Maria Claudia

Date Submitted 03-May-2016

[Author Dashboard](#)

Title: Diffuse large B-cell lymphoma, NOS *de novo*: prognostic significance of immunohistochemical algorithms and biomarkers in patients treated with rituximab plus a CHOP-like regimen

Shortened running title: IHC algorithms and biomarkers in DLBCL

Henrique Moura de Paula¹, Sheila Aparecida Coelho Siqueira², Juliana Pereira³, Luís Alberto de Pádua Covas Lage³, Flávia Dias Xavier⁴, Renata de Oliveira Costa⁵, Maria Cláudia Nogueira Zerbini⁶

1. Department of Pathology, School of Medicine, Federal University of Goiás, Goiania, Brazil.

2. Division of Anatomic Pathology, Clinics Hospital/School of Medicine, São Paulo University, São Paulo, Brazil.

3. Division of Hematology, School of Medicine, São Paulo University, São Paulo, Brazil.

4. Division of Hematology, School of Medicine, University of Brasília, Brasília, Brazil.

5. Division of Hematology, School of Medicine, UNILUS, Santos, Brazil.

6. Department of Pathology, School of Medicine, São Paulo University, São Paulo, Brazil.

Corresponding author: Henrique Moura de Paula, MD

Department of Pathology, School of Medicine, Federal University of Goiás

235 c/ 1a. s/n, Setor Universitário – Goiânia/GO – Brazil – CEP 74605-020

Tel: +55(62)3269-8242 email: henrique.depaula@capc.com.br

Keywords: Diffuse large B-cell lymphoma, cell-of-origin, MYC, CD30, BCL2, prognosis

Overall word-count of the manuscript:3393

Abstract word count: 150

Number of figures:06

Number of tables: 03

Number of references: 64

Abstract

The immunohistochemistry (IHC) is a tool to recognize the diversity of diffuse large B-cell (DLBCL) and identify the patients at risk when treated with standard regimen. Seventy nine patients with DLBCL,NOS “de novo” treated with R-CHOP-like immunochemotherapy were evaluated. They were assigned as germinal center B-cell like (GCB) or non-GCB subtype according to five different IHC algorithms (Hans, Choi, Visco-Young, Muris, and Nyman). BCL2, CD30 and MYC expression were also assessed. None of the profiles assessed was able to predict overall survival. The concurrent expression of MYC and BCL2, the “Double-expressor lymphoma” phenotype (DELp), exhibited a negative prognostic impact. The positive expression of CD30 showed a trend toward a better outcome. The DELp, rather than the cell-of-origin classification based on IHC, is a better predictor of survival in patients with DLBCL treated with standard therapy. Besides, the CD30 expression may be a useful prognostic marker and a possible therapeutic target.

Introduction

Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified (DLBCL, NOS) is an aggressive neoplasm characterized by morphologic, phenotypic and molecular heterogeneity [1,2]. Although the combination of rituximab and chemotherapy with anthracyclines impacted markedly the treatment of this disease and these patients' perspectives, the current standard treatment does not consider such diversity [3-6]. Besides, there are a significant percentage of patients who are refractory to first-line therapy and those who relapse early or lately, whose represent the victims of this disease [7,8]. Therefore, the early identification of these patients at risk is essential for new steps towards DLBCL cure.

There are strong evidence that molecular studies, especially gene expression profiling studies (GEP), provide important information about prognosis, tumor biology and potential therapeutic targets. Nevertheless, while these platforms are not universally available, nor technically and economically accessible, their use are limited to *research environment* [9]. Consequently, the immunohistochemistry (IHC) has emerged as a methodology applicable to recognize the diversity of DLBCL in routine practice, and possibly be used to identify the patients at risk when treated with standard regimen.

Among the widely published IHC algorithms designed to predict the GEP subtypes of DLBCL, *Hans*, *Choi* and *Visco-Young* algorithms have been correlated with GEP results [10-12], but not *Muris* and *Nyman* algorithms [13,14]. These original studies showed prognostic significance and good

correlation with GEP classification of DLBCL into germinal center B-cell like (GCB) and non-GCB subgroups.

Besides the IHC strategies to define the different subgroups of DLBCL based on the cell-of-origin (COO), there are some prognostic biomarkers that may be assessed by IHC. CD30, BCL2 and MYC are some of these biomarkers that have been studied [15-20].

The aim of the present study was to evaluate the above-mentioned IHC algorithms and biomarkers in a well-characterized cohort of patients with *de novo* DLBCL treated with standard immunochemotherapy, using whole tissue lymphoma sections to estimate their prognostic power and usefulness in daily routine setting.

Materials and methods

Patients and clinical information

Seventy-nine patients with *de novo* DLBCL untreated and diagnosed between August 2008 and August 2011, were retrospectively evaluated. These patients received R-CHOP-like immunochemotherapy with curative intent at Hematology Division of Clinics Hospital/University of São Paulo School of Medicine and Cancer Institute of the State of São Paulo/University of São Paulo School of Medicine. They were at least 17 years old and the exclusion criteria included: patients with a recognized disease phase of follicular lymphoma or another type of indolent lymphoma with subsequent transformation into a DLBCL, immunodeficiency-associated tumors, posttransplant lymphoproliferative disorders, primary cutaneous and

those with intravascular, central nervous system, primary effusion, or primary mediastinum lymphomas; history of other previous chemotherapy, previous or concurrent diagnosis of any other cancer, and incomplete clinical data or insufficient material for the IHC studies. All patients underwent the full spectrum of standard initial evaluation, staging, and response assessment [21]. Clinical history, treatment and survival data were obtained from electronic chart. Ethical approval for this study was obtained from the local ethics committee.

Morphology

For all surgically resected or biopsied original specimens, serial 4 μ m sections were cut from formalin fixed paraffin embedded tissue (FFPET) blocks. The histopathology of each DLBCL was reviewed by three pathologists (H.M.P., M.C.N.Z., S.A.C.S.) with expertise in the field, and reclassified in accordance with the World Health Organization (WHO) criteria for pathologic diagnosis [22].

Immunohistochemistry and *in situ* hybridization for EBV-encoded RNA

Immunohistochemical staining was performed on slides with the whole tissue section using routine staining protocols and used the following antibodies: BCL2 (clone 124, 1:2000 dilution), BCL2 (clone E17, 1:100 dilution), BCL6 (clone PIF6, 1:100 dilution), CD3 (clone F7.2.38, 1:500 dilution), CD5 (clone 4C7, 1:500 dilution), CD10 (clone 56C6, 1:500 dilution), CD20 (clone L26, 1:10000 dilution), CD21 (clone 2G9, 1:5000 dilution), CD30 (clone BER-H2, 1:4000 dilution), Cyclin D1 (clone SP4, 1:500 dilution),

EBV/LMP1 (clone CS.1-4, 1:100 dilution), FOXP1 (JC12 clone, 1:500 dilution), GCET1 (RAM341 clone, 1:100 dilution), Ki67 (clone KiS5, 1:500 dilution), MUM-1 (clone MUM1p, 1:3000 dilution) and MYC (clone Y69, 1:50 dilution). Staining was not always achieved for each marker owing to tissue exhaustion.

The expression for each antigen was estimated visually in 10% increments by two pathologists (H.M.P., M.C.N.Z.) and any discrepancies were reviewed on a multihead microscope to achieve a consensus opinion. The cases were assigned as GCB or non-GCB subgroup according to 5 IHC algorithms (Figure 1), including 3 GEP-based algorithms proposed by *Hans et al.* (Figure 1A), *Choi et al.* (Figure 1B), and *Visco-Young et al.* (Figure 1C), and 2 non-GEP based algorithms proposed by *Muris et al.* (Figure 1D), and *Nyman et al.* (Figure 1E). Two BCL2 different clones were applied for the *Muris algorithm*, clone 124 and clone E17.

Chromogenic in situ hybridization (CISH) staining for EBV encoded RNA (EBER) transcripts were performed on standard 4- μ m deparaffinized tissue sections. Manufacturer's instructions were followed carefully. Cells exhibiting nuclear staining were considered positive. Positive and negative controls were included in each run.

Statistical analysis

Categorical variables were analyzed using the Person χ^2 test. Two-tailed p values of less than 0.05 were considered statistically significant. The confidence intervals were constructed with a confidence coefficient of 95%.

Overall survival (OS) time was measured from the time of initial diagnosis until death with disease or until the end of follow-up. Patients who died of causes unrelated to the disease were censored at the time of death. Survival curves were constructed using the Kaplan–Meier method, and differences between curves were analyzed using the Breslow test.

To determine the concordance rates between the different IHC algorithms described above, the κ statistics were applied, which is considered a robust measure as it takes into account the agreement occurring by chance. Landis and Koch [23] have proposed the following as standards for strength of agreement for the kappa coefficient: poor ($\kappa \leq 0$), slight ($\kappa = 0.01–0.20$), fair ($\kappa = 0.21–0.40$), moderate ($\kappa = 0.41–0.60$), substantial ($\kappa = 0.61–0.80$), and almost perfect ($\kappa = 0.81–1.0$).

The ROC curves allowed visualizing the specificity and sensitivity of BCL2/124 clone, BCL2/E17 clone, CD30 and MYC expression to predict OS. The optimal cutoff points from each marker were identified from the ROC curves by calculating the Youden index. The Youden index pointed to optimal cutoff scores of 70% for BCL2/clone 124, 70% for BCL2/clone E17, 80% for CD30 and 40% for MYC.

Results

Patient characteristics and outcome

The main clinical characteristics of the 79 patients are summarized in Table I. The follow-up duration ranged from 2.1 to 65.1 months, with a median follow-up of 41.1 months. During the follow up, 9 patients (11.4%) progressed and 14 patients (17.7%) died from the disease. The 5-year overall survival

(OS 5years) rate was 75.1%, with a mean estimated overall survival of 38.1 months. When univariate survival analyses for OS were performed, IPI score and R-IPI score proved to be significant predictive factors for survival (Figure 2).

IHC algorithms and outcome

The total numbers of patients classifiable by each algorithm studied and the distribution of the patients according to the differentiation phenotype (GCB vs non-GCB) are shown in Table II. The distribution of the cases according to the phenotype was similar for the *Hans* and *Choi* algorithms, with higher proportion of non-GCB DLBCL. In the *Visco-Young* and *Nyman* algorithms, the proportion of non-GCB cases assigned was significantly higher (non-GCB vs GCB, 80.0% vs 20.0%, and 82,3% vs. 17.7%, respectively). In the *Muris* algorithm using both clones, 124 and E17, the majority of the cases were allocated as the GCB phenotype, with lower proportion of non-GCB DLBCL when the clone 124 was used to stratify the patients. None of the profiles assessed by IHC was able to predict OS, as shown in Table II. The κ coefficients among the 5 algorithms are listed in Figure 3. The strength of agreement among the GEP based algorithms was moderate to substantial (*Hans* vs. *Choi*, $\kappa=0.511$; *Hans* vs. *Visco-Young*, $\kappa=0.612$; *Choi* vs. *Visco-Young*, $\kappa=0.424$), and the *Hans* algorithm exhibited the highest degree of consistency with others. The agreement of *Muris/clone E17* vs. *Muris/clone 124* was substantial ($\kappa=0.732$) as expected, but in general the non-GEP algorithms showed slight concordance.

IHC biomarkers, *In situ* hybridization for EBV-encoded RNA and outcome

All cases were diffusely positive for CD20, as they were diffusely negative for CD3, CD5 and EBV/LMP1. The CD21 stain did not demonstrate nodular areas defined by meshwork of follicular dendritic cells (FDCs) in the specimens evaluated. All cases were also diffusely negative for CISH/EBER.

Using the cutoff values of 70%, 80% and 40% positive tumor cells for BCL2 (clones 124 and E17), CD30 and MYC, respectively, twenty three cases (23/79, 29.1%) were positive for BCL2/clone 124, thirty two cases (32/79, 40.5%) were positive for BCL2/clone E17, four cases (4/79, 5.1%) were positive for CD30, and thirty cases (30/74, 40.5%) were positive for MYC. Almost all cases evaluated in this study showed no expression of CD30, there were only 8 cases (8/78, 10.2%) that showed any expression of CD30 (positive staining in $\geq 10\%$ of tumor cells). The univariate analysis revealed that neither the positive expression of BCL2 (clones 124 and E17), nor the positive expression of MYC were significantly associated with survival (Figure 4A, 4B, 4D). The positivity above the cutoff value for CD30 showed a trend toward a better outcome, but it was not statistically significant (Figure 4C).

Nonetheless, a “Double-expressor lymphoma” phenotype (DELp), represented by the concurrent expression of MYC and BCL2, exhibited a negative prognostic impact on OS when the BCL2/clone 124 was used (Figure 5A). The main characteristics of the patients with DELp are summarized in Table III. Additional analysis was done whether the DELp/clone 124 was IPI dependent. The patients with low-IPI (0-2 risk factors) that expressed the DELp/clone 124 presented a significant worse OS

compared with the ones who did not (Figure 5B). The cases with high-IPI (3-5 risk factors) that expressed the DELp/clone 124 also presented worse OS, but not statistically significant (Figure 5C). It was possible to visualize 3 different prognostic subgroups of DLBCL based on IPI and DELp/clone 124 (Figure 5D). There is a subgroup with good prognosis (mean estimated overall survival of 61.4 months), characterized by low-IPI (0-2 risk factors) and negative-DELp; a subgroup with poor prognosis (mean estimated overall survival of 32.9 months), characterized by high-IPI (3-5 risk factors) and positive-DELp; and a subgroup of intermediate prognosis characterized by low-IPI (0-2 risk factors) and positive-DELp (mean estimated overall survival of 44.8 months) or high-IPI (3-5 risk factors) and negative-DELp (mean estimated overall survival of 42.7 months). When the BCL2/clone E17 was used, the prognostic power of the DELp failed to predict OS (Figure 6A, 6B, 6C, 6D).

Discussion

The IPI is a powerful prognostic tool developed more than 20 years ago based on clinical and laboratory features of patients with aggressive lymphomas. It has since served as the basis for determining prognosis among patients with DLBCL, even during the “*R-CHOP era*” [26], corroborated by the findings from this study. Nonetheless, as biological characteristics from the neoplasm are not evaluated, it does not identify patients that would benefit from novel therapies [27].

In contrast, the different IHC algorithms designed to identify the DLBCL molecular subtypes failed to prove their prognostic significance [28]. Our

results support the lack of prognostic strength from 3 different GEP based IHC algorithms (*Hans, Choi and Visco-Young*) and 2 non-GEP based algorithms (*Muris and Nyman*). Although, it is important to state that the GEP-based algorithms showed moderate to substantial agreement, and the non-GEP based algorithms showed lower concordance, similar to previous reports [29,30]. These data suggest that the 3 GEP based algorithms would reliably be used as DLBCL classifiers in routine practice, at least until gene expression based tests for cell-of-origin (COO) assignment in FFPET become accessible [31-33]. In the era of personalized therapy, the prognostic value of IHC algorithms in R-CHOP may be secondary to classification of DLBCL into GCB or non-GCB, which would guide the choice of targeted therapy [34].

An interesting finding from this study was the higher prevalence of non-GCB DLBCL defined by *Nyman* and GEP-based algorithms, similar to previous reports from Asian countries and different from other Western countries [35]. It is possible that the difference in these populations is based on ethnic factors and lower incidence of follicular lymphomas (FL). Some other possible explanations for the lower incidence of GCB DLBCL in this study are the exclusion of every patient with history of indolent non-Hodgkin's lymphoma from the study group and the use of whole tissue lymphoma sections and not tissue microarrays (TMA) for the IHC studies. After all, an active seek of FL association was done by the use of CD21 stain to highlight the FDCs in the specimens. Every GCB DLBCL case from the original cohort (n=172, data not showed) that presented any nodular area delimited by FDCs meshwork was reclassified as DLBCL with FL and excluded from the study group (n=12, data not showed). Another conceivable reason for this difference

is the high proportion of cases with extranodal presentation (n=52, 65%). Several studies have examined phenotypes in primary extranodal DLBCL, and most of them have the non-GCB phenotype [36-39]. Although, there are some evidence that the site of DLBCL presentation might not influence the difference in GCB and non-GCB phenotypes between patients with nodal and extranodal DLBCL [35, 40]. It was also identified a major discordance between the *Muris* algorithm and the others evaluated, with a higher proportion of cases classified as GCB subtype, in agreement with previous reports [41-44]. It happens because the *Muris* algorithm is too selective and specific for non-GCB subtype, thus mislabeling a large number of non-GCB cases as GCB subtype.

None of the prognostic biomarkers tested by IHC in this study proved to be statistically relevant when evaluated individually. The expression of CD30 in $\geq 10\%$ of tumor cells was identified in 10.2% of all cases (n=8), and only 5.1% of them (n=4) presented an expression above the cutoff threshold (80%). Our findings are consistent with those of the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study, which found that 14% of *de novo* DLBCL cases exhibited CD30 expression in 20% or more tumour cells [15]; and to other previous report that evaluated the CD30 expression and its clinicopathological significance in *de novo* DLBCL, in a population-based cohort of patients from British Columbia, which showed CD30 expression in 25% of evaluated cases, but only 12% of these cases showed CD30 expression in $\geq 10\%$ of tumor cells, and 6% in $\geq 80\%$ of tumor cells [45]. The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study used a 20% cutoff threshold to define CD30+ DLBCL, and this study demonstrated

that these patients had superior OS in a cohort of 903 patients with de novo DLBCL treated with R-CHOP [15]. The present study used the 80% cut-off threshold defined by ROC curve for calling CD30 positivity, and its results showed a trend towards better OS but not statistically significant. A similar result to the population-based study recently published that evaluated 385 cases and used either the 20% cut-off threshold or the >0% cut-off threshold for calling CD30 positivity, which also revealed a trend towards better OS but not statistically significant [45]. These data suggest that the overall impact of CD30 expression on survival may be subtle and our study may be underpowered to detect this effect. Finally, the presence of CD30 expression in a limited proportion of patients with DLBCL warrants investigation of novel therapeutic strategies, including the use of brentuximab vedotin in combination with traditional frontline therapies or as an alternative therapy in relapsed or refractory setting [46].

The BCL2 expression seems only partially related to BCL2 gene rearrangements or amplification, as BCL2 is expressed in a greater number of DLBCL cases than in those carrying t(14;18) or amplification of 18q21 [47,48]. There are several antibodies that target at different epitopes from BCL2 protein that may be used to assess its expression [49]. In our study, two different antibodies were used, the standard mouse monoclonal BCL2/clone 124 and an alternative rabbit monoclonal BCL2/clone E17. The BCL2/clone E17 proved to be more sensitive in detecting the BCL2 overexpression compared with the standard monoclonal mouse BCL2/clone 124, in agreement with previous report [49]. The divergent sensitivity from these antibodies would be justified by the phosphorylation of BCL2 at sites within

the flexible loop domain (FLD), including the epitope region (amino acids 41-54) of BCL2/clone 124, which induce conformational changes in protein structure that may inhibit antibody binding. In addition, the higher capability of BCL2/clone E17 to identify BCL2 overexpression due to BCL2 gene (18q21) amplification would be another cause for this difference [49].

The prognostic significance of BCL2 expression is controversial in patients treated with R-CHOP, with some studies that did not correlate BCL2 expression and outcome [50,51], and others recently published which showed that overexpression of BCL2 (cutoff threshold $\geq 50\%$) had prognostic effect within the GCB DLBCL subtype [16,17,52]. The findings from current study could not show the adverse impact from BCL2 expression, neither with BCL2/clone 124 nor with BCL2/clone E17. The number of patients evaluated and the cutoff point ($\geq 70\%$) might explain these divergent results.

A new monoclonal antibody to MYC has allowed the evaluation of MYC protein expression by IHC in routine FFPET [18, 53]. The current study used a 40% cutoff threshold and showed 30 cases (40%) that overexpressed MYC protein. Previous reports that evaluated the same cutoff point showed an overexpression incidence that ranged from 13% to 64% [52, 54-59]. Our study could not demonstrate prognostic significance of MYC overexpression, what nourishes the controversy of its use as a single predictive biomarker. After all, there are studies that used the same cutoff threshold (40%) that presented similar results to ours [54,60], but there are others that had opposite results and support the MYC overexpression prognostic power [56-59].

However, there is strong evidence that the DELp represent a predictive biomarker for patients with DLBCL treated with standard

immunochemotherapy, supported by our results. There are studies previously published that used the same thresholds that were used in ours, which presented similar findings [57,58,60,61]. Furthermore, there are other studies that used different thresholds for MYC and/or BCL2 and retained its prognostic relevance [52,54,55,56,62-64]. The BCL2/clone 124 was used to identify the cases of DLBCL with DELp in the majority of studies [52,54,55,57,58,60-64]. Our study evidenced the prognostic power of the DELp when the BCL2/clone 124 was used, independently from the IPI score. We identified three different prognostic subgroups based on the DELp and IPI score: a good prognostic subgroup (mean estimated overall survival of 61.4 months), defined by low-IPI (0-2 risk factors) and negative-DELp; an intermediate prognostic subgroup, defined by low-IPI (0-2 risk factors) and positive-DELp (mean estimated overall survival of 44.8 months) or high-IPI (3-5 risk factors) and negative-DELp (mean estimated overall survival of 42.7 months); and a poor prognostic subgroup, defined by high-IPI (3-5 risk factors) and positive-DELp (mean estimated overall survival of 32.9 months). These data was similar to the previously reported by Hu et al [58].

An intriguing finding from this study, in spite of the higher sensitivity from the BCL2/clone E17, is the loss of statistical relevance of the DELp when this antibody was used to define the BCL2 protein overexpression, in contrast to previous report [49]. This divergence between our study and *Kendrick et al.* would be explained by the lower number of patients evaluated in the present study that limits its statistical power, besides the different cutoff thresholds. Although, a possible reason for the lower significance of BCL2/clone E17 compared with the BCL2/clone 124 would be that the higher sensitivity of the

BCL2/clone E17 is partially owing to its higher capability of identifying the BCL2 protein overexpression secondary to other BCL2 gene deregulation mechanisms than translocation [49]. After all, there is data suggesting that the prognostic significance of BCL2 overexpression is related to the concomitant BCL2 gene translocations [17].

Despite the retrospective nature from this study, the limited number of patients and the absence of GEP correlation, this study showed relevant results evaluating patients uniformly treated and followed in a brazilian reference center for non-Hodgkin lymphoma treatment, using whole tissue sections from routine diagnostic specimens.

In conclusion, we demonstrated that patients with DLBCL,NOS “de novo” who expressed the DELp and presented high IPI score (3-5 risk factors) had particularly poor prognoses when treated with standard immunochemotherapy. Besides, the CD30 expression may be a useful prognostic marker and a possible therapeutic target.

Disclosure/ Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interests.

References

- [1] Martelli M, Ferreri AJ, Agostinelli C, Di Rocco A, Pfreundschuh M, Pileri SA. Diffuse large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013; 87(2):146-171.
- [2] Gatter K, Pezzella F. Diffuse large B-cell lymphoma. *Diagnostic Histopathology*. 2010;16:69-81.

- [3] Molina A. A decade of rituximab: improving survival outcomes in non-Hodgkin's lymphoma. *Annu Rev Med*. 2008;59:237-250.
- [4] Flowers CR, Armitage JO. A decade of progress in lymphoma: advances and continuing challenges. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2010;10(6):414-423.
- [5] Cabanillas F. Front-line management of diffuse large B cell lymphoma. *Curr Opin Oncol*. 2010;22(6):642-645.
- [6] Kubuschok B, Held G, Pfreundschuh M. Management of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Cancer Treat Res*. 2015;165:271-288.
- [7] Sarkozy C, Coiffier B. Primary refractory diffuse large B cell lymphoma in the rituximab era. *Curr Opin Oncol*. 2015;27(5):377-383.
- [8] Van Den Neste E, Schmitz N, Mounier N, Gill D, Linch D, Trneny M, Milpied N, Radford J, Ketterer N, Shpilberg O, Dührsen U, Ma D, Brière J, Thieblemont C, Salles G, Moskowitz CH, Glass B, Gisselbrecht C. Outcome of patients with relapsed diffuse large B-cell lymphoma who fail second-line salvage regimens in the International CORAL study. *Bone Marrow Transplant*. 2016;51(1):51-57.
- [9] Scott DW. Cell-of-origin in diffuse large b-cell lymphoma: are the assays ready for the clinic? *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2015:e458-66.
- [10] Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004;103(1):275-282.

- [11] Choi WW, Weisenburger DD, Greiner TC, Piris MA, Banham AH, Delabie J, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res.* 2009;15(17):5494-5502.
- [12] Visco C, Li Y, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Green TM, Li Y, et al. Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Leukemia.* 2012;26(9):2103-2113.
- [13] Muris JJ, Meijer CJ, Vos W, van Krieken JH, Jiwa NM, Ossenkoppele GJ, et al. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J Pathol.* 2006;208(5):714-723.
- [14] Nyman H, Jerkeman M, Karjalainen-Lindsberg ML, Banham AH, Leppä S. Prognostic impact of activated B-cell focused classification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. *Mod Pathol.* 2009;22(8):1094-1101.
- [15] Hu S, Xu-Monette ZY, Balasubramanyam A, Manyam GC, Visco C, Tzankov A, et al. CD30 expression defines a novel subgroup of diffuse large B-cell lymphoma with favorable prognosis and distinct gene expression signature: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood.* 2013;121(14):2715-2724.
- [16] Iqbal J, Meyer PN, Smith LM, Johnson NA, Vose JM, Greiner TC, et al. BCL2 predicts survival in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell

lymphoma treated with CHOP-like therapy and rituximab. *Clin Cancer Res.* 2011;17(24):7785-7795.

[17] Visco C, Tzankov A, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Tai YC, Li Y, et al. Patients with diffuse large B-cell lymphoma of germinal center origin with BCL2 translocations have poor outcome, irrespective of MYC status: a report from an International DLBCL rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Haematologica.* 2013;98(2):255-263.

[18] Kluk MJ, Chapuy B, Sinha P, Roy A, Dal Cin P, Neuberg DS, et al. Immunohistochemical detection of MYC-driven diffuse large B-cell lymphomas. *PLoS One.* 2012;7(4):e33813.

[19] Gupta M, Maurer MJ, Wellik LE, Law ME, Han JJ, Ozsan N, et al. Expression of Myc, but not pSTAT3, is an adverse prognostic factor for diffuse large B-cell lymphoma treated with epratuzumab/R-CHOP. *Blood.* 2012;120(22):4400-4406.

[20] Valera A, López-Guillermo A, Cardesa-Salzmänn T, Climent F, González-Barca E, Mercadal S, et al. MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica.* 2013;98(10):1554-1562.

[21] Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol.* 2014; 32(27):3059-3068.

[22] Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. (Eds): WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC:Lyon 2008.

- [23] Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977; 33:159-174.
- [24] A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med* 1993; 329(14):987-994.
- [25] Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P, et al. The revised International Prognostic Index (R- IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*. 2007; 109(5):1857-1861.
- [26] Ziepert M, Hasenclever D, Kuhnt E, Glass B, Schmitz N, Pfreundschuh M, et al. 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(14):2373-2380.
- [27] Wilson WH. Treatment strategies for aggressive lymphomas: what works? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:584-590.
- [28] Read JA, Koff JL, Nastoupil LJ, Williams JN, Cohen JB, Flowers CR. Evaluating cell-of-origin subtype methods for predicting diffuse large B-cell lymphoma survival: a meta-analysis of gene expression profiling and immunohistochemistry algorithms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2014;14(6):460-467.
- [29] Coutinho R, Clear AJ, Owen A, Wilson A, Matthews J, Lee A, et al. Poor concordance among nine immunohistochemistry classifiers of cell-of-origin for diffuse large B-cell lymphoma: implications for therapeutic strategies. *Clin Cancer Res*. 2013;19(24):6686-6695.

- [30] Hwang HS, Park CS, Yoon DH, Suh C, Huh J. High concordance of gene expression profiling-correlated immunohistochemistry algorithms in diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(8):1046-1057.
- [31] Rimsza LM, Wright G, Schwartz M, Chan WC, Jaffe ES, Gascoyne RD, et al. Accurate classification of diffuse large B-cell lymphoma into germinal center and activated B-cell subtypes using a nuclease protection assay on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Clin Cancer Res*. 2011;17(11):3727-3732.
- [32] Scott DW, Wright GW, Williams PM, Lih CJ, Walsh W, Jaffe ES, et al. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood*. 2014;123(8):1214-1217.
- [33] Scott DW, Mottok A, Ennishi D, Wright GW, Farinha P, Ben-Neriah S, et al. Prognostic Significance of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cell of Origin Determined by Digital Gene Expression in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Biopsies. *J Clin Oncol*. 2015;33(26):2848-2856.
- [34] Dunleavy K, Grant C, Wilson WH. Using biologic predictive factors to direct therapy of diffuse large B-cell lymphoma. *Ther Adv Hematol*. 2013;4(1):43-57.
- [35] Shiozawa E, Yamochi-Onizuka T, Takimoto M, Ota H. The GCB subtype of diffuse large B-cell lymphoma is less frequent in Asian countries. *Leuk Res*. 2007;31(11):1579-1583.
- [36] Camilleri-Broët S, Crinière E, Broët P, Delwail V, Mokhtari K, Moreau A, et al. A uniform activated B-cell-like immunophenotype might explain the poor

prognosis of primary central nervous system lymphomas: analysis of 83 cases. *Blood*. 2006;107(1):190-196.

[37] Murase T, Yamaguchi M, Suzuki R, Okamoto M, Sato Y, Tamaru J, et al. Intravascular large B-cell lymphoma (IVLBCL): a clinicopathologic study of 96 cases with special reference to the immunophenotypic heterogeneity of CD5. *Blood*. 2007;109(2):478-485.

[38] Yoshida S, Nakamura N, Sasaki Y, Yoshida S, Yasuda M, Sagara H, et al. Primary breast diffuse large B-cell lymphoma shows a non-germinal center B-cell phenotype. *Mod Pathol*. 2005;18(3):398-405.

[39] Al-Abbadi MA, Hattab EM, Tarawneh MS, Amr SS, Orazi A, Ulbright TM. Primary testicular diffuse large B-cell lymphoma belongs to the nongermlinal center B-cell-like subgroup: A study of 18 cases. *Mod Pathol*. 2006;19(12):1521-1527.

[40] Kim MK, Bae SH, Bae YK, Kum YS, Ryoo HM, Cho HS, et al. Biological characterization of nodal versus extranodal presentation of diffuse large B-Cell lymphoma using immunohistochemistry. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2011;11(5):403-408.

[41] Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, Delabie J, Gascoyne RD, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol*. 2011;29(2):200-207.

[42] Chen Z, Du Z, Chen J, Chen Z, Bao Y, Tang F. Prognostic evaluation of immunohistochemical profiles in diffuse large B-cell lymphoma: a Chinese study. *Med Oncol*. 2011;28(1):241-248.

- [43] Culpin RE, Sieniawski M, Angus B, Menon GK, Proctor SJ, Milne P, McCabe K, Mainou-Fowler T. Prognostic significance of immunohistochemistry-based markers and algorithms in immunochemotherapy-treated diffuse large B cell lymphoma patients. *Histopathology*. 2013;63(6):788-801.
- [44] Gutiérrez-García G, Cardesa-Salzmänn T, Climent F, González-Barca E, Mercadal S, Mate JL, et al. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood*. 2011;117(18):4836-4843.
- [45] Slack GW, Steidl C, Sehn LH, Gascoyne RD. CD30 expression in de novo diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study from British Columbia. *Br J Haematol*. 2014;167(5):608-617.
- [46] Jacobsen ED, Sharman JP, Oki Y, Advani RH, Winter JN, Bello CM, et al. Brentuximab vedotin demonstrates objective responses in a phase 2 study of relapsed/refractory DLBCL with variable CD30 expression. *Blood*. 2015;125(9):1394-1402.
- [47] Monni O, Joensuu H, Franssila K, Klefstrom J, Alitalo K, Knuutila S. BCL2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 1997;90(3):1168-1174.
- [48] Monni O, Franssila K, Joensuu H, Knuutila S. BCL2 overexpression in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 1999;34(1-2):45-52.
- [49] Kendrick SL, Redd L, Muranyi A, Henricksen LA, Stanislaw S, Smith LM, et al. BCL2 antibodies targeted at different epitopes detect varying levels of

protein expression and correlate with frequent gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Hum Pathol.* 2014;45(10):2144-2153.

[50] Fu K, Weisenburger DD, Choi WW, Perry KD, Smith LM, Shi X, et al. 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.* 2008;26(28):4587-4594.

[51] Seki R, Ohshima K, Fujisaki T, Uike N, Kawano F, Gondo H, et al. Prognostic impact of immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Cancer Sci.* 2009;100(10):1842-1847.

[52] Bellas C, García D, Vicente Y, Kilany L, Abaira V, Navarro B, et al. Immunohistochemical and molecular characteristics with prognostic significance in diffuse large B-cell lymphoma. *PLoS One.* 2014 Jun 2;9(6):e98169.

[53] Tapia G, Lopez R, Muñoz-Mármol AM, Mate JL, Sanz C, Marginet R, et al. Immunohistochemical detection of MYC protein correlates with MYC gene status in aggressive B cell lymphomas. *Histopathology.* 2011;59(4):672-678.

[54] Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol.* 2012;30(28):3452-3459.

[55] Valera A, López-Guillermo A, Cardesa-Salzmänn T, Climent F, González-Barca E, Mercadal S, et al. MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica.* 2013;98(10):1554-1562.

- [56] Horn H, Ziepert M, Becher C, Barth TF, Bernd HW, Feller AC, et al. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2013;121(12):2253-2263.
- [57] Yan LX, Liu YH, Luo DL, Zhang F, Cheng Y, Luo XL, et al. MYC expression in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in Chinese patients with diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. *PLoS One*. 2014 Aug 4;9(8):e104068.
- [58] Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Green T, Wu L, Balasubramanyam A, et al. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood*. 2013;121(20):4021-4031.
- [59] Cook JR, Goldman B, Tubbs RR, Rimsza L, Leblanc M, Stiff P, et al. Clinical significance of MYC expression and/or "high-grade" morphology in non-Burkitt, diffuse aggressive B-cell lymphomas: a SWOG S9704 correlative study. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(4):494-501.
- [60] Green TM, Young KH, Visco C, Xu-Monette ZY, Orazi A, Go RS, et al. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*. 2012;30(28):3460-3467.
- [61] Clark Schneider KM, Banks PM, Collie AM, Lanigan CP, Manilich E, Durkin LM, et al. Dual expression of MYC and BCL2 proteins predicts worse outcomes in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2015 Dec 23:1-9. [Epub ahead of print]

- [62] Perry AM, Alvarado-Bernal Y, Laurini JA, Smith LM, Slack GW, Tan KL, et al. MYC and BCL2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *Br J Haematol*. 2014;165(3):382-391.
- [63] Fiskvik I, Beiske K, Delabie J, Yri O, Spetalen S, Karjalainen-Lindsberg ML, et al. Combining MYC, BCL2 and TP53 gene and protein expression alterations improves risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(6):1742-1749.
- [64] Kendrick S, Tus K, Wright G, Jaffe ES, Rosenwald A, Campo E, et al. Diffuse large B-cell lymphoma cell-of-origin classification using the Lymph2Cx assay in the context of BCL2 and MYC expression status. *Leuk Lymphoma*. 2015 Oct 5:1-4. [Epub ahead of print]

Table I. Clinical characteristics of patients with DLBCL, NOS *de novo* treated with R-CHOP-like immunochemotherapy

Patients (n=79)	
Median patient age (range)	58 (17-82)
< 60 years	43 (54.0%)
Gender (n)	
Male	30 (38.0%)
Female	49 (62.0%)
Presentation	
Nodal	27 (34.2%)
Extranodal	52 (65.8%)
Treatment	
R-CHOP	32 (40.5%)
R-CHOP + Radiotherapy	33 (41.8%)
mini R-CHOP + Radiotherapy	3 (3.8%)
R-CHOMP	3 (3.8%)
R-CHOMP + Radiotherapy	8 (10.1%)
Response	
Complete Response	55 (69.6%)
Partial Response	16 (20.3%)
No response/progression	8 (10.1%)
Anatomic staging/Ann Arbor	
Stage I	11 (13.9%)
Stage II	21 (26.6%)
Stage III	10 (12.7%)
Stage IV	37 (46.8%)
Prognostic groups	
IPI	
Low	24 (30.4%)
Low/Intermediate	26 (32.9%)
High/Intermediate	20 (25.3%)
High	9 (11.4%)
R-IPI	
Very good	11 (13.9%)
Good	39 (49.4%)
Poor	29 (36.7%)

IPI: International Prognostic Index score; R-CHOP: rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone; R-CHOMP: rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, methotrexate and prednisone; R-IPI: revised International Prognostic Index score.

Table II. Distribution and OS of the patients with DLBCL, NOS treated with R-CHOP-like immunochemotherapy according to the immunophenotype (GCB vs. non-GCB)

IHC Algorithm	Classifiable cases	GCB (%)	Non-GCB (%)	Mean estimated survival
				GCB vs Non-GCB (months), p-value
Hans	75	22 (29.3%)	53 (70.7%)	54.8 vs. 50.8, 0.899
Choi	74	22 (29.7%)	52 (70.3%)	57.8 vs. 50.1, 0.541
Visco-Young	75	15 (20.0%)	60 (80.0%)	54.1 vs. 53.2, 0.639
Muris/clone 124	76	61 (80.3%)	15 (19.7%)	55.3 vs. 48.0, 0.624
Muris/clone E17	75	51 (68.0%)	24 (32.0%)	55.5 vs. 49.2, 0.931
Nyman	79	15 (17.7%)	65 (82.3%)	55.4 vs. 49.1, 0.522

DLBCL,NOS: diffuse large b-cell lymphoma, not otherwise specified; GCB: germinal center B-cell like.

Table III. Clinical and immunophenotypical characteristics of patients with DLBCL, NOS treated with R-CHOP-like immunochemotherapy, in relation to “Double-expressor lymphoma” phenotype (DELp), using the BCL/clone 124.

	DELp	non-DELp	p
Gender (n)			
Male	5	23	0.736
Female	6	40	
Age (n)			
≥60	7	27	0.105
<60	4	36	
Presentation (n)			
Nodal	3	22	0.915
Extranodal	8	41	
Prognostic groups (n)			
International Prognostic Index score			
IPI-low (0-2 risk factors)	7	41	0.658
IPI-high (3-5 risk factors)	4	22	
Revised International Prognostic Index score			
Very good (0 risk factor)	1	10	0.751
Good (1-2 risk factors)	6	31	
Poor (3-5 risk factors)	4	22	
Anatomic staging/Ann Arbor			
I/II	5	25	0.251
III/IV	6	38	
IHC subgroups/GEP based algorithms			
Hans			
GCB	4	18	0.678
NGCB	7	42	
Choi			
GCB	1	21	0.057
NGCB	10	38	
Visco-Young			
GCB	3	12	0.596
NGCB	8	48	
Overall survival (months)			
Mean estimated survival	40.67	56.68	0.041

DELp: “Double-expressor lymphoma” phenotype; DLBCL,NOS: diffuse large b-cell lymphoma, not otherwise specified; GCB: germinal center B-cell like; IHC: immunohistochemistry.

Figure 1. Diagrams illustrating individual algorithms and positive criteria: (A) Hans, (B) Choi, (C) Visco-Young, (D) Muris and (E) Nyman. "Group 1" in the Muris algorithm (D) is generally regarded as corresponding to the GCB subgroup, and vice versa.

Figure 2. Kaplan-Meier curves of overall survival (OS) in patients treated with R-CHOP-like immunochemotherapy according to prognostic risk groups. A. International Prognostic Index Score (IPI), B. Revised International Prognostic Index Score (R-IPI).

<i>Kappa</i>	Algorithms					
	Hans	Muris/E17	Muris/124	Nyman	Choi	Visco-Young
Hans						
Muris/E17	0.317					
Muris/124	0.196	0.732				
Nyman	0.283	0.189	0.110			
Choi	0.511	0.141	0.073	0.208		
Visco-Young	0.612	0.161	0.084	0.020	0.424	
<i>Kappa</i>	Poor	Slight	Fair	Moderate	Substantial	Almost perfect
	≤0	0.01–0.20	0.21–0.40	0.41–0.60	0.61–0.80	0.81–1.0

Figure 3. κ Coefficients, strength and significance of agreement for IHC algorithms.

Figure 4. Kaplan-Meier curves of overall survival (OS) in patients treated with R-CHOP-like immunochemotherapy according to the expression of IHC biomarkers. A. BCL2/clone 124, B. BCL2/clone E17, C. CD30, and D. MYC. The cutoff values were: BCL2/clone 124 $\geq$ 70%, BCL2/clone E17 $\geq$ 70%, CD30 $\geq$ 80% and MYC $\geq$ 40%.

Figure 5. Kaplan-Meier curves of overall survival (OS) in patients treated with R-CHOP-like immunotherapy according to the coexpression of BCL2/clone 124 and MYC. A. OS in patients with “Double-expressor lymphoma phenotype (DELp) versus patients with non-DELp, B. OS in patients with low-IPI and DELp versus patients with low-IPI and non-DELp, C. OS in patients with high-IPI and DELp versus patients with high-IPI and non-DELp, and D. OS according to DELp and IPI subgroup. The cutoff values were: BCL2/clone 124 $\geq$ 70% and MYC $\geq$ 40%. Low-IPI (0-2 risk factors) and high-IPI (3-5 risk factors).

Figure 6. Kaplan-Meier curves of overall survival (OS) in patients treated with R-CHOP-like immunotherapy according to the coexpression of BCL2/clone E17 and MYC. A. OS in patients with “Double-expressor lymphoma phenotype” (DELp) versus patients with non-DELp, B. OS in patients with low-IPI and DELp versus patients with low-IPI and non-DELp, C. OS in patients with high-IPI and DELp versus patients with high-IPI and non-DELp, and D. OS according to DELp and IPI subgroup. The cutoff values were: BCL2/clone E17 $\geq$ 70% and MYC $\geq$ 40%. Low-IPI (0-2 risk factors) and high-IPI (3-5 risk factor).