

Resumo de Tese / Thesis

**Estudo imunomolecular dos linfomas não-Hodgkin de origem B na infância:
correlação clínica e terapêutica**
*Immunological and molecular analysis in childhood B non-Hodgkin lymphomas:
clinical and therapeutic correlation*

Claudete E Klumb

Orientadores:

Franklin D. Rumjanek

Raquel C. Maia

Resumo

A proteína p53 desempenha um papel central nas respostas celulares dentre as quais se incluem o controle do ciclo e da morte celular induzida por dano ao DNA, como aquele causado por muitos agentes quimioterápicos e radiação utilizados no tratamento do câncer.

O propósito deste estudo foi descrever as funções biológicas da proteína p53 e investigar o seu papel nos linfomas não-Hodgkin de origem B da infância. Adicionalmente, nós também estudamos os tipos histológicos e a prevalência da infecção pelo vírus Epstein-Barr e sua correlação com os achados clínicos patológicos.

Uma série de crianças com linfoma não-Hodgkin B foi estudada com relação aos subtipos histológicos, características clínicas, mutações do gene *TP53* e expressão das proteínas p53, Ki-67 e mdm2. A detecção de mutações do gene *TP53* foi realizada através da técnica de PCR-SSCP dos exons 5-8/9 e seqüenciamento direto em 49 do total de 61 pacientes da série.

As mutações do gene *TP53* foram detectadas em 22.5% dos pacientes analisados, e em 20% dos pacientes com linfoma de Burkitt. A análise das seqüências destes casos mostrou a presença de mutações do tipo pontual em dez casos e uma inserção em um caso. A expressão da

proteína p53 por imuno-histoquímica foi realizada em 48 do total de 61 pacientes com resultados positivos em 31% dos casos. A proteína mdm2 foi negativa em todos os casos testados (42 casos), incluindo aqueles com mutação do gene *TP53*. Observou-se uma alta concordância entre a expressão da p53 e a presença de mutações ($p = 0.0005$). Não foi detectada uma correlação estatisticamente significativa entre mutações e os achados clínicos. A comparação da sobrevida livre de eventos entre os grupos com e sem mutação usando o teste de Long-Rank também não foi significativa. Entretanto, a análise dos efeitos da mutação na estrutura da proteína p53 identificou algumas mutantes com propriedades biológicas e bioquímicas relacionadas a diferentes respostas à quimioterapia. Nossos dados indicam que algumas mutantes alteram de forma distinta a proteína e podem estar associadas a um fenótipo mais agressivo.

O vírus EBV foi analisado por hibridização *in situ* e PCR, e estava associado ao LB em 72% dos tumores (21/29 pacientes). O tipo 1 infectou a maioria dos casos (28/29). Houve uma tendência de associação entre idade mais baixa e os casos de linfoma de Burkitt associados ao EBV (mediana de 4 anos comparada a 6 anos, respectivamente, $p = 0.057$). Também o nosso estudo sugeriu que na região sudeste do Brasil o LB tem uma associação intermediária com o EBV.

Em conclusão, este estudo permitiu contribuir para uma melhor caracterização imunofenotípica e molecular dos linfomas não-Hodgkin B da infância no Brasil.

Abstract

The p53 protein plays a central role in cellular responses, including cell-cycle arrest and cell death in

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, com vistas à obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de concentração: Biologia Molecular e Bioquímica

Correspondência para: Claudete Esteves Klumb
Serviço de Hematologia – Instituto Nacional do Câncer
20230-130 – Praça da Cruz Vermelha, 23/7º andar
Rio de Janeiro, Brasil
FAX: + 55 (21) 2509 2004 – e-mail: cklumb@inca.gov.br

response to DNA damage such as that caused by many chemotherapeutic agents and radiation used in cancer therapy.

The purpose of this study is to provide an outline of the biological functions of p53 and to assess the role of p53 in clinical settings of childhood B non-Hodgkin's lymphoma. In order to contribute to the characterization of the B non-Hodgkin's lymphoma in our country, we also studied the prevalence and type of Epstein-Barr virus (EBV) infection and its correlation with demographic and clinicopathologic data.

We investigated a series of patients with childhood B non-Hodgkin's lymphoma for histological subtypes, clinical profiles, TP53 mutations and immunohistochemical expressions of p53, Ki-67 and mdm2 proteins. Screening for p53 mutations was made by polymerase chain reaction-strand conformational polymorphism analysis of the exons 5 to 8/9 of the gene and direct sequencing in 49 out of 61 patients of the cohort.

Mutations of TP53 were detected in 22.5% of patients analyzed and more specifically in 20% of Burkitt's lymphoma patients. Sequence analysis showed missense mutations in 10 cases and an insertion in one case. Immunostaining positivity for p53 was performed in 48 out of 61 patients. The overall frequency of p53 immunostaining positivity was 31%. The mdm2 expression was negative in all cases tested (42 cases) including the patients with TP53 mutations. There was a very strong correlation between protein expression and the presence of TP53 mutations ($P = 0.0005$). No significant correlation was found regarding age, gender, clinical stage and LDH levels and TP53 mutations. Comparisons between the event free survival curves of groups with and without the mutation using the

Log-Rank test were also not significant. However, the analysis of the effects of mutations on the core p53 structure identified biological and biochemical mutations with phenotypes probably related to different responses to chemotherapy. Our data suggested that some types of mutants can distinctly alter the protein and may be associated with a more aggressive phenotype.

EBV was detected by *in situ* hybridization and PCR in 21 of 29 Burkitt's lymphoma patients (72%) and type 1 virus infected the majority of cases (28/29). There was an association of younger ages in children with EBV in positive Burkitt's lymphomas compared with EBV in negative Burkitt's lymphoma cases (median age of 4 years, compared to 6 years, respectively; $p = 0.056$). In addition, our study suggested that in the Southeast of Brazil, Burkitt's lymphoma had a direct association with EBV.

In conclusion, this study has provided a better molecular and immunological profile of childhood B non-Hodgkin lymphoma in children from Brazil.

Avaliação:

A Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia publica os resumos e abstracts de teses da área apresentados em universidades que tenham programas de pós-graduação reconhecidos pelo MEC/Capes e considera a obtenção do título suficiente para a sua publicação na forma como se propõe a seção.

Recebido: 28/10/2003

Aceito após modificações: 02/11/2003