



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Linfoma de Burkitt

Etiologia, Epidemiologia e Clínica

Valter Bruno Da Silva Santos Rocha

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Prof. Doutor Javier Muñoz Moreno

Covilhã, Maio de 2014

Dedicatória

Dedico estas páginas ao Berto, uma fonte de inspiração.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Javier Muñoz Moreno por ter aceite o desafio de me orientar ao longo deste último ano, pela qualidade e disponibilidade que demonstrou em todos os momentos.

À Faculdade de Ciências da Saúde, e à Universidade da Beira Interior por me terem acolhido nos últimos 6 anos.

Ao Berto pela alegria e força que demonstrou e demonstra em todos os momentos.

Aos meus amigos, do Porto à Covilhã, por me terem ajudado a descontrair e por me terem sempre apoiado ao longo deste processo.

À Inês pela ajuda e apoio na elaboração da tese, e por me fazer acreditar que tudo é possível.

Por fim, ao meu Pai, à minha Mãe e ao meu irmão, Luís, pelo seu apoio e presença contantes.

Resumo

O Linfoma de Burkitt é um Linfoma não Hodgkin, muito agressivo, descrito pela primeira vez por Denis Parson Burkitt em 1958.

Ao microscópio exhibe um padrão monomórfico de células neoplásicas de tamanho médio (12 μ), com um núcleo redondo ou oval, vários nucléolos, citoplasma basófilico e vários vacúolos de conteúdo lipídico. Este padrão de células é interrompido por macrófagos que dão às lâminas uma aparência em *céu estrelado*. Caracteristicamente as amostras do Linfoma de Burkitt apresentam um elevado *turn-over* celular (Ki67>95%), sendo o tempo de duplicação celular de 24-48h.

O Linfoma de Burkitt expressa um fenótipo de linfócitos B maduros (IgM+, CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+, CD23-, ciclinaD1-, TdT-) e um fenótipo de células oriundas do centro germinativo (Bcl-6+, CD10+, Tcl-1+, CD38+, Mum-1-, CD44-, CD138- e Bcl-2-). A imagem de marca do Linfoma de Burkitt são as translocações do gene c-MYC que causam a hiperexpressão do gene e promovem o crescimento e divisão celular. A t(8;14) entre c-Myc e IgH é a mais característica e representa 80% dos casos. A t(2;8) entre c-Myc e Igk, e a t(8;22) entre c-Myc e Ig λ representam os restantes 20% dos casos. Associada às translocações de c-Myc podem também haver mutações cooperantes envolvendo as vias p53, BIM, PUMA e PI3K/AKT/mTOR.

O Linfoma de Burkitt tem três variantes clínicas associadas, a endémica, a esporádica e a variante associada à imunodeficiência. A endémica é mais frequente na África equatorial, com forte associação à infecção por *Plasmodium falciparum*. Representa 90% dos linfomas infantis e normalmente surge aos 4-7 anos. 90-100% das células tumorais são positivas para o Vírus de Epstein Barr. A variante esporádica é mais comum na Europa e EUA, representa apenas 3-6% de todos os processos malignos infantis e surge em crianças mais velhas, 10-12 anos. Cerca de 20% das células são positivas para o Vírus de Epstein Barr. A variante associada à imunodeficiência surge em doentes seropositivos para o Vírus de Imunodeficiência Humana e outros doentes imunodeprimidos, representando 25-40% dos Linfomas não Hodgkin em doentes seropositivos para o Vírus de Imunodeficiência Humana. Nestes doentes o Linfoma de Burkitt normalmente surge com contagens de linfócitos CD4+ altas, >200 células/ μ L, sendo raro com contagens de linfócitos CD4+ inferiores a 50 células/ μ L. 30-50% das células são positivas para o Vírus de Epstein Barr.

O Linfoma de Burkitt tem uma forte relação com o Vírus de Epstein Barr, este último parece promover nos linfócitos infectados o crescimento e divisão celular. Nas células do Linfoma de Burkitt, o Vírus de Epstein Barr exprime o padrão de Latência I, contudo não é

claro como é que este padrão contribui para a linfomagénese, sendo que algumas moléculas de miRNA parecem desempenhar um papel.

Normalmente os doentes com Linfoma de Burkitt apresentam múltiplas massas tumorais. A apresentação clássica do Linfoma de Burkitt é a de um tumor mandibular de crescimento rápido, porém estão descritas outras formas de apresentação. Na variante endémica as apresentações envolvendo a face representam 50-60% dos casos, e as apresentações abdominais 50% dos casos. Na variante esporádica a apresentação abdominal é a mais frequente e as massas faciais representam apenas 15-30% casos. Nos doentes com Linfoma de Burkitt associado à imunodeficiência há normalmente envolvimento dos gânglios linfáticos, do sistema nervoso central e da medula óssea. É relativamente comum os doentes com Linfoma de Burkitt apresentarem sinais e sintomas de síndrome de lise tumoral, e níveis plasmáticos de lactato desidrogenase e de ácido úrico altos (sinónimo de alto *turnover* celular).

Nos países em desenvolvimento, o diagnóstico é principalmente feito pela clínica e avaliação histológica. Nos países desenvolvidos pode-se, ainda, recorrer à imunohistoquímica e a um conjunto de meios complementares de diagnóstico e tratamento mais amplos.

Nos últimos anos, a análise dos perfis de expressão genética tem ganho uma crescente importância, em especial para o diagnóstico diferencial com outros linfomas não-Hodgkin, como o Linfoma difuso de grandes células B e o Linfoma de células B inclassificável com características intermediárias entre o Linfoma difuso de grandes células B e o Linfoma de Burkitt. Também se devem considerar no diagnóstico diferencial outros tumores da face (e.g. sarcoma, carcinomas, melanomas), e outros tumores intra-abdominais (e.g. Tumor de Wilms e neuroblastoma).

Palavras-chave

Denis Parson Burkitt; Linfoma de Burkitt endémico/esporádico/associado à imunodeficiência; Vírus Epstein Barr; *Plasmodium falciparum*; Vírus de Imunodeficiência Humana; c-Myc; Padrão *céu estrelado*; Ki67>95%; translocação t(8;14); Linfoma difuso de grandes células B.

Abstract

Burkitt's Lymphoma is a very aggressive Non-Hodgkin Lymphoma, first described by Denis Parson Burkitt, in 1958.

Under the microscope, Burkitt's Lymphoma displays a monomorphic pattern of medium size cells (12 μ) with a round or oval nucleus, several nucleoli, basophilic cytoplasm and numerous vacuoles of lipid content. This pattern is disrupted by macrophages that create a starry-sky appearance. Typically the samples from Burkitt's Lymphoma have a high cellular *turn-over* (Ki67 > 95%), and cell doubling time of 24-48h.

Burkitt's Lymphoma expresses a mature B cell phenotype (IgM +, CD19 +, CD20 +, CD22 +, CD79a +, CD23-, cyclinD1-, TdT-) and a germinal center cell phenotype (Bcl-6 +, CD10 +, Tcl-1 +, CD38 +, Mum-1-, CD44-, CD138-and-Bcl-2). The hallmarks of Burkitt's lymphoma are the translocations of c-MYC gene that cause an overexpression of the gene promoting cell growth and division. The t(8; 14) between c-Myc and IgH is the most characteristic and represents 80% of cases. The t(2; 8) between c-Myc and Igk, and the t(8, 22) between c-Myc and Ig λ represent the remaining 20% of cases. Associated with c-Myc translocation's there can also exist cooperating mutations in the p53, BIM, and PUMA PI3K/AKT/mTOR pathways.

The Burkitt's lymphoma is associated with three clinical variants, the endemic, the sporadic and the immunodeficiency associated variant. The endemic variant is most common in equatorial Africa, with a strong association with infection by *Plasmodium falciparum*. It represents 90% of infant lymphomas and usually appears in children around 4-7 years. 90-100% of the tumor cells are positive for the Epstein Barr Virus. The sporadic variant is more common in Europe and USA, it represents 3-6% of all childhood malignancies and appears in older children, 10-12 years. About 20% of the cells are positive for the Epstein Barr Virus. The immunodeficiency associated variant appears in HIV-positive patients and other immunosuppressed patients, accounting for 25-40% of non-Hodgkin lymphomas in HIV-positive patients. In these patients, Burkitt's lymphoma usually arises with high CD4+ lymphocytes counts, > 200 cells/ μ L, and it is rare with CD4+ lymphocytes counts below 50 cells/ μ L. 30-50% of the cells are positive for the Epstein Barr Virus.

Burkitt's lymphoma has a strong relationship with the Epstein Barr virus. The virus appears to promote cell growth and division in infected lymphocytes. In Burkitt's lymphoma cells, Epstein Barr virus expresses the latency I program, however it is not clear how this program contributes to the lymphoma genesis, some miRNA molecules appear to play a role.

Typically patients with Burkitt's lymphoma have multiple tumor masses. The classic presentation of Burkitt's lymphoma is a fast growing mandibular tumor, but other forms of presentation are described. In endemic variant presentations involving the face represent 50-60% of the cases, and abdominal presentations 50% of the cases. Abdominal presentation is the most frequent in the sporadic variant, and facial masses represent only 15-30% of the cases. In patients with immunodeficiency associated Burkitt's lymphoma the lymph nodes, central nervous system and bone marrow are usually involved. It is relatively common for patients with Burkitt's lymphoma to present signs and symptoms of tumor lysis syndrome, and high plasma levels of lactate dehydrogenase and uric acid (synonymous for a high cellular turnover).

In developing countries, the diagnosis is primarily made by clinical and histological evaluation. In developed countries, the diagnosis can also be made using immunohistochemistry and a more complete set of diagnostic and radiologic procedures.

In recent years, the analysis of gene expression profiles has gained increasing importance, especially for the differential diagnosis with other non-Hodgkin lymphomas such as diffuse large B-cell lymphoma and B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma. It should be also considered in the differential diagnosis other facial tumors (e.g. sarcoma, carcinoma, melanoma) and other intra-abdominal tumors (e.g. neuroblastoma and Wilms tumor).

Keywords

Denis Parson Burkitt; Endemic/Sporadic/Immunodeficiency associated Burkitt Lymphoma; Epstein Barr Virus; Plasmodium falciparum; Human Immunodeficiency Virus; c-Myc; Starry sky pattern; Ki67>95%; translocation t(8;14); Diffuse large b-cell lymphoma.

Índice

Dedicatória.....	iii
Agradecimentos.....	iv
Resumo.....	v
Palavras-chave.....	vi
Abstract.....	vii
Keywords.....	viii
Índice.....	ix
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tabelas.....	xiv
Lista de Acrónimos.....	xv
1. Introdução.....	1
2. Objectivos.....	3
3. Métodos.....	4
4. Linfoma de Burkitt – Morfologia, Imunofenótipo e Genética.....	5
4.1 Morfologia.....	5
4.1.1 Padrão <i>céu estrelado</i>	5
4.1.2 Variantes morfológicas.....	7
4.2 Imunofenótipo.....	8
4.2.1 Fenótipo de células B maduras.....	8
4.2.2 Fenótipo de células oriundas do centro germinativo.....	9
4.2.3 Expressão de CD21.....	11
4.3 Citogenética.....	12
4.4 Perfil de Expressão Genética (PEG).....	13
4.5 Adipofilina.....	14
5. Variantes Clínicas do Linfoma de Burkitt.....	16
5.1 Linfoma de Burkitt – Endémico (LBe).....	16
5.1.1 Padrão de distribuição.....	16
5.1.2 Distribuição etária e apresentação.....	18
5.1.3 Papel das infecções pelo Vírus Epstein Barr e <i>Plasmodium falciparum</i>	19
5.1.4 Outras co-infecções.....	20

5.2	Linfoma de Burkitt – esporádico (LBs)	21
5.2.1	Distribuição geográfica, etária, e por gênero	21
5.2.2	Apresentação	21
5.2.3	Associação com o VEB.....	22
5.3	Linfoma de Burkitt associado à imunodeficiência (LBI)	23
5.3.1	Linfomas relacionados com SIDA	23
5.3.2	Distribuição etária e por gênero	23
5.3.3	Apresentação	23
5.3.4	Características patológicas.....	24
5.3.5	Patogénese.....	24
5.4	Porquê três variantes clínicas?.....	25
6.	Vírus Epstein-Barr	26
6.1	Epidemiologia.....	26
6.2	Características gerais	26
6.3	Programas de transcrição viral.....	27
6.3.1	Fase Lítica	27
6.3.2	Fase de Latência	27
6.3.3	Latência III	28
6.3.4	Latência II	29
6.3.5	Latência 0/Latência I	29
6.4	Manifestações clínicas, neoplasias associadas ao VEB	30
6.5	Programas de Latência associados ao LB.....	31
6.5.1	Papel das principais proteínas expressas no LB (Latência I)	32
6.6	Oncogénese.....	33
7.	c-Myc na patogénese do LB	34
7.1	Translocações de c-Myc associadas ao LB	34
7.2	Hiperexpressão de c-Myc.....	36
7.3	Mutações cooperantes	38
7.4	Casos negativos para translocações myc e miRNA	40
8.	Clínica do Linfoma de Burkitt	41
8.1	Face e pescoço	42
8.1.1	Mandíbula	42
8.1.2	Órbita	42
8.1.3	Outros locais.....	42

8.2	Tórax.....	42
8.2.1	Mamas.....	42
8.2.2	Outros locais torácicos.....	43
8.2.3	Síndrome da Veia Cava Superior.....	43
8.3	Abdómen e pélvis.....	43
8.3.1	Tracto gastrointestinal.....	44
8.3.2	Pâncreas.....	45
8.3.3	Rins.....	45
8.3.4	Ovário.....	45
8.3.5	Testículos.....	45
8.4	Outros locais.....	45
8.4.1	Sistema Nervoso Central.....	45
8.4.2	Paraespinal.....	46
8.4.3	Medula óssea.....	46
8.5	Complicações clínicas associadas ao LB.....	46
8.5.1	Síndrome de Lise Tumoral.....	46
8.5.2	Síndrome de secreção inapropriada de hormona antidiurética (SIADH).....	48
8.5.3	Hipercalcemia.....	48
8.5.4	Complicações Hematológicas.....	48
9.	Estudos Diagnósticos.....	49
9.1	Países Desenvolvidos.....	49
9.2	Países em desenvolvimento.....	51
9.3	Estadiamento.....	51
10.	Abordagem diagnóstica.....	52
11.	Diagnostico diferencial.....	53
11.1	Tumores intra-abdominais.....	53
11.1.1	Tumor de Wilms.....	53
11.1.2	Neuroblastoma.....	53
11.1.3	Outros tumores intra-abdominais.....	54
11.2	Tumores da face.....	54
11.3	Linfomas não Hodgkin.....	54
11.3.1	Linfoma B Linfoblástico (LBL).....	54
11.3.2	Linfoma T Linfoblástico.....	54
11.3.3	Linfoma de Células do Manto (LCM).....	54

11.3.4	Linfoma difuso de grandes células B.....	55
11.3.5	Linfoma de células B inclassificável, com características intermediárias entre o LDGCB e o LB (LB/LDGCB)	57
12.	Conclusão	59
	Referências Bibliográficas	61
	Anexos.....	69

Lista de Figuras

Figura 1 - Histopatologia do LB.	6
Figura 2 - Aspirado de Medula Óssea num doente com LB.	6
Figura 3 - LB num doente VIH+.	7
Figura 4 - Translocações c-Myc-Ig no LB.	13
Figura 5 - Imunofixação de Adipofilina em casos de LB e não-LB.	15
Figura 6 - Mapa da distribuição/incidência do LB publicado por D. Burkitt	16
Figura 7 - Distribuição da Malária endémica em África..	17
Figura 8 - <i>Lymphoma belt</i>	17
Figura 9 - Infecção por VEB em linfócitos B	29
Figura 10 - Translocações Myc/Ig no LB.....	35
Figura 11 - Vias de regulação da proliferação, sobrevivência e morte celular associadas ao aumento da expressão de c-MYC.	37
Figura 12 - Eventos mutacionais cooperativos na linfomagénese do LB.....	38
Figura 13 - Conjunto de imagens de crianças com LB	41
Figura 14 - Envolvimento do LB em ambas as mamas.	43
Figura 15 - Intussuscepção ileocecal do Íleo terminal causada por LB	44
Figura 16 - Linfoma difuso de grandes células B	56
Figura 17 - Linfoma difuso de grandes células B. (x400, H&E).	57
Figura 18 - Linfoma de células B inclassificável, com características intermediárias entre o LDGCB e o LB.	58

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Formas de apresentação de crianças com idade inferior a 18 anos, com diagnóstico de LB, no “Uganda Cancer Institute” (1985 a 2005)	18
Tabela 2 - Locais de apresentação do LB (variantes endêmica <i>versus</i> esporádica)	22
Tabela 3 - Proteínas virais expressas em cada um dos programas virais	28
Tabela 4 - Neoplasias associadas ao VEB.	30
Tabela 5 - Percentagem de casos positivos para VEB consoante a neoplasia.....	30
Tabela 6 - Definição laboratorial de SLT	47
Tabela 7 - Definição clínica de SLT	47
Tabela 8 - Estudos analíticos	49
Tabela 9 - Exames imagiológicos complementares de diagnóstico.	50
Tabela 10 - Algorítmico de diagnóstico para LB	52

Lista de Acrónimos

AID - *Activation Induced Cytidine Deaminase*

BART - *BamHI A Rightward Transcripts*

BAAF - Biopsia de Aspiração por Agulha Fina

RCB - Receptor da Célula B

CIDR α - *Cysteine-rich Interdomain Region 1 α*

CSR - *Class Switch Recombination*

EBER - *EBV-encoded RNA*

FISH - *Fluorescent in Situ Hybridization*

HAART - Terapêutica Anti-retrovírica de Alta Eficácia

IGF-1 - *Insulin-like Growth Factor 1*

LB - Linfoma de Burkitt

LBe - Linfoma de Burkitt, variante endêmica

LBi - Linfoma de Burkitt, variante associada à imunodeficiência

LBS - Linfoma de Burkitt, variante esporádica

LB/LDGCB - Linfoma de células B inclassificável com características intermediárias entre o Linfoma Difuso de Grandes Células B e o Linfoma de Burkitt

LBL - Linfoma B Linfoblástico

LCM - Linfoma de Células do Manto

LDGCB - Linfoma Difuso de Grandes Células B

LDH - Lactato Desidrogenase

LEP - Linfoma de Efusão Primário

LMP-1 - *Latency Membrane Protein - 1*

LMP-2 - *Latency Membrane Protein - 2*

LNH - Linfoma não-Hodgkin

LPb - Linfoma Plasmoblástico

LPSNC - Linfoma Primário do Sistema Nervoso Central

MAX - *MYC associated factor X*

MMR - *Mismatch Repair*

MHC - Complexo Major de Histocompatibilidade

MUGA - *Multi-Gated Acquisition scan*

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PEG - Perfil de Expressão Genética

PET - Tomografia por Emissão de Positrões

S6K - S6-Kinase

SIDA - Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

SIADH - Síndrome de Secreção Inapropriada de Hormona Antidiurética

SLT - Síndrome de Lise Tumoral

TC - Tomografia Computorizada

TLR-9 - *Toll-Like Receptor 9*

UNG - *Uracil DNA N-Glycosylase*

VEB - Vírus de Epstein Barr

VHB - Vírus da Hepatite B

VIH - Vírus de Imunodeficiência Humana

1. Introdução

O Linfoma de Burkitt (LB) foi classificado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma entidade clínica em 1969. Contudo a sua história começa em 1910 com Albert Cook (1870-1951), provavelmente o autor da primeira descrição do Linfoma de Burkitt e o primeiro missionário médico no Uganda (1).

O LB deve o seu nome ao cirurgião irlandês Denis Parsons Burkitt (1911-1993) que dedicou grande parte da sua actividade científica ao estudo desta patologia. D. Burkitt nasceu na localidade de Enniskillen, na Irlanda do Norte, em 1911. Formou-se em medicina no Trinity College (Dublin) e trabalhou vários anos no Mulago Hospital no Uganda (2, 3). Em 1958, publicou o artigo “*A Sarcoma involving the jaws in African Children*” no *British Journal of Surgery* (4), onde descreve uma série de casos de crianças com tumores mandibulares que tinham sido assistidas no Mulago Hospital. Apesar de erroneamente ter descrito os tumores como sarcomas, este o artigo corresponde à primeira descrição clínica publicada de casos de LB. Dois anos mais tarde, Gregory O’Connor, um patologista norte-americano, identificou estes casos como se tratando de linfomas (5).

O LB é um Linfoma não Hodgkin (LNH), muito agressivo. As células neoplásicas derivam de linfócitos B maduros com origem nos centros germinativos, expressam a imunoglobulina de superfície (IgM), são positivas para CD19, CD20, CD22, CD79a, Bcl-6, CD10, Tcl-1 e CD38 e negativas para CD23, ciclina D1, TdT, Mum-1, CD44, CD138 e Bcl-2 (6). Ao microscópio óptico, as amostras de LB exibem um característico padrão em *céu estrelado*, com uma elevada percentagem de células em divisão (Ki67>95%) (7).

O LB caracteriza-se pela translocação e desregulação do gene c-Myc no cromossoma 8, gene responsável por regular uma série de processos celulares como o crescimento celular, a divisão celular e a apoptose. A primeira translocação a ser descrita foi a translocação t(8;14), por Zech *et al.* em 1975 (8). Está presente em 80% dos casos de LB, sendo que os restantes 20% estão associados às translocações t(2;8) e t(8;22). Como resultado das translocações ocorre a hiperexpressão de c-Myc (9). O LB apresenta outras mutações associadas, sendo que aproximadamente um terço exhibe mutações em p53 (10).

Há três variáveis clínicas associadas ao LB, a endémica mais frequente em África, a esporádica que surge normalmente na Europa e EUA, e a variante associada à imunodeficiência que surge em doentes seropositivos para o Vírus de Imunodeficiência Humana (VIH) e outros doentes imunodeprimidos. Os casos descritos por D. Burkitt (4) em 1958 correspondem a casos da variante endémica. Estas variantes, apesar de similares do ponto de vista histológico, apresentam diferenças na clínica e epidemiologia. A variante

endémica tem uma forte associação ao Vírus de Epstein Barr (VEB) e à infecção por *Plasmodium falciparum*.

O VEB, o primeiro vírus a ser descoberto com potencial oncogénico em humanos, foi identificado em amostras de LB por Michael Anthony Epstein, Yvonne Barr e Bert Achong em 1964 (11), contudo o seu papel no LB não está totalmente esclarecido. O VEB parece promover o crescimento e divisão dos linfócitos infectados, aumentando o risco de ocorrência de uma translocação. A infecção por *P. falciparum* parece exercer um efeito sinérgico à acção do VEB.

Um outro vírus associado ao LB é o VIH, contudo o papel deste vírus no processo de linfomogénese é pouco entendido e contra-sensual, uma vez que normalmente o LB desenvolve-se em doentes VIH+ com contagens de linfócitos CD4+ altas (>200 células/ μ L), sendo raro com contagens de linfócitos CD4+ inferiores a 50 células/ μ L (12, 13). O LB é uma das doenças definidoras do Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA).

Nas regiões endémicas, o LB representa cerca de 50% dos tumores malignos e 90% dos linfomas diagnosticados em crianças com um pico de incidência aos 6 anos de idade (14). Na maioria das crianças o tumor surge na face, envolvendo principalmente a mandíbula e os ossos da face, e no abdómen (15). A variante esporádica representa 1-2% dos linfomas no adulto, e cerca de 40% dos linfomas em crianças nos Estados Unidos da América (EUA) e Europa. Nestes casos a apresentação abdominal é a mais frequente (16). Nos doentes VIH+ o LB representa 30-40% dos LNH, surgindo em geral em locais ganglionares, medula óssea ou como uma massa extra-ganglionar no abdómen (16).

O LB é a neoplasia humana com um crescimento mais rápido (7, 17), podendo duplicar de tamanho em 24 horas (7). O diagnóstico é realizado através da análise histológica, imunofenótipo, e análise das translocações. Sendo o diagnóstico diferencial feito principalmente com o Linfoma difuso de grandes células B (LDGCB).

O tratamento do LB, em crianças e adultos, deve ser iniciado no prazo máximo de 48h após o diagnóstico (7). Apesar de não ser um tumor frequente em Portugal, é importante para os clínicos, em especial os que contactam com crianças, estarem conscientes da existência e das características do LB. Qualquer demora na instituição da terapia pode prejudicar o prognóstico da doença. Se diagnosticado atempadamente e se for instituído um esquema rigoroso de tratamento, é de esperar taxas de sobrevivência de 100% em crianças e de 75-85% em adultos, nas fases iniciais da doença (7, 17).

A constatação da necessidade de um rápido diagnóstico, aliado ao facto de a informação sobre o tema ser escassa em Portugal e na generalidade da bibliografia adoptada pelas escolas médicas, foram os factores preponderantes na escolha deste tema para a elaboração desta monografia.

2. Objectivos

Para a realização desta monografia assumimos como objectivos:

1. Descrever a morfologia clássica do LB, as variantes morfológicas, o imunofenótipo e as translocações cromossómicas associadas;
2. Descrever as três variantes clínicas do LB, a epidemiologia, a clínica e outros aspectos associados a cada uma das variantes, em particular a relação com a infecção por *P. falciparum* e com a infecção pelo VIH;
3. Descrever a relação do VEB com o LB, identificar os padrões de latência virais e o papel das proteínas virais na patogénese do LB;
4. Descrever o papel de *c-MYC* e de outras mutações associadas na patogénese do LB;
5. Descrever a clínica do LB e as complicações clínicas associadas;
6. Descrever a abordagem diagnóstica a adoptar na suspeita de LB;
7. Identificar os diagnósticos diferenciais a ter em conta na suspeita de LB.

3. Métodos

Na elaboração desta monografia, efectuamos uma pesquisa bibliográfica nas bases de dados PubMed (<http://www.pubmed.com>), Biblioteca do Conhecimento Online (<http://www.b-on.pt>) e PubMed Central Canada (<http://pubmedcentralcanada.ca/pmcc/>) com a associação da palavra “*Burkitt*” com as palavras “*Lymphoma*”; “*endemic*”, “*sporadic*”, “*Immunodeficiency associated lymphoma*”, “*EBV*”, “*HIV*”, “*Plasmodium falciparum*”, “*c-MYC*” e “*diffuse large b-cell lymphoma*”. A pesquisa foi realizada entre 5 de Dezembro de 2013 e 20 de Janeiro de 2014.

Não houve restrição de data, porém houve restrição dos idiomas para português, espanhol e inglês. Foram seleccionados os artigos de acesso livre gratuito que se mostraram relevantes e em alguns casos foram consultadas as referências bibliográficas desses artigos.

Foi também realizada uma pesquisa bibliográfica em livros da especialidade e foram consultados os sites Medscape (<http://emedicine.medscape.com/>) e Uptodate (<http://www.uptodate.com/pt/home>).

4. Linfoma de Burkitt - Morfologia, Imunofenótipo e Genética

O LB é um LNH, composto por células monomórficas de tamanho médio e com um imunofenótipo de células B maduras e de células oriundas do centro germinativo. Geneticamente, as características mais marcantes são as translocações de c-MYC sendo a t(8;14) a mais frequente. LB é um linfoma bastante agressivo, com um tempo de duplicação celular entre 24-48 horas (7). Historicamente, apresenta-se como uma massa extra-ganglionar de crescimento rápido junto ao ângulo da mandíbula, mas pode ter outras apresentações. São reconhecidas 3 variantes clínicas, a endêmica (LBe), a esporádica (LBs) e a associada à imunodeficiência (LBi) que diferem na distribuição geográfica, apresentação clínica e associação com agentes infecciosos (18).

4.1 Morfologia

4.1.1 Padrão céu estrelado

As biopsias do LB apresentam um padrão monomórfico de células neoplásicas de tamanho médio (12 μ), com um padrão de crescimento difuso e com várias figuras mitóticas visíveis. Apresentam um núcleo redondo ou oval, com cromatina imatura, finamente granular e vários nucléolos basófilicos paracentrais. O citoplasma é basófilico, devido à grande quantidade de RNA, observando-se vários vacúolos de conteúdo lipídico (Figura 2) (18, 19). Este padrão de células é interrompido por macrófagos que dão a percepção de pequenos pontos de luz num céu escuro, padrão em *céu estrelado*, característico do LB (Figura 1) (18). Este padrão não é específico do LB e pode ser observado em outros linfomas com taxas de crescimento rápidas, como por exemplo o LDGCB, o Linfoma B Linfoblástico (LBL) ou o Linfoma Plasmoblástico (LPb) (18, 19).

Os macrófagos fagocitam os corpos apoptóticos derivados do elevado *turn-over* celular característico do LB (Ki67>95%) (Figura 1). A proteína Ki67 está presente em todas as fases do ciclo celular, excepto na fase G0, deslocando-se durante a mitose para a camada pericromossomal. Estas características permitem a sua utilização como marcador de proliferação (20). A taxa de proliferação alta não é exclusiva do LB, porém são poucos os linfomas que apresentam um índice ki67 tão elevado. O LDGCB e o LPb podem apresentar índice ki67>90% (10).

Uma outra característica dos tecidos do LB é o escasso tecido de suporte fibrovascular e a presença de áreas de necrose. Como a formação de tecidos de suporte e de vasos sanguíneos não é capaz de acompanhar o elevado índice de proliferação celular, formam-se áreas de degeneração celular e necrose. Se a biopsia for realizada a partir de uma destas áreas de necrose pode haver dificuldade no diagnóstico do LB (10).

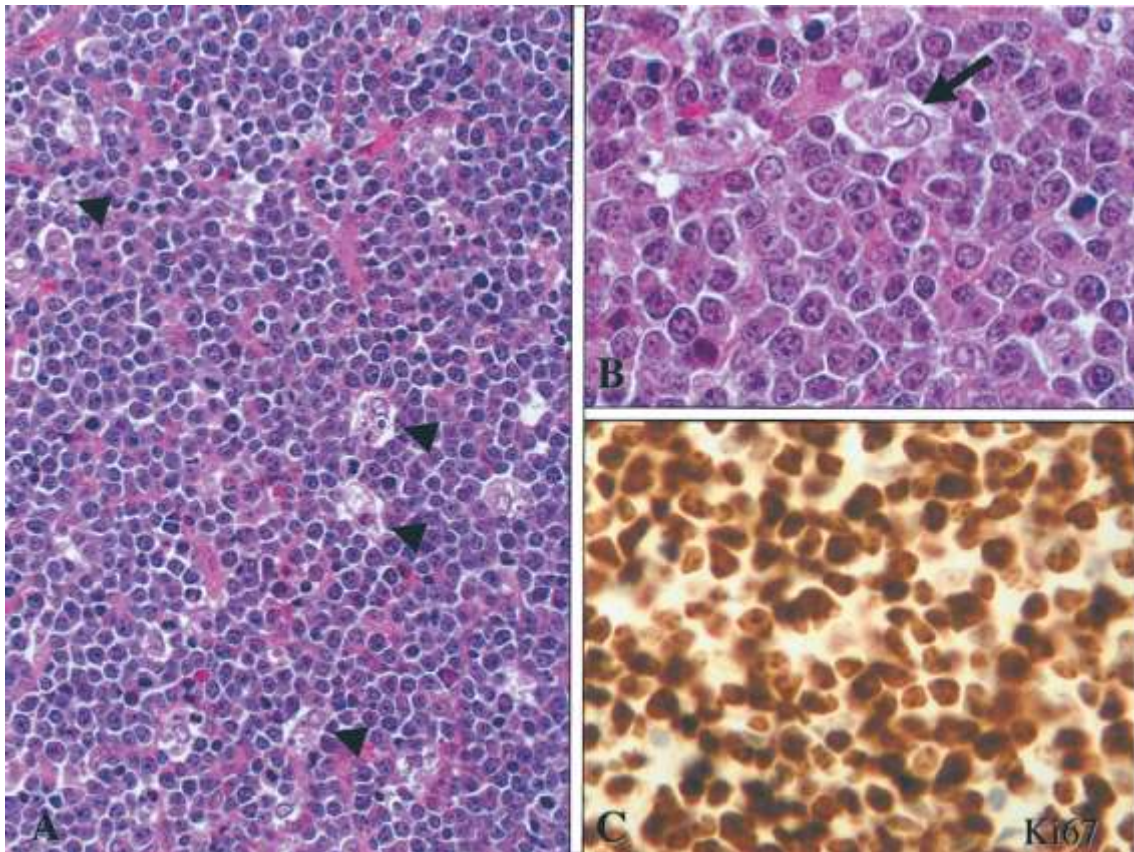


Figura 1 - Histopatologia do LB. A - Padrão *céu estrelado*, as pontas de seta assinalam os macrófagos (x200); B - A mesma imagem em maior ampliação, seta assinala um macrófago (x400); C - Células de LB marcadas para Ki67 (x400). Imagem original de Hecht, J. L., reproduzida com autorização (9).

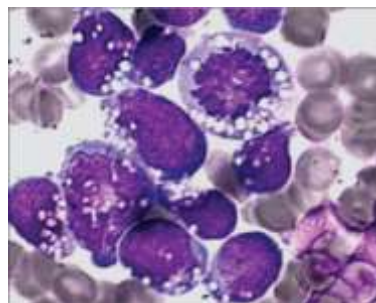


Figura 2 - Aspirado de Medula Óssea num doente com LB, é visível um conjunto de células grandes mononucleares com o citoplasma preenchido por vacúolos lipídicos. Imagem original de Ghasem Janbabai, distribuída sob os termos da Creative Commons Attribution License (21).

4.1.2 Variantes morfológicas

Em alguns casos apesar de a clínica, imunofenótipo e características moleculares apontarem para um caso do LB, as amostras de tecido exibem um maior pleomorfismo nuclear.

a) Burkitt-like ou Burkitt atípico

As células neoplásicas apresentam um maior pleomorfismo nuclear e os nucléolos são mais proeminentes e em menor número (18). É mais frequente nos casos de LB em adultos (19).

b) LB com diferenciação plasmócitoide

As células exibem uma diferenciação plasmócitoide, com citoplasma amplo e basófilo, núcleo excêntrico, por norma com um só nucléolo central. Pode ser observado em crianças mas é mais frequente em indivíduos imunodeprimidos (18, 22).

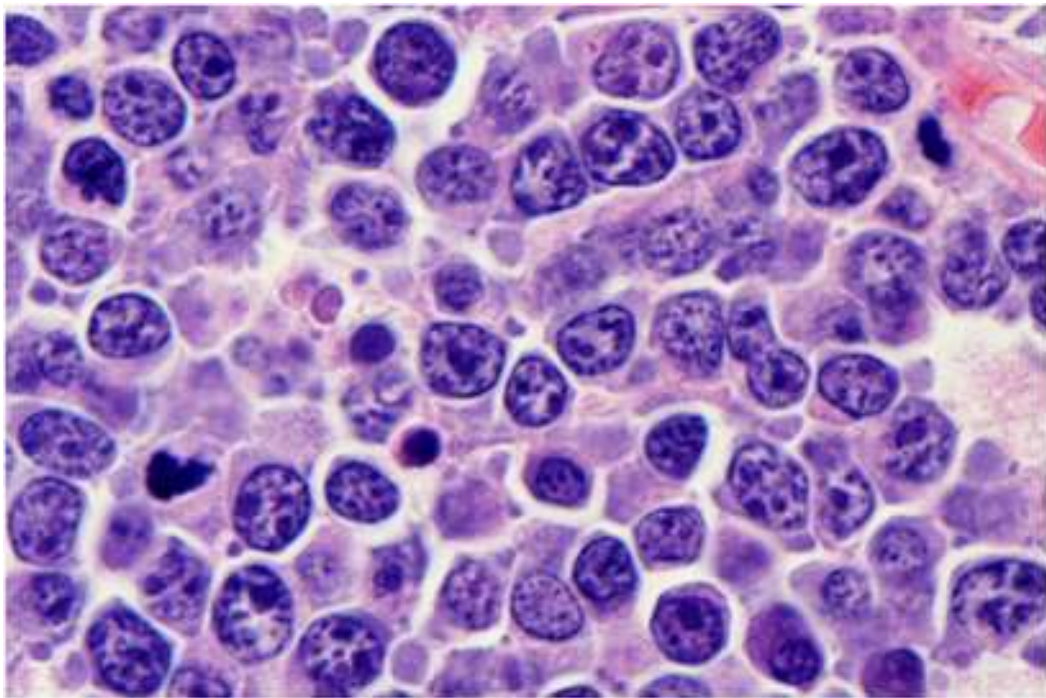


Figura 3 - LB num doente VIH+. As células exibem uma aparência plasmócitoide (H & E, 400x). Imagem original de Jonathan W. Said, reproduzida com autorização (23).

4.2 Imunofenótipo

A marcação das células tumorais com anticorpos é importante para distinguir o LB de outros LNH, e para demonstrar a origem do LB a partir de Linfócitos B maduros e de células do centro germinativo.

4.2.1 Fenótipo de células B maduras

As células neoplásicas do LB derivam de Linfócitos B maduros, expressam a imunoglobulina de superfície (IgM), são positivas para CD19, CD20, CD22 e CD79a, e são negativas para CD23, ciclina D1 e TdT (19, 22).

CD19 (positivo)

CD19 faz parte da superfamília de imunoglobulinas. É uma glicoproteína de cadeia simples presente na superfície de linfócitos B e células dendríticas foliculares do sistema hematopoiético crucial no desenvolvimento, ativação e diferenciação de linfócitos B. É um dos marcadores mais precoces da linhagem B, sendo expresso em todas as fases da maturação de células B (24).

CD20 (positivo)

CD20 é uma fosfoproteína não glicosada de aproximadamente 33 kD que é expressa em linfócitos B maduros e células pré-B. Age como um receptor durante a ativação e diferenciação de células B. A sua expressão é importante para o diagnóstico diferencial entre LB e LPb (CD20-; padrão *céu estrelado*; Ki67 elevado; EBER +) (24).

CD22 (positivo)

CD22 é uma glicoproteína integral da membrana do tipo 1. A sua expressão surge precocemente na diferenciação dos linfócitos B, aproximadamente no mesmo estágio da expressão do antígeno CD19 (24).

CD79a (positivo)

O receptor de células B (RCB) é um complexo formado pelas imunoglobulinas de membrana, IgM e IgD, e por duas cadeias peptídicas, CD79a e CD79b, que se associam de modo não covalente e têm como função dar início à sinalização intracelular após interação das imunoglobulinas com o antígeno. CD79a surge na célula pré-B e persiste até à diferenciação em plasmócito. CD79a é expresso na maioria das leucemias agudas e linfomas de células B. Não é expresso em células T (24).

CD23 (negativo)

O CD23, receptor de baixa afinidade para IgE, é uma glicoproteína de membrana de 45 kD que se encontra presente numa subpopulação de células do sangue periférico, linfócitos B, linhas celulares linfoblastoides B transformadas pelo VEB, monócitos e células dendríticas. As células do LB não expressam CD23 (24).

Ciclina D1 (negativo)

As ciclinas do tipo D são uma família de proteínas que regulam a actividade das quinases dependentes de ciclina na fase G1 do ciclo celular. A ciclina D1, uma proteína com uma massa molecular de 36 kD, também é conhecida como PRAD1 ou Bcl-1. A sua expressão máxima ocorre num ponto crítico na segunda metade da fase G1 do ciclo celular. A Ciclina D1, localizada em 11q13, tem a sua expressão aumentada nos linfomas de células do manto (LCM) devido à translocação cromossômica t(11;18), e também em aproximadamente 30 por cento dos cancros de mama (24).

TdT (negativo)

A enzima TdT (*terminal deoxyribonucleotide transferase*) cataliza a inserção de N-nucleotídeos e apenas está activa na célula pré-B (rearranjo dos genes VH) (24).

4.2.2 Fenótipo de células oriundas do centro germinativo

As células do LB apresentam um fenótipo de células oriundas do centro germinativo. São positivas para Bcl-6, CD10, Tcl-1 e CD38, e negativas para Mum-1, CD44, CD138 e Bcl-2 (o LDGCB também apresenta marcadores positivos para origem no centro germinativo) (19, 22). Em alguns casos do LB pode haver uma expressão ténue de Bcl-2 e de Mum-1, o que indica uma origem mais heterogénea a partir do centro germinativo. Por norma, estes casos surgem associados ao LBs ou mais frequentemente ao LBi (25, 26).

Bcl-6 (positivo)

Bcl-6 é essencial para o normal desenvolvimento dos linfócitos-B. A sua expressão previne a indução da apoptose por ATM e TP53, em resposta aos rearranjos de DNA que ocorrem durante o processo de hipermutação somática e o processo de mudança de isótopo de imunoglobulina (24).

CD10 (positivo)

O CD10, também chamado neprilissina, é uma metaloendopeptidase da superfície celular com 100 kD que inactiva uma variedade de peptídeos biologicamente activos. É expresso em vários tecidos e células não linfóides, como células mioepiteliais de mama e

fibroblastos, assim como na superfície de uma ampla variedade de células neoplásicas (e.g. Linfoma de Burkitt) (24).

Tcl-1 (positivo)

A superexpressão de Tcl-1 está implicada no desenvolvimento da leucemia de células T maduras. Em condições normais Tcl-1 está expresso em células T CD4-/CD8-, mas não em células em fases posteriores da diferenciação. Tcl-1 funciona como um co-ativador da AKT quinase (24). No caso do LB, a expressão de Tcl-1 parece estar dependente da infecção pelo VEB que promove a sua expressão e induz alterações genéticas e epigenéticas adicionais (27).

CD38 (positivo)

CD38 é uma glicoproteína transmembranar tipo II com um peso molecular de aproximadamente 46 kD. É uma enzima com as atividades da ADP-ribosil ciclase, ADP-ribose cíclica hidrolase, NAD glico-hidrolase e está envolvida na formação e hidrólise de cADPR, um segundo mensageiro que regula a mobilização de íons Ca^{2+} intracelulares. Está presente em células imaturas das linhagens de células B e T, tímócitos, células pré B, células B do centro germinativo, células plasmáticas secretoras de Ig, monócitos, células NK, células precursoras das linhagens eritróide e mielóide na medula óssea e cérebro (24). Não está presente na maioria dos linfócitos no sangue periférico. Está associado à doença de Alzheimer (24).

Mum-1 (negativo)

MUM-1 (oncogene de mieloma múltiplo 1) foi originalmente identificado por causa de seu envolvimento na translocação t(6:14) observada no mieloma múltiplo, que causa a sobreposição do gene MUM-1 com o locus da cadeia pesada IgH. MUM-1 é expresso nos estágios finais da diferenciação de célula B (plasmócito) e em células T activadas. Consequentemente é útil como um marcador para auxiliar na identificação da transição de BCL-6 positivo (células B do centro germinativo) para CD138 positivo (plasmócitos e imunoblastos). A expressão de MUM-1 ocorre em uma ampla variedade de neoplasias linfóides, em células de mieloma, células de Reed Sternberg e no Linfoma de Hodgkin clássico (24).

Bcl-2 (negativo)

Bcl-2 é um membro de uma família de proteínas que estão envolvidas na apoptose. Bcl-2 é uma proteína integral da membrana mitocondrial interna, de 25 kD. Actua como inibidora da apoptose e por esta razão, a sua expressão está inibida em células dos centros germinativos. Em 90% dos linfomas foliculares, ocorre a translocação t(14;18) (q32;q21) que sobrepõe o gene bcl-2 (18q21), ao gene de imunoglobulina (14q32). Esta translocação t(14;18) desregula a expressão do gene Bcl-2, aumentando a síntese da proteína Bcl-2, favorecendo a proliferação das células linfóides em relação às células normais (24).

CD44 (negativo)

CD44 (H-CAM) é uma glicoproteína transmembranar, de 80-95 kD. É um receptor de superfície para o hialuronato, sugerindo uma função na regulação das interações dos substratos da célula, assim como nos processos de migração celular. A expressão de CD44 está descrita em células T, células B, monócitos, granulócitos, eritrócitos e mais fracamente em plaquetas. Outros tipos de células positivas para CD44 incluem as células epiteliais, células gliais, fibroblastos e miócitos (24).

CD138 (negativo)

CD138 é uma glicoproteína transmembranar expressa em diferentes estágios de diferenciação de células linfáticas normais tais como células pré-B, células B imaturas e plasmócitos produtores de imunoglobulinas. Também é expressa no epitélio estratificado e simples. A perda de expressão CD138 em células atípicas é tida como um evento prematuro da oncogénese. A principal utilidade de CD138 é como marcador imuno-histoquímico para a quantificação de plasmócitos (24).

4.2.3 Expressão de CD21

CD21 é uma glicoproteína membranar, com uma massa molecular de 140 kD e que funciona como receptor para o fragmento C3d do complemento e como receptor para o vírus Epstein-Barr. CD21 está presente nas leucemias linfóides crônicas de células B e em um subconjunto de leucemias linfóides agudas de células T, estando ausente nos linfócitos T, monócitos e granulócitos. Também é expresso em células dendríticas foliculares e nos linfomas de células do manto e foliculares, leucemias maduras e linfomas (24). No LB a expressão de CD21 é variável, podendo ser expresso em alguns casos associados à variante endêmica (22).

4.3 Citogenética

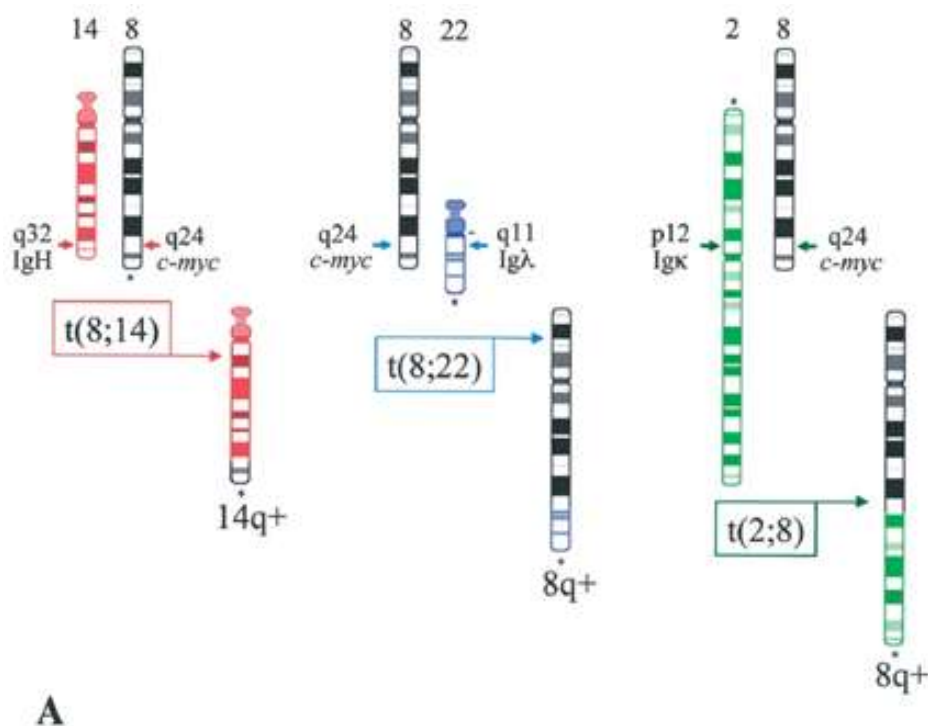
A imagem de marca do LB é a desregulação e hiperexpressão do gene e da proteína c-Myc que pode dever-se a translocações Ig-Myc (Figura 4). A translocação do gene c-MYC da banda q24, no cromossoma 8 para a região da cadeia pesada da imunoglobulina (IgH) no cromossoma 14, banda q32 (t(8;14)), ocorre em sensivelmente 80% dos casos de LB (19, 28). Dos restantes casos, 15% correspondem a translocações com a cadeia leve kappa (Igκ), cromossoma 2, banda 12p (t(2;8)) e 5% a translocações com a cadeia leve lambda (Igλ), cromossoma 22, banda 11q (t(8;22)) (19).

As translocações que ocorrem em c-myc resultam de erros induzidos pela enzima AID (*Activation Induced Cytidine Deaminase*) durante a hipermutação somática e durante o mecanismo de mudança do isotipo da imunoglobulina (*Class Switch Recombination*, CSR), processos que ocorrem nos centros germinativos em células B activadas após exposição a um antígeno (13, 29).

Em um terço dos casos de LB co-existem anomalias cromossómicas no gene de p53, banda 17p. p53 é um promotor da apoptose sendo provável que estas alterações contribuam para a tumorigénese, na medida em que a apoptose fica comprometida (19).

A presença de translocações de Ig-Myc/Bcl2 e, ou Bcl6, (linfomas *double-hit/triple-hit*) exclui o diagnóstico de LB. Estas são translocações normalmente associadas a cariotipos complexos. 10% dos LB não apresentam translocações Ig-Myc (30).

O papel de c-Myc na patogenicidade do LB é abordado mais adiante.



A

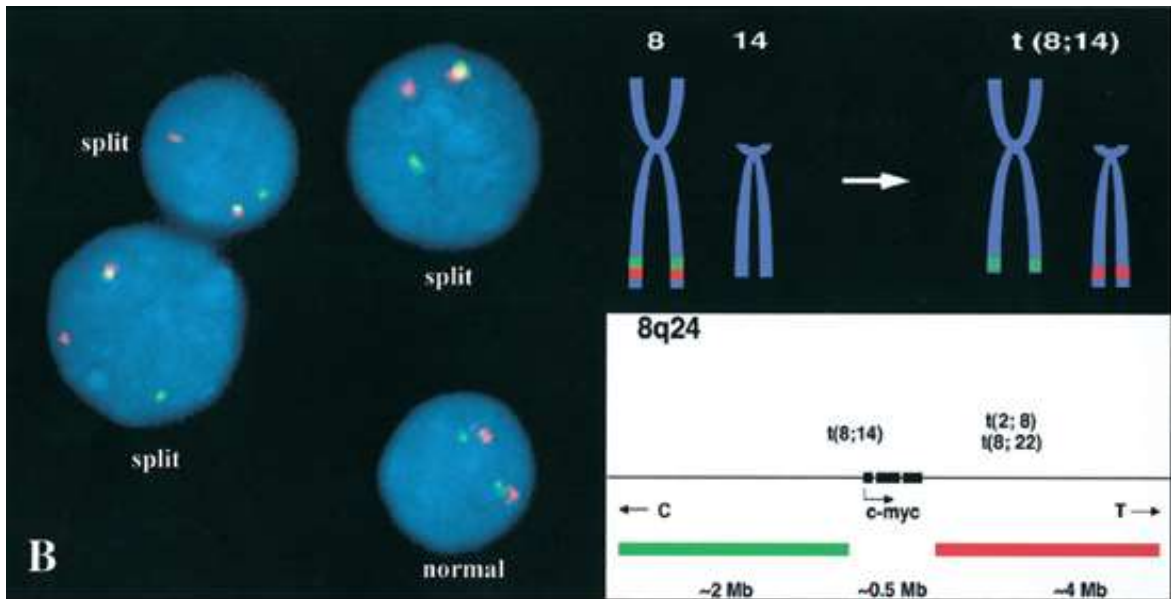


Figura 4 - Translocações c-Myc-Ig no LB.

(A) Representação das três translocações c-Myc-Ig no LB. Na translocação clássica, t(8;14), o gene c-myc é colocado em aposição ao locus da cadeia pesada da imunoglobulina (IgH) no cromossoma derivativo 14 (14q+). Nas translocações variantes (t(2;8) e t(8;22)) os loci de cadeia leve são colocados nas proximidades do gene c-myc no cromossoma derivativo 8 (8q+). A orientação do segmento translocado em cada cromossoma derivativo está assinalada com um asterisco.

(B) *Dual-color Fluorescent In Situ Hybridization* (FISH). Os diagramas à direita exibem as posições das regiões telomérica (vermelho) e centromérica (verde) de c-myc, e a posição esperada das sondas no cromossoma. À esquerda, *dual-color FISH* de um espécime de LB, a separação física dos sinais verde e vermelho é observada e indicativa das translocações.

Imagem original de Hecht, J. L. reproduzida com autorização (9).

4.4 Perfil de Expressão Genética (PEG)

A análise por microarranjo de perfis de expressão genética (PEG) do LB tem tido crescente importância nos últimos anos, tendo vindo a demonstrar que o LB é uma entidade única, diferente de outros linfomas de células B. Actualmente representa uma ferramenta importante no diagnóstico do LB, contudo normalmente não é usada devido ao elevado custo económico que lhe está associado. A análise dos PEG permite:

1. Confirmar o diagnóstico clínico e morfológico de LB (31, 32);
2. Identificar os casos duvidosos e fazer o diagnóstico diferencial com outros LNH que também exibem mutações em Myc como o LDGCB ou o Linfoma de células B

inclassificável com características intermediárias entre o LDGCB e o LB (LB/LDGCB) (31, 32);

3. Prever a resposta dos doentes ao tratamento (31, 32).

Recentemente verificou-se que as três variantes clínicas de LB exibem diferenças nos PEG, sendo que LBe e LBi são similares, apenas com diferenças subtis mas consistentes relativamente a LBs (33).

4.5 Adipofilina

Como já referido anteriormente as células neoplásicas do LB apresentam vários vacúolos citoplasmáticos de conteúdo lipídico. Estes vacúolos não podem ser observados nas lâminas histológicas por causa dos processos de fixação e inclusão, contudo a análise citológica por aspiração de agulha fina permite visualizar os vacúolos citoplasmáticos e o seu conteúdo lipídico (Figura 2). A presença destes vacúolos sugere que a biossíntese dos lípidos está alterada no LB.

O gene ADPF codifica a proteína adipofilina, que está envolvida no transporte de ácidos gordos e na preservação do conteúdo celular de triacilgliceróis. A expressão desta proteína encontra-se aumentada nas células do LB e, usando um anticorpo monoclonal dirigido contra a adipofilina, é possível localizar esta proteína nos vacúolos citoplasmáticos do LB em 96% dos casos (34). Ambrosio, M. R. *et al* (2012) verificaram que as células do LB se caracterizavam por apresentar forte imunoreactividade, com uma alta expressão de adipofilina no citoplasma celular e clusters de adipofilina junto à membrana nuclear externa, enquanto que as células de LDGCB não apresentavam expressão de adipofilina. Os casos intermédios entre LB e LDGCB apresentavam uma fraca imunoreactividade (Figura 5) (34).

Estes achados sugerem que a adipofilina poderá ser usada no diagnóstico do LB e no diagnóstico diferencial com LDGCB (34).

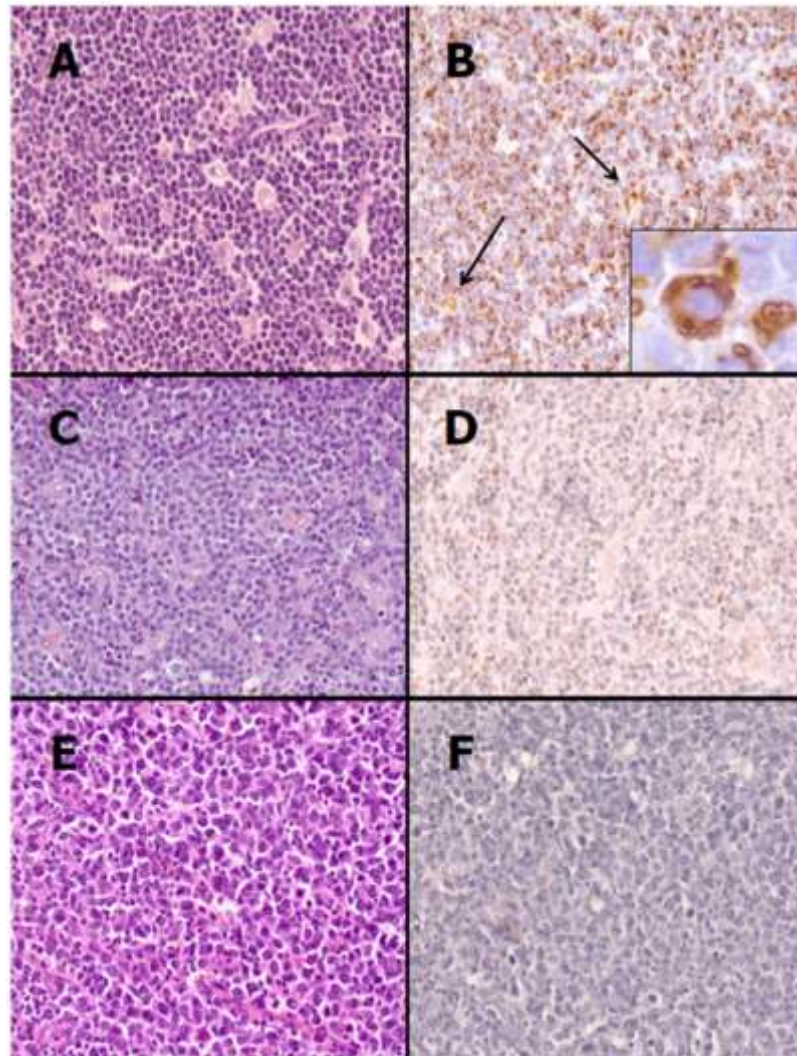


Figura 5 - Imunofixação de Adipofilina em casos de LB e não-LB.

(A) LB com padrão em *céu estrelado* (H&E, x200).

(B) Células neoplásicas do LB exibindo forte imunofixação para Adipofilina; o controlo positivo é feito com macrófagos (setas) (x200); caixa: imagem ampliada de um macrófago (x400).

(C) Linfoma agressivo de características intermédias entre o LB e o LDGCB, com um padrão de proliferação difuso, células de tamanho médio/grande, contornos nucleares irregulares e nucléolos relativamente grandes. São visíveis alguns macrófagos e pequenos linfócitos (padrão *céu estrelado*) (H&E, x200).

(D) Imunofixação de Adipofilina correspondente ao caso exibido em C. As células neoplásicas apresentam fraca imunoreactividade (x200).

(E) LDGCB (H&E, x200).

(F) Imunofixação de Adipofilina correspondente ao caso exibido em E totalmente negativa (x200).

Imagem original de Ambrosio, M. R. *et al*, distribuída sob os termos da Creative Commons Attribution License (34).

5. Variantes Clínicas do Linfoma de Burkitt

O LB é dividido em 3 variantes:

- Endêmico (LBe);
- Esporádico (LBs);
- Associado à imunodeficiência (LBi).

Genericamente as três variantes podem-se distinguir pela população onde são mais frequentes. O LBe surge maioritariamente em crianças residentes na África equatorial, o LBs em crianças e adultos residentes em outros locais do planeta, e o LBi em indivíduos imunodeprimidos.

5.1 Linfoma de Burkitt - Endêmico (LBe)

5.1.1 Padrão de distribuição

O LB apresenta um padrão de distribuição endêmico em África, tendo sido D. Burkitt a identificar as áreas onde o linfoma está presente com maior incidência, no artigo “Determining the climatic limitations of a children’s cancer common in África”, em 1962 (Figura 6) (35).



Figura 6 - Mapa da distribuição/incidência do LB publicado por D. Burkitt, em “*Determining the climatic limitations of a children’s cancer common in África*”, 1962. Reproduzido com autorização (35).

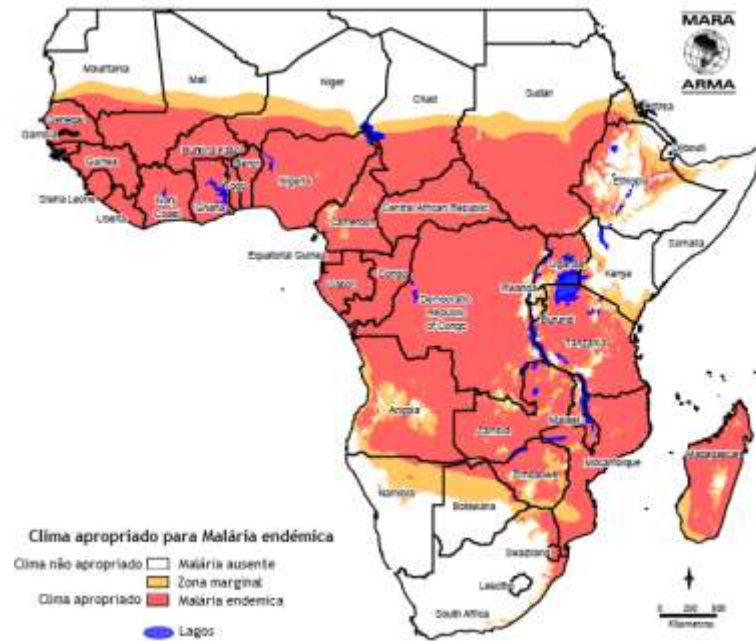


Figura 7 - Distribuição da Malária endêmica em África. Mapa original de MARA/ARMA (36).

A sobreposição do mapa epidemiológico da Malária em África (Figura 7) com o mapa das zonas identificadas por D. Burkitt (Figura 6), revela que os dois mapas são coincidentes. A relação do LB com a Malária foi descrita primeiramente por G. Dallford, em 1964, quando verificou que no Quênia as zonas com taxas de incidência mais altas para Malária e para o Linfoma Burkitt eram coincidentes (37). Goma, em 1965, fez uma observação similar, analisou dois distritos do Uganda e verificou que o LB surgia tendencialmente em comunidades próximas (até 1 milha) de fontes de água, como lagos e pântanos, locais onde os mosquitos (vectores para Malária) se reproduziam (38). Durante os anos seguintes vários estudos foram desenvolvidos a fim de provar a relação entre a malária e o LB. Hoje sabe-se que a infecção por *P. falciparum* causa a supressão do sistema imunitário nas crianças, permitindo que o VEB estimule a transformação maligna de células linfóides.

A variante endêmica do Linfoma de Burkitt (LBe) é encontrada na África equatorial, Brasil e Papua Nova Guiné (39). A zona designada de “*Lymphoma belt*” corresponde a uma área que se estende ao longo da África central, 15° a Norte e 15° Sul do Equador, onde há um clima quente e húmido (mais de 50 cm de precipitação anual), onde a malária é endêmica e onde as infecções por VEB são adquiridas em idade jovem (Figura 8) (39).



Figura 8 - *Lymphoma belt*. Reproduzido com autorização.

5.1.2 Distribuição etária e apresentação

Nas regiões endémicas, o LBe representa cerca de 50% dos tumores malignos e 90% dos linfomas diagnosticados em crianças. Normalmente surge entre os 4 e os 7 anos de idade, com um pico de incidência aos 6 anos, sendo mais frequente em crianças do sexo masculino (relação masculino:feminino, 2-4:1) (14). É frequente as crianças apresentarem-se com doença multifocal (15).

Em 77,65% dos casos o tumor surge na face (15), envolvendo principalmente a mandíbula e os ossos da face. Geralmente apresenta-se como uma massa indolor de rápido crescimento, que pode levar à deformação das estruturas adjacentes, como mandíbula, maxilar, olho, dentes, etc (16, 40). As massas abdominais, por norma múltiplas, representam 69,19% dos casos de LBe (15). O trato gastrointestinal, o fígado e o rim são algumas das estruturas abdominais afectadas (16, 40). O aparecimento do tumor nas mamas, ocorre em crianças mais velhas e está associado à puberdade, gravidez e lactação (41, 42). Em alguns casos pode haver envolvimento do SNC, sendo mais comum em crianças entre os 11-15 anos (43). Algumas crianças podem apresentar-se com paraplegia, consequência da compressão externa da *dura mater* pela massa tumoral, ou do envolvimento directo da espinal medula (44). É frequente as crianças com LBe apresentarem-se malnutridas e com outras co-infecções como malária e bilharzíase (39).

A tabela seguinte exhibe as formas de apresentação em crianças com idade inferior a 18 anos, com diagnóstico de LB no “Uganda Cancer Institute”, entre 1985 e 2005 (15).

Tabela 1 - Formas de apresentação de crianças com idade inferior a 18 anos, com diagnóstico de LB, no “Uganda Cancer Institute” (1985 a 2005) (15).

Local	Número de casos	% de casos
Tumor da face	945	77.65 %
Doença Abdominal	842	69.19 %
Linfadenopatia generalizada	512	42.07 %
Massa hepática	460	37.80 %
Massa ovário (n=451 raparigas)	145	32.15 %
Massa testicular (n= 766 rapazes)	32	4.18 %
Massa renal	193	15.86 %
Pleocitose maligna	147	12.08 %
Compressão da medula espinal	132	10.85 %
Envolvimento torácico	60	4.93 %

Tabela 1 - (continuação)

Local	Número de casos	Percentagem de casos
Envolvimento ósseo	58	4.77 %
Efusão pleural	44	3.62 %
Tumor mediastínico	13	1.07 %
Massa mamária	11	0.90 %
Envolvimento do parênquima pulmonar	11	0.90 %

O aparecimento de LB em adultos numa área endémica é incomum. Quando tal se verifica é importante avaliar o estado imunitário destes doentes uma vez que o aparecimento do LB em adultos está associado à infecção por VIH (39).

5.1.3 Papel das infecções pelo Vírus Epstein Barr e *Plasmodium falciparum*

A primo-infecção por *P. falciparum* normalmente surge ao longo do primeiro ano de vida e atinge o pico de incidência aos 5 anos de idade (14). Apesar do *P. falciparum* não ser considerado um agente oncogénico, parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento do LB. Nas regiões onde a Malária é holoendémica, verifica-se que o risco de uma criança desenvolver LB é maior comparativamente com as regiões onde não existe Malária. As crianças entre 1 e os 5 anos de idade têm um maior risco de morbilidade e mortalidade associada a infecções por *P. falciparum*, uma vez que só após vários anos de exposição contínua é que a infecção por *P. falciparum* induz uma imunidade protectora (14). Este facto é relevante porque o pico de incidência do LBe, aos 6anos, ocorre logo após este período (45). Como resultado das infecções recorrentes por *P. falciparum* estas crianças apresentam uma constante carga antigénica elevada e o sistema imunitário está em constante stress (46). Estudos recentes mostram que as reinfeções crónicas e as cargas antigénicas elevadas induzem alterações na homeostase dos linfócitos B de memória, com a formação de células B de memória atípicas, hiporesponsivas (47).

O VEB existe como uma infecção persistente em Linfócitos-B ao longo da vida do hospedeiro, sendo esta infecção controlada por Linfócitos T CD4+ e CD8+. Partículas virais do VEB podem ser encontradas em células malignas do LBe, com taxas próximas dos 100% (48). Nas crianças africanas verifica-se que a primo-infecção por VEB ocorre em grupos etários mais jovens, comparativamente com crianças europeias e norte-americanas. Aos 2 anos de idade virtualmente todas as crianças africanas estão infectadas com VEB (49).

A infecção por malária parece induzir a reactivação do VEB latente, uma vez que durante episódios agudos de Malária, o número de Linfócitos B infectados pelo VEB aumenta.

Estas crianças apresentam um valor basal mais alto de títulos do VEB, um valor muito próximo do observado em indivíduos com infecção aguda de mononucleose, indicativo de um maior número de Linfócitos-B latentes infectados (50).

Há dois mecanismos que explicam o número elevado de títulos do VEB observado: a reactivação e infecção de novos linfócitos B, e a expansão do número de Linfócitos B infectados. Os eritrócitos infectados por *P. falciparum* são eliminados no baço, um órgão rico em Linfócitos B, havendo alta probabilidade de os eritrócitos infectados com *P. falciparum* contactarem com Linfócitos B (VEB+). Os eritrócitos infectados expressam na sua superfície o antigénio CIDRa (*Cysteine-rich interdomain region 1a*), que tem a capacidade de se ligar a células B e induzir a reactivação do VEB, com libertação de viriões e infecção de Linfócitos-B *naive* (51). Em alternativa, o *P. falciparum* também pode actuar como um mitógeno de células B (52), uma vez que expressa na sua superfície um ligando para o TLR-9 (*Toll-Like receptor 9*) que é expresso na superfície de Linfócitos B. A activação da via de sinalização do TLR-9 promove a proliferação de linfócitos B (52) e induz a activação da enzima AID nestes linfócitos (53). O número elevado de títulos do VEB é relevante uma vez que o VEB expressa na sua superfície a LMP-1 (*Latency Membrane Protein - 1*), que interage com a DNA metiltransferase, resultando na modificação epigenética e subregulação do gene pro-apoptótico Bim, tornando os linfócitos B resistentes à apoptose (54).

Apesar destes mecanismos, o sistema imune deveria ser capaz de identificar e destruir as células oncogénicas, infectadas com VEB, através de mecanismos dependentes dos Linfócitos T. Contudo os indivíduos que vivem em áreas holoendémicas de malária têm estes mecanismos comprometidos. Estudos demonstram que as crianças que vivem em áreas endémicas de malária têm uma menor resposta específica ao VEB, via IFN- γ , comparadas com crianças que vivem noutras áreas. Isto sugere que a infecção por *P. falciparum* contribui para a perda de imunidade específica, ao induzir o colapso da resposta via Linfócitos T CD8+ (mediada por IFN- γ) (49).

A conjugação dos factores, infecções repetidas por *P. falciparum*, homeostase das células B afectada, aumento dos títulos virais de VEB, expansão do número de Linfócitos B latentes resistentes a estímulos apoptóticos e comprometimento da imunidade mediada por células T, parece ser o mecanismo pelo qual a malária aumenta o risco de LB.

5.1.4 Outras co-infecções

As plantas *Euphorbiae tirucalli* e *Jatropha curcas* são comuns nas áreas onde o LB é endémico. A seiva destas plantas contém esteroides de diptereno que podem activar o VEB latente e induzir rearranjos cromossómicos em cerca de 10% dos Linfócitos B (39). Os Arbovirus e o parasita schistosoma foram também associados ao LBe (39, 55). A relação destas co-infecções com o LB é ténue e carece de mais estudos.

5.2 Linfoma de Burkitt - esporádico (LBs)

Após a descrição inicial de casos de LB realizada por D. Burkitt em 1958, inúmeros outros autores descreveram casos similares de LB em outros locais do planeta. Os primeiros casos foram descritos nos meados dos anos 60, na Europa e EUA, por patologistas que os identificaram como “*linfomas histologicamente indistinguíveis do LB africano*”. Estes achados vieram demonstrar que o LB se podia dividir em dois grupos. O maior, LB endêmico (ou africano), incluía um conjunto de casos associados a uma peculiar distribuição geográfica, limitados a uma região africana onde havia uma elevada taxa de incidência. Todos os outros casos eram comparados com o primeiro grupo e designados de esporádicos, ou por qualquer um dos seguintes sinónimos: não endêmicos, não africanos, americanos, LB não endêmico de clima temperado, não tropical, atípico, ou não clássico.

5.2.1 Distribuição geográfica, etária, e por género

O LBs é mais frequente em regiões temperadas. Na Europa Ocidental e Estados Unidos da América o LBs representa apenas 1% a 2% dos LNH em adultos, e em crianças representa 3-6% de todos os processos malignos infantis (7). A idade média de diagnóstico em crianças é aos 12 anos (mais tarde que no LBe) (7). Nos indivíduos do sexo masculino o LBs apresenta uma distribuição trimodal, com três picos de incidência aos 10, 40 e 70 anos, e nos indivíduos do sexo feminino uma distribuição bimodal, com picos de incidência aos 10 e 70 anos (13). Quer nos adultos, quer nas crianças a incidência é maior no sexo masculino, com uma relação de 2:1 (13).

5.2.2 Apresentação

A apresentação mais comum é a abdominal, nomeadamente no íleo terminal, cego e gânglios linfáticos intra-abdominais. Outros locais também podem estar envolvidos como os ovários, rins, pâncreas e fígado (56). Os sintomas abdominais normalmente são inespecíficos (dor abdominal, náuseas, vômitos, obstrução intestinal) (10). O aparecimento de massas tumorais mamárias não é raro, ocorrendo, à semelhança do LBe, quase exclusivamente em mulheres no início da puberdade ou que estão a amamentar. O envolvimento do SNC e espinal medula é mais frequente que no LBe, sendo normalmente a medula óssea atingida nos casos de doença terminal. A apresentação pura como leucemia, com envolvimento da medula óssea e blastos-B circulantes semelhantes a células de Burkitt, é rara (10). Não é comum a apresentação sob tumores mandibulares (56). Os sintomas B estão presentes em um terço dos doentes à apresentação (10). A tabela 2 compara as percentagem dos locais de apresentação do LB entre as variantes endêmica e esporádica (56).

Tabela 2 - Locais de apresentação do LB (variantes endêmica versus esporádica) (56)

Local de apresentação	Percentagem de doentes	
	LB Endêmico	LB Esporádico
Abdómen	58 %	91 %
Maxilar	58 %	7 %
Orbita	11 %	1 %
Sistema Nervoso Central	19 %	14 %
Medula óssea	7 %	20 %
Paraespinal	17 %	2 %
Faringe	0 %	10 %
Efusão pleural	3 %	19 %
Gânglios linfáticos	9 %	13 %
Osso	8 %	9 %
Testículos	2 %	6 %

5.2.3 Associação com o VEB

Verifica-se uma grande variabilidade regional. Os casos LBs que surgem nos EUA e Europa apresentam taxas VEB+ na ordem dos 20-30% (6, 48), enquanto que a Índia, Nordeste Brasileiro e Egito apresentam taxas VEB+ de 80% (48).

5.3 Linfoma de Burkitt associado à imunodeficiência (LBI)

O desenvolvimento de linfomas é relativamente raro na população imunocompetente, contudo os indivíduos seropositivos para o VIH apresentam uma maior propensão para o desenvolvimento de linfomas. Aproximadamente 4% dos indivíduos com SIDA apresentam um LNH aquando o diagnóstico (57).

5.3.1 Linfomas relacionados com SIDA

Os Linfomas associados ao SIDA podem ser divididos em três categorias:

1. LNH sistémico;
2. Linfoma Primário do Sistema Nervoso Central (LPSNC);
3. Linfoma de efusão primário (LEP);

O linfoma mais comum é o LNH sistémico, seguido pelo LPSNC, sendo o LEP o mais raro. Histologicamente as variantes mais comuns são o LDGCB e o LB. Cerca de 75% dos LNH num doente VIH+ são LDGCB e cerca de 25-40% são LB (57). Nos EUA 5% dos LDGCB e 20% dos LB surgem em doentes com SIDA (10).

A presença de LB num doente VIH+ é uma das doenças definidoras de SIDA, independentemente da contagem de linfócitos T CD4+. O LB normalmente surge com contagens de linfócitos CD4+ altas, >200 células/ μ L, sendo raro com contagens de linfócitos CD4+ inferiores a 50 células/ μ L. A implementação da terapêutica anti-retrovírica de alta eficácia (HAART) não reduz o risco de LB nestes doentes, apesar de diminuir o risco para os restantes LNH (12, 13).

5.3.2 Distribuição etária e por género

Nos indivíduos VIH+ o LB é mais comum no sexo masculino e apresenta uma distribuição bi/tri-modal semelhante ao LBs (13).

O LB também surge em indivíduos com imunodeficiências congénitas - Síndrome linfoproliferativa ligado ao cromossoma X - e indivíduos receptores de transplantes homólogos, geralmente depois de um longo período após o transplante (58). Neste último grupo a maioria dos pacientes com LB são receptores de órgãos sólidos, mas o LB também pode surgir em indivíduos transplantados com células estaminais (16).

5.3.3 Apresentação

Os LNH apresentam-se em doentes VIH+ de uma forma mais agressiva comparativamente com VIH-. De uma forma geral os LNH associados à imunodeficiência, onde

se inclui o LB, apresentam-se como neoplasias de alto-grau (40-60%), com apresentação extra-ganglionar (80%), em estadios avançados (60-70%), com sintomas B presentes e uma baixa taxa de sobrevivência (média 7 - 8 meses) (10). A terapia HAART não tem influência nas manifestações clínicas do LBi (13).

5.3.4 Características patológicas

A apresentação histológica clássica em *céu estrelado* está presente nos casos de LBe e na maioria dos casos de LBs em crianças, contudo apenas está presente numa minoria de adultos com LBs e LBi. Das duas variantes morfológicas aceites, a variante plasmocítica está bastante associada à infecção pelo VIH e representa cerca de 20% dos LNH (10). A apresentação histológica clássica representa apenas 15% dos casos com contagem de linfócitos T CD4+ <100 células/ μ L (12). Contudo qualquer que seja a variante morfológica, as células neoplásicas expressam IgM de superfície, CD19, CD20, CD22, CD79a, CD10, CD43, Bcl-6 e não expressam CD5, CD23, CD138, Bcl-2, TdT. A taxa de proliferação (Ki67) deve ser >95% (10).

5.3.5 Patogénese

A patogénese do LBi não é clara. Verificou-se que a frequência das translocações c-myc está aumentada em doentes assintomáticos VIH+, e que os doentes VIH+ exibem uma alta expressão da enzima AID em células monoclonais do sangue periférico, 8 anos antes do desenvolvimento de LB (10, 13). Estes dados sugerem que o VIH promove a expressão da enzima AID, que por sua vez induz a ocorrência de translocações Ig/MYC em clones de linfócitos B nos centros germinativos. Como o risco de LB diminui com a diminuição de células CD4+, nos doentes VIH+ (13), foi sugerido que seria necessário um número mínimo de Linfócitos T CD4+ para “salvar” da apoptose os clones de linfócitos B malignos (58). Apesar desta teoria ser apelativa carece de evidências e não explica o papel do VEB, já que 30-50% dos LBi são positivos para o VEB, nem explica como surge LB em doentes transplantados ou com imunodeficiências congénitas, nem como surgem os outros LNH em doentes VIH+.

5.4 Porquê três variantes clínicas?

A existência de três variantes clínicas pode dever-se ao diferente estágio de maturação das células B no momento em que ocorre a transformação maligna e à influência do VEB. Relativamente ao primeiro aspecto, verificou-se recentemente que os casos de LBe e LBi apresentam um maior número de erros associados a fenómenos de hipermutação somática comparados com os casos de LBs (59), sugerindo que as células que originárias do LBe e do LBi encontravam-se num estágio de maturação mais avançado. Quanto à influência do VEB, verificou-se que os casos de LB VEB+ apresentam taxas mais altas de erros associados a fenómenos de hipermutação somática, em particular erros na região variável dos genes de IgH (59). Estes dados sugerem que os casos de VEB- surgem a partir de centroblastos, enquanto que os casos VEB+ surgem mais tarde no desenvolvimento das células B, provavelmente a partir de células de memória ou de células do centro germinativo em fases mais tardias de maturação (59).

As diferenças verificadas nos pontos de quebra das translocações de Ig-Myc e nos perfis de expressão genética (59) das três variantes podem também justificar as diferentes características epidemiológicas e clínicas de cada uma das variantes. Contudo ainda não se chegou a um consenso para a explicação da existência das três variantes clínicas.

6. Vírus Epstein-Barr

Na primeira metade dos anos 60, D. Burkitt era muitas vezes convidado a dar palestras em Universidades europeias sobre o Linfoma de Burkitt. Após ter assistido a uma dessas palestras, M.A. Epstein mostrou-se interessado na possibilidade de um vírus, transportado por vectores, ser a causa de um linfoma. M.A. Epstein solicitou então a D. Burkitt que lhe enviasse algumas amostras de tecido para a sua investigação que passava por fazer crescer células do LB *in vitro* e procurar depois com o auxílio de um microscópio electrónico a presença de um vírus. Foi na 1.^a linha celular derivada de células tumorais, designada por “*Epstein-Barr 1*” que pela primeira vez foi possível observar um novo vírus herpes humano, o VEB (3, 11). Esta descoberta foi publicada em 1964, na revista *The Lancet*, sobre o título “*Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt’s Lymphoma*” (11). O VEB ou Herpesvírus tipo 4, é um vírus da família *Herpesviridae* e foi o 1.^o vírus a ser descoberto com potencial oncogénico em humanos.

6.1 Epidemiologia

A infecção por VEB pode ser transmitida por via oral (e.g. saliva, objectos contaminados) ou por transfusão de sangue e estimando-se que 90% dos adultos em todo o mundo estejam infectados pelo VEB (20). Nos países não desenvolvidos, com piores condições socioeconómicas, a infecção por VEB ocorre em idades consideravelmente mais baixas. Por exemplo, no Uganda 80% das crianças são seropositivas para VEB com 1 ano de idade (20) e em Kisumu no Quênia 35.3% das crianças estão infectadas com VEB antes dos 6 meses de idade (49). Nas crianças mais novas a primo-infecção pode ocorrer de modo subclínico ou com sintomas inespecíficos de uma doença respiratória. Contudo, em crianças mais velhas e adolescentes, a resposta imunológica à infecção origina uma maior sintomatologia, manifestando-se a primo-infecção como mononucleose infecciosa (ocorre em 25-75% dos indivíduos e geralmente com uma evolução benigna) (48).

6.2 Características gerais

O VEB é um vírus com invólucro, com uma cápside icosaédrica de 10nm, e com um nucleóide formado por proteínas e pelo genoma (DNA linear de cadeia dupla) (54). É considerado um vírus linfotrópico B, ou seja infecta preferencialmente linfócitos B, embora também pode infectar linfócitos T e células epiteliais (48). Os viriões do VEB ligam-se pela glicoproteína do invólucro gp350/300 aos receptores celulares CR2 (CD21) (receptor para o fragmento C3d do complemento) dos linfócitos B. Esta ligação permite a fusão do invólucro com a membrana celular e a entrada da nucleocápside no citoplasma dos linfócitos B (48, 54). A ligação entre a glicoproteína gp42 do invólucro e o complexo major de histocompatibilidade

(MHC) classe II é usada como co-factor. Nas células epiteliais a infecção do vírus ocorre por uma via CD21-independente, uma vez que estas não expressam o receptor CD-21 (48). A expressão de CD21 nas células do LB é variável (22).

6.3 Programas de transcrição viral

6.3.1 Fase Lítica

Numa primo-infecção o VEB infecta em primeiro lugar as células epiteliais da orofaringe. No citoplasma da célula infectada ocorre a descapsidação e consequente deslocação do material genético viral para o núcleo da célula onde se inicia o padrão de infecção lítico, com libertação de viriões (18, 43). A transcrição do DNA viral pela RNA polimerase ocorre em três etapas: imediata, precoce e tardia (60). Na primeira etapa (imediata) há a síntese de proteínas de regulação, que promovem o início do ciclo lítico; na segunda etapa (precoce) são expressos genes para a síntese das enzimas necessárias para a replicação do DNA e síntese de novas moléculas de DNA-viral; na terceira etapa (tardia) há produção de mRNA para síntese de proteínas estruturais (48, 60). Segue-se a síntese e reunião das proteínas estruturais, encapsidação do genoma vírico no núcleo, aquisição do invólucro (através da passagem pela membrana nuclear) e saída dos viriões da célula por gemulação (60). Esta sequência permite a amplificação do vírus.

6.3.2 Fase de Latência

Os novos viriões infectam preferencialmente linfócitos B *naive* (IgM+IgD+) presentes nas estruturas linfóides adjacentes, como o Anel Waldeyer. Nestas células o VEB permanece em latência, ou seja, não há produção de novos vírus e o VEB associa-se ao genoma dos Linfócitos B como epissoma (18). Quando em latência, o VEB expressa um número limitado de genes: 6 proteínas nucleares (EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C e EBNA-LP), 3 proteínas latentes de membrana (LMP-1, LMP-2A, LMP-2B), 2 pequenos RNA não codificadores (EBER1 e EBER2) e transcritos de RNA da região BAMHI-A (BARTs) (18).

Consoante o perfil de expressão genética quatro principais programas de latência foram postulados, Latência I, II, III e 0 (tabela 3).

Tabela 3 - Proteínas virais expressas em cada um dos programas virais (61).

Programa de Latência	Proteínas expressas	Tipo de Célula B	Função
Latência III	Todos os EBNA, EBERs, LMP-1, LMP-2A, BARFO	<i>Naive</i>	Activar a célula B
Latência II	EBNA-1, EBERs, LMP-1, LMP-2A, BARFO	Células do centro germinativo	Diferenciar células B activadas em células de memória
Latência 0	Nenhuma	Célula de memória	Permitir a persistência viral ao longo da vida
Latência I	EBNA-1, EBERs e BARFO	Célula de memória em divisão.	Permitir que o vírus se divida.
Lítico	Todos os genes líticos	Plasmócito	Replicar o vírus no plasmócito

6.3.3 Latência III

O programa de latência III, também designado de programa “crescimento”, surge quando o VEB infecta linfócitos B *naive*, promovendo a activação destes e a sua transformação em imunoblastos (61).

In vitro, a proteína EBNA2 é fundamental para a transformação das células B em imunoblastos e para imortalização destas células (48, 62). EBNA2 funciona como activador da transcrição para algumas proteínas virais (Cp, LMP1, LMP2) assim como para algumas proteínas celulares (CD21, CD23 e c-Myc) (10, 62). O EBNA2 pode também ligar-se ao Nur77 retê-lo no núcleo impedindo-o de exercer a sua acção. O Nur77 é um receptor nuclear e um factor de transcrição que pode deslocar-se para a mitocôndria e ligar-se a Bcl-2, exercendo um efeito pró-apoptótico, pelo que a sua inactivação pelo EBNA2 tem um efeito anti-apoptótico. O EBNA2 também pode activar o Bfl-1, que tem um efeito anti-apoptótico por se ligar e neutralizar o *Bim* (62). EBNA3A e EBNA3C também têm efeitos importantes *in vitro*, sendo capazes de reprimir a expressão de *Bim* (63).

Os imunoblastos por exprimirem uma série de proteínas virais causam a activação de linfócitos T CD8+ e induzem uma resposta imunológica (48). É esta resposta imunológica que causa os sintomas da mononucleose infecciosa.

6.3.4 Latência II

O programa Latência II aparece associado às células do centro germinativo, centroblastos e centrocitos. Este programa promove a transição de imunoblastos para células de memória. Quando os imunoblastos migram para os folículos, o VEB passa para o programa de latência II e passa a expressar apenas 3 proteínas: EBNA1 (necessária para replicar o DNA viral), LMP 1 e LMP2 (proteínas de membrana) (61). A expressão de LMP1 e LMP2 ocorre de forma coordenada. Em primeiro lugar ocorre a expressão de LMP2 que promove a formação de um centro germinativo pela célula B. Em seguida ocorre a expressão conjunta de LMP1, que promove mutações nos genes das imunoglobulinas, e de LMP2, que promove o mecanismo de mudança do isotipo da imunoglobulina. Por fim, a expressão única de LMP1 diminui a expressão de Bcl6, um sinal para a célula de memória abandonar o centro germinativo (61).

6.3.5 Latência 0/Latência I

Na periferia, a célula de memória infectada deixa de expressar proteínas virais, Latência 0 (apenas há expressão de EBERs), e mantém-se como uma célula de memória aparentemente normal, não sendo reconhecida pelo sistema imune (18, 55). Como parte da homeostasia normal das células de memória, ocasionalmente a célula infectada divide-se havendo apenas expressão de EBNA-1 (Latência I). Esta proteína assegura a replicação do genoma viral.

A imagem seguinte exhibe a seqüência de etapas atrás descritas.

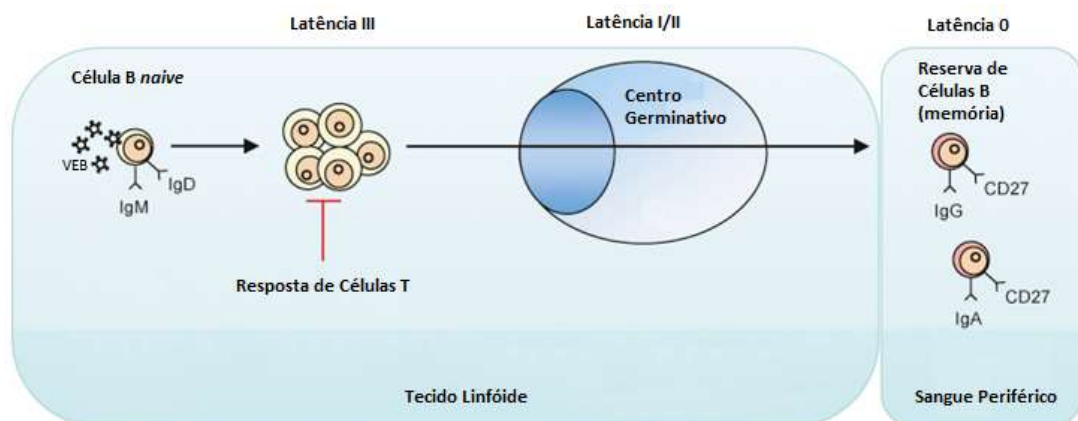


Figura 9 - Infecção por VEB em linfócitos B

6.4 Manifestações clínicas, neoplasias associadas ao VEB

Para além da mononucleose infecciosa, o VEB está também associado à leucoplasia oral pilosa (60) e a um conjunto de neoplasias. As neoplasias associadas ao VEB resultam de processos de reactivação viral, sendo que outros cofactores podem estar presentes, como a infecção por *Plasmodium falciparum* ou a infecção por VIH. As neoplasias associadas ao VEB estão descritas na tabela 4, assim como os diferentes padrões de latência viral a elas associadas (48, 54):

Tabela 4 - Neoplasias associadas ao VEB.

Programa de Latência	Neoplasias associadas
Latência I	Linfoma de Burkitt, carcinoma gástrico.
Latência II	Linfoma de Hodgkin, linfoma de células T/NK extranodal, tipo nasal e carcinoma nasofaríngeo.
Latência III	Linfomas associados a SIDA e doenças linfoproliferativas pós-transplante.

Cada uma destas neoplasias tem um fenótipo celular diferente e padrões de latência viral característicos, sugerindo que a patogenicidade destas neoplasias é distinta, assim como o papel que o VEB desempenha. A percentagem de casos positivos para VEB também varia consoante a neoplasia (Tabela 5) (48).

Tabela 5 - Percentagem de casos positivos para VEB consoante a neoplasia.

Neoplasia	% Casos positivos para VEB	Comentários
Linfoma de Burkitt endémico	> 95%	A percentagem de casos negativos, poderá estar associada a casos de LBs.
Linfoma de Burkitt esporádico	20-80%	Grande variação consoante as regiões analisadas. EUA e Europa têm taxas na ordem dos 20%; Índia, Nordeste Brasileiro e Egipto têm taxas na ordem dos 80%.
Linfoma de Burkitt associado à imunodeficiência	30-50%	---

Tabela 5 - (continuação)

Neoplasia	% Casos positivos para VEB	Comentários
Doenças linfoproliferativas pós-transplante	> 90%	---
Linfoma de Hodgkin	20-90%	A proporção varia com a área geográfica, idade, tipo histológico e estado imunológico.
Linfoma de células T/NK extranodal, tipo nasal	100%	---
Carcinoma nasofaríngeo	100%	---
Carcinoma gástrico	5-10%	---

6.5 Programas de Latência associados ao LB

In vitro as células do LB expressam o programa de Latência III, contudo *in vivo* expressam o programa Latência I. Este programa está associado apenas à expressão de EBNA1, EBER1 e EBER2 (pequenos fragmentos de RNA, não-poliadenilados) e segmentos de micro-RNA (BART) (63), não sendo expressas as proteínas promotoras do crescimento (Latência III). Algumas quantidades de LMP-2A foram também descritas em células de LB (64).

Para além do programa Latência I, existem mais dois programas de latência associados ao LB. Um deles envolve a expressão das seis moléculas de EBNA, mas não de LMP-1 ou LMP2. É um programa raro e provavelmente uma consequência da integração do genoma viral no cromossoma celular (54). O outro é o programa de Latência Wp. Neste programa, por razões ainda não esclarecidas, é usada uma região promotora alternativa do VEB, a região Wp, que conduz à expressão de EBNA-3A/B/C na ausência de EBNA-2 e LMP-1/2. É um programa relativamente comum e está presente em 15% dos casos de LBe (54). As células com este programa expressam BHRF1, uma proteína viral que não é expressa nos outros programas de latência e que é homóloga da proteína celular Bcl-2, conferindo às células protecção contra a apoptose (54).

6.5.1 Papel das principais proteínas expressas no LB (Latência I)

EBNA1

O EBNA1 é expresso em todos os linfócitos infectados com o VEB. É uma proteína de tamanho variável, 60-100kDa, devido a uma sequência repetitiva glicina-alanina. Esta sequência inibe o processamento da proteína pelo sistema ubiquitina-proteassoma, diminuindo o reconhecimento da célula infectada pelos linfócitos T CD8⁺ (48).

O EBNA tem a capacidade de se ligar a segmentos do DNA viral e promover a manutenção do episoma viral, replicação do DNA e expressão de genes da fase de latência (EBNAs) (48, 63). Parece também exercer efeitos anti-apoptóticos, uma vez que reduz a estabilidade de p53 (62, 63).

EBERs

Durante uma infecção latente do VEB são expressos pequenos segmentos, não-codificantes e não-poliadenilados de RNA, denominados por EBER 1 (166 nucleótidos) e EBER 2 (172 nucleótidos) (*EBV-encoded RNA*). Apesar de estarem presentes em grandes quantidades no LB (10^5 - 10^6 cópias/célula), o seu papel na linfomagénese não está completamente elucidado (48, 54).

Está descrito que os EBERs induzem a expressão de IL-10, via a activação de RIG-I nas células do LB (48, 63) e de modo similar também induzem a expressão do *Insulin-like growth factor 1 (IGF-1)* nas células do carcinoma nasofaríngeo (48). Ambas as moléculas actuam como factor de crescimento autócrino. É possível que os EBER possam conferir às células-B protecção contra os efeitos pró-apoptóticos do interferão- α , contudo este tema tem sido controverso e carece de mais investigação (62, 63). Está também descrito um local de ligação para c-myc na região promotora de EBER, o que parece sugerir que a expressão de c-myc induz a síntese de EBERs (63).

LMP2A

O LMP2A influencia a balança entre os agentes pró/anti-apoptose e contribui para a linfomagénese. Os baixos níveis de LMP2A detectados recentemente em amostras tumorais de LB sugerem que o LMP2A poderá proteger estas células da apoptose. (64) O LMP2A induz a via de sinalização do RCB e activa a via de sinalização PI3K/Akt/mTOR (48, 62). Isto leva a um aumento de Bcl-X_L, que vai sobrepor-se aos agentes pró-apoptóticos da família Bcl-2 (e.g. *Bim* e *PUMA*) (62). Igualmente a hiperexpressão de c-MYC em associação com LMP2A aumenta a possibilidade de uma mutação em p53 (62).

Foi sugerido que o LMP2A permite uma inclinação da balança a favor dos agentes anti-apoptose da família Bcl, numa fase inicial do desenvolvimento do LB (62). Com isto a célula tolera as mutações em c-myc e com a expansão tumoral consequente aumenta a possibilidade

de uma mutação em p53. Quando a mutação em p53 ocorre, a célula tornar-se menos dependente de LMP2A, o que explicaria o porquê de as amostras de LB apresentarem níveis residuais de LMP2A. Aproximadamente 30% dos casos de LBe e 55% dos casos de LBs têm mutações em p53 (10).

BART

BART (*BamHI A rightward transcripts*) correspondem a fragmentos de micro-RNA (20-24 nucleótidos) não codificantes. O VEB codifica cerca de 22 fragmentos de micro-RNA, que são expressos de modo diferente em todas as formas de latência e tumores. Estes fragmentos podem regular a expressão genética ao ligarem-se a sequências complementares de mRNA inibindo a sua translação ou promovendo a sua degradação directa (48, 54). BART reduz a expressão de PUMA (efeito anti-apoptótico) e da quimocina CXCL11 (48). Recentemente estes fragmentos foram associados ao LB (54).

6.6 Oncogénese

Nenhuma destas proteínas exhibe um claro papel oncogénico, sendo surpreendente que quase 40 anos depois da descoberta do VEB em células tumorais do LB não seja ainda claro se o VEB é um agente causal do LB. A prova mais convincente que aponta nesse sentido é a percentagem de casos positivos para VEB no LBe, maior que 95% (48).

O estado imunitário parece influenciar o provável potencial oncogénico do VEB no LB. Os doentes imunodeprimidos, quer por infecção por VIH, quer pela infecção por *P. falciparum* parecem estar em maior risco de desenvolver LB. Alguns autores alegam que a diminuição do estado imunitário permite que o vírus saia de latência 0 e entre em latência III, permitindo-lhe a expressão de proteínas com potencial oncogénico, como EBNA2, e activação dos Linfócitos-B. Como o LB exhibe um fenótipo de células do centro germinativo, é provável que a transformação maligna de uma célula infectada pelo VEB ocorra num centro germinativo. Alguns autores acreditam que depois dessa transformação, a célula neoplásica abandonaria o centro germinativo e passaria a comportar-se, em parte, como uma célula de memória em divisões constantes, motivo pelo qual o VEB expressaria o padrão Latência I (61, 62).

7. c-Myc na patogénese do LB

7.1 Translocações de c-Myc associadas ao LB

O gene c-Myc é expresso virtualmente em todas as células, está localizado no cromossoma 8 banda q24 e encontra-se associado a uma série de processos, como a regulação do ciclo celular, massa celular, metabolismo celular, divisão celular e apoptose. Quando uma célula quiescente recebe um sinal para se dividir há uma rápida expressão deste gene e da proteína c-MYC, que é responsável por aumentar a massa celular antes da divisão celular, permitindo que as células filhas tenham um tamanho adequado (65). A sua expressão é essencial para o estabelecimento dos centros germinativos e para o pico de proliferação celular, que ocorre sempre que um Linfócito B é activado por um Linfócito Th (66). A proteína c-MYC tem um tempo de semi-vida curto (20-30 minutos), sendo rapidamente degradada, o que a torna difícil de detectar nas análises por Western-blot (66).

Uma das imagens de marca do LB são as translocações de c-myc que lhe estão associadas. A translocação do gene c-myc no cromossoma 8, banda q24, pode ocorrer para 3 locais, nomeadamente:

1. Região da cadeia pesada da imunoglobulina (IgH) no cromossoma 14, banda q32 t(8;14) (80% dos casos) (19);
2. Região da cadeia leve kappa (Igκ) no cromossoma 2, banda 12p t(2;8) (15% dos casos) (19);
3. Região da cadeia leve lambda (IgL) no cromossoma 22, banda 11q t(8;22) (5% dos casos) (19).

As variantes clínicas do LB apresentam diferenças nos locais de quebra do cromossoma 8 e do cromossoma 14. Na variante endémica a quebra no cromossoma 8 ocorre num local mais distante de c-MYC, a mais de 100kb a montante do exon 1 (5´), e a quebra no cromossoma 14 ocorre na região J (juncional) ou D (diversidade) do gene IgH. As quebras do gene IgH ocorrem durante o processo de recombinação V(D)J, levando à justaposição do *enhancer Eμ* de IgH com as regiões promotoras P1 e P2 de c-myc, no exon 1. P1 e P2 passam a ficar sob o controlo do elemento *enhancer Eμ* de IgH. É frequente encontrar mutações nas regiões de regulação negativa do exon 1 e do exon 2 (Figura 10 - A, B) (9, 67).

No LB esporádico e no associado à imunodeficiência o ponto de quebra no cromossoma 8 ocorre entre os exons 1 e 2 (5´) do gene c-myc e as quebras no cromossoma 14 ocorrem na região *switch Sμ*. As quebras no gene IgH ocorrem durante o processo de *switching*, levando à

justaposição dos elementos *enhancer* 3' de IgH. Esta translocação leva à perda das regiões 5' de regulação negativa do exon1 e à perda dos promotores P1 e P2, passando a transcrição a ocorrer a partir do promotor P3. Também pode haver mutações nas regiões de regulação negativa do exon 2 (Figura 10 - A,C) (9, 67).

Nas translocações variantes t(2;8) e t(8;22) o ponto de quebra de c-MYC em 8q24 ocorre na região 3' de c-Myc, em sequencias não codificantes. Após a translocação, a transcrição de c-Myc continua a ocorrer a partir das regiões promotoras P1 e P2, porém sob controlo dos elementos *enhancer* de Ig κ (Ei e E3) e Ig λ (HuE λ). Estas translocações variantes podem ocorrer em qualquer uma das variantes clínicas do LB. Também é frequente encontrar mutações nas regiões de regulação negativa do exon 1 e do exon 2 (Figura 10 - A, D, E) (9, 67).

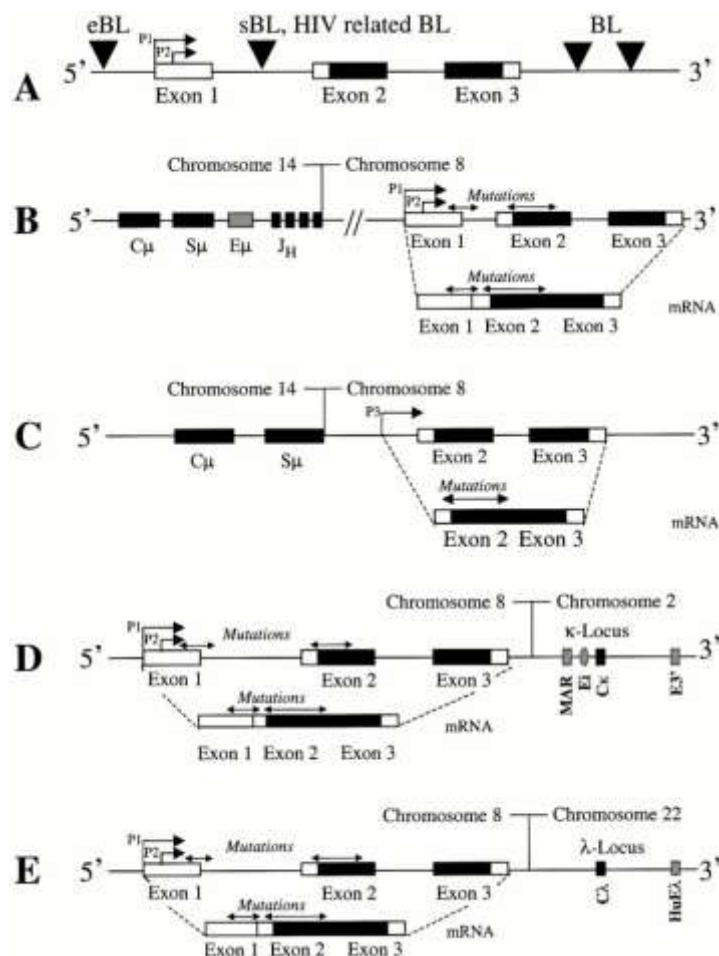


Figura 10 - Translocações Myc/Ig no LB.

(A) Representação de c-MYC no cromossoma 8 banda q24. As pontas de seta representam os locais de quebra das translocações variantes e associadas ao LBe, LBs e LBi. (B) Representação da t(8;14) com gene IgH no cromossoma 14, associada à LBe. (C) Representação da t(8;14) com gene IgH no cromossoma 14, associada aos LBs e LBi. (D) Representação do gene Ig κ , cromossoma 2, associada à t(2;8). (E) Representação do gene Ig λ , cromossoma 22, associada à t(2;8). Imagem de Hecht, J. L., reproduzido com autorização (9).

Estes achados sugerem que a transformação neoplásica ocorre durante recombinações aberrantes dos segmentos VDJ ou durante o mecanismo de mudança de classes das imunoglobulinas (6, 18). Estes processos são iniciados pela enzima AID que tem uma alta expressão nas células dos centros germinativos. A AID interage com o DNA de cadeia simples e desamina citosinas, convertendo-as em uracilos e originando *mismatch G-U*. O *mismatch G-U* pode ser processado pela enzima UNG (*Uracil DNA N-Glycosylase*) que origina um local G-apirimidínico. Alternativamente a enzima MMR (*Mismatch Repair*) pode ligar-se aos locais *mismatch G-U* ou G-apirimidínico e originar mutações predominantemente A/T. Estes pontos mutados por AID parecem ser o local de quebra para as translocações cromossômicas (29). Como resultado das translocações, ocorre a eliminação de sequências de regulação negativas do gene c-myc e a transcrição de c-MYC passa a ser regulada por regiões *enhancer* dos genes de imunoglobulinas. Como estas regiões são continuamente activadas nos Linfócitos B ocorre uma hiperexpressão de c-Myc. A desregulação de c-MYC leva a um aumento generalizado do metabolismo celular, transcrição genética, síntese de proteínas e não a uma supregulação de oncogenes específicos.

7.2 Hiperexpressão de c-Myc

O c-Myc promove a expressão de genes envolvidos no crescimento celular e divisão celular (ciclina D, E2F e de CDK4), reprime a expressão de genes que estão envolvidos na paragem do ciclo celular (p27, p15, p21, p57, GADD45, GADD34, e GADD153) e promove a expressão de genes envolvidos nas vias apoptóticas (p14^{ARF}, p53, BIM, PUMA) (Figura 11) (66, 68).

In vivo c-MYC forma heterodímeros com MAX (*MYC associated factor X*), sendo nesta forma que se liga à sequência consenso “E box” na molécula de DNA e promove a transcrição de genes. Existem no genoma centenas de locais identificados onde este complexo se pode ligar, permitindo à proteína Myc exercer as suas funções. A existência de heterodímeros MYC/MAX é fundamental para a expressão de MYC, contudo existem algumas moléculas (e.g. MAD1; MNT) que competem com MYC pelo local de ligação ao MAX. Estes novos complexos exercem efeitos inibitórios sobre MYC, uma vez que sequestram MAX evitando a formação de MYC/MAX e competindo com MYC/MAX pelos mesmos locais de ligação ao DNA. MAX também pode formar homodímeros MAX-MAX. No caso do LB a expressão excessiva de MYC provoca um aumento no número de heterodímeros MYC/MAX sobre os restantes complexos (Figura 11) (66, 68).

A hiper-expressão da proteína c-MYC promove a síntese de p14^{ARF} (via MYC/FOXO) que, por sua vez, inibe a degradação proteossômica de p53, mediada por MDM2 e MDM4, promovendo a apoptose celular (66). c-Myc também promove a expressão e activação de BIM

e PUMA, proteínas da família Bcl-2, subtipo “BH3-only” que ativam as proteínas da membrana mitocondrial, BAX e BAK. Promovendo a liberação do citocromo-C para o citoplasma, ativação da cascata de caspases e apoptose (66). A hiperexpressão de c-MYC também pode ser alvo de regulação pela via PI3K/AKT, uma via promotora do crescimento e proliferação celular (66).

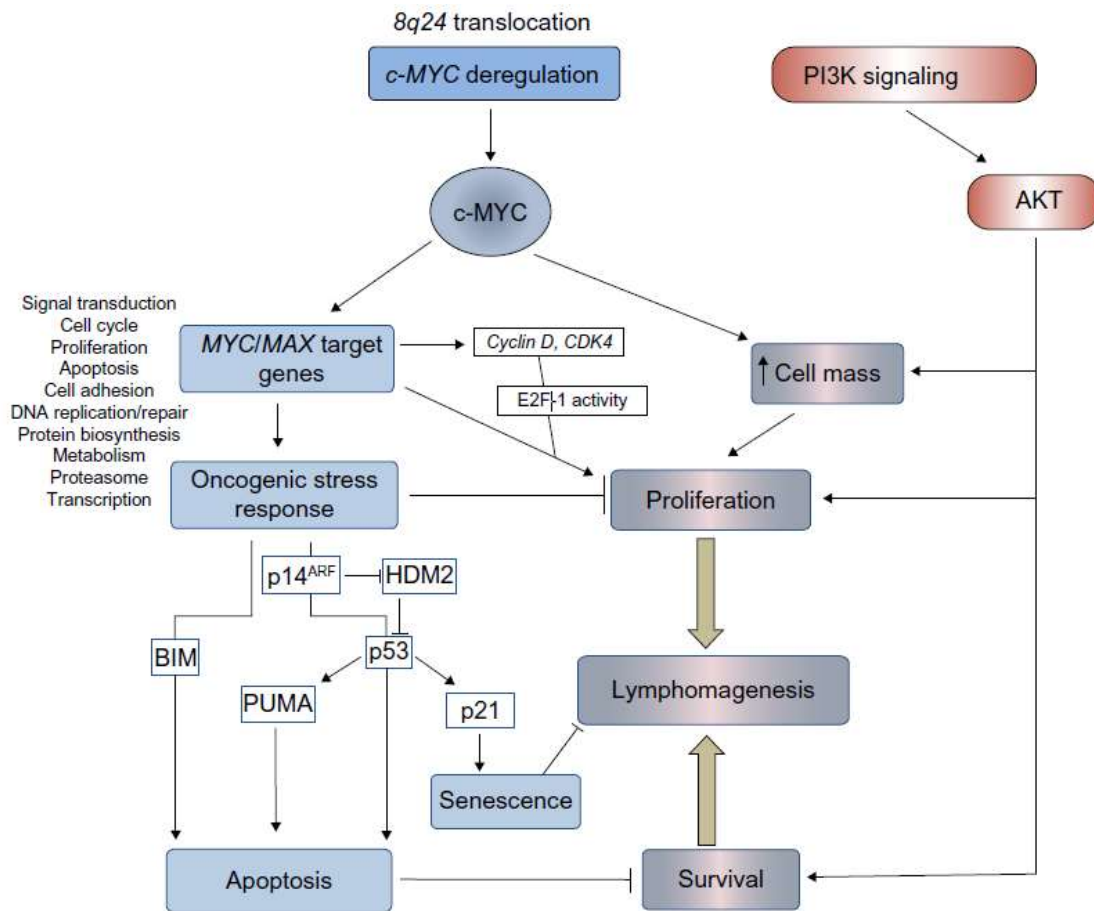


Figura 11 - Vias de regulação da proliferação, sobrevivência e morte celular associadas ao aumento da expressão de c-MYC.

Imagem original de Lindsay C Spender et al, distribuída sob os termos da Creative Commons Attribution License (66).

7.3 Mutações cooperantes

Dos LB, 5%-10% não possuem rearranjos no gene c-mYC (30). Apesar disso, o LB é bastante heterogénico do ponto de vista genético com cerca de 70 genes identificados como alvo de mutações recorrentes e cerca de 17 genes mutados por linfoma (66).

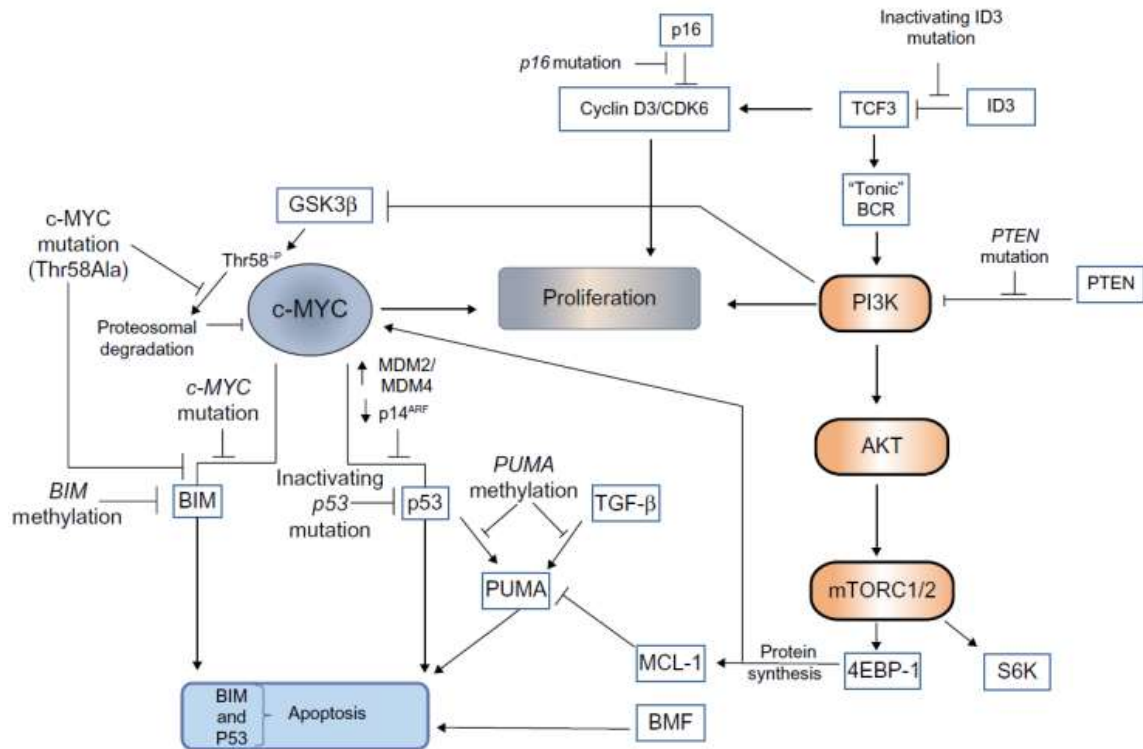


Figura 12 - Eventos mutacionais cooperativos na linfomagenese do LB.

Adaptação da imagem Lindsay C Spender et al, distribuída sob os termos da Creative Commons Attribution License (66).

7.3.1 Mutações em c-Myc

Já foi referido que como resultado das translocações as sequências de regulação negativas do gene c-myc são eliminadas, contribuindo para o aumento da expressão de c-MYC. Estas sequências de regulação (5'), próximas da fronteira entre o 1.º exon/intrão, também podem ser alvo de mutações por outros mecanismos (66). São exemplos de mutações extraordinárias em c-Myc:

- Mutações na região Box-2: Estas mutações afectam a habilidade de cMyc para induzir a transformação celular e a apoptose (66);
- Mutações na região Box-1: Mutações em Box1 afectam a proteólise de cMYC pela via da ubiquitina-proteassoma. Em 20% dos LB existem resíduos mutados nesta região, principalmente os resíduos 39, 57 e 58. A mutação Thr58Ala, substituição do

aminácido Treonina58 (Thr58) pelo aminoácido Alanina (Ala), inviabiliza a fosforilação do resíduo Thr58 por GSK3B e impede a marcação de c-Myc para degradação proteossomica (Figura 12) (66).

7.3.2 Mutações na via BIM

As mutações em c-MYC, como a mutação Thr58Ala, afectam a habilidade de c-Myc para induzir a transcrição de BIM. Para além disso, a metilação da região promotora de BIM, que pode ser promovida pelo VEB, também inviabiliza a activação desta via pró-apoptótica (Figura 12) (66).

7.3.3 Mutações na via p53

Aproximadamente 30% dos casos de LBe e 55% dos casos de LBs têm mutações em p53 (10). Foi também detectado diminuição da expressão de p14^{ARF} e aumento da expressão dos reguladores MDM2 e MDM4 em células de LB (efeito anti-apoptótico) (Figura 12) (66).

7.3.4 PUMA

Não há registo de mutações envolvendo esta proteína no LB contudo verifica-se uma expressão reduzida desta proteína, provavelmente devido à metilação dos seus promotores. Esta proteína faz parte das vias pró-apoptóticas de p53 e TGF- β (Figura 12) (66).

7.3.5 Via de sinalização PI3K/AKT/mTOR

A via de sinalização PI3K/AKT/mTOR também desempenha um papel na patogenicidade do LB. 70% dos LB apresentam mutações que aumentam a expressão desta via de sinalização nomeadamente mutações em TCF3, mutações do inibidor ID3 e mutações infrequentes (7%) da fosfatase inibitória, PTEN (66). As mutações de TCF3 e de ID3 aumentam a expressão das cadeias leves e das pesadas da imunoglobulina do RCB. Presume-se que isto levará à activação “tónica” do RCB envolvendo a via sinalização Syk, deixando de estar dependente da ligação de uma molécula de antigénio. Esta activação é fundamental na produção dos estímulos de sobrevivência das células B, conduzindo a um aumento na expressão de PI3K/AKT que promove a fosforilação de GSK3B (no resíduo de Serina 9), a fosforilação de TOXO (afecta a síntese de p14^{ARF}) e o aumento da expressão de mTORC1/2 (66). A expressão de mTORC1 aumenta por sua vez a expressão de S6-Kinase (S6K) e de 4EBP-1/eIF4E. 4EBP-1/eIF4E promove a síntese proteica e parece salvar as células da apoptose induzida por MYC (aumenta a expressão de MCL-1). A S6K promove a fosforilação e degradação do inibidor de MYC, MAD1 (forma heterodímeros com MAX) (66). Alguns autores detectaram que as mutações PI3K ganham mais expressão quando associadas a infecção por VEB contudo mais estudos sobre este aspecto são necessários (Figura 12) (66).

Também podem ocorrer mutações no gene da *ciclina D3* (Figura 12) (66).

As mutações cooperantes das translocações de c-myc, parecem desempenhar um papel importante na oncogénese do LB, uma vez que a maioria delas exerce efeitos anti-apoptóticos ao inibir as vias apoptóticas que a hiperexpressão de c-Myc induz. Com isto as desreguladas vias envolvidas no crescimento e divisão celular ficam beneficiadas, fazendo com que as células do LB permaneçam em constante divisão.

7.4 Casos negativos para translocações myc e miRNA

Um achado importante dos estudos de análise dos perfis de expressão genética foi a identificação de casos de LB sem translocações do gene MYC presentes. Estes casos translocação-negativa mantêm altos níveis de expressão da proteína MYC, o que levanta a questão da importância da identificação da translocação MYC no diagnóstico e mecanismo patogénico de LB. Dados obtidos usando análise por FISH mostram que cerca de 10% dos casos de LB são negativos para translocações MYC (30).

Recentemente o papel dos miRNA, pequenos segmentos de RNA não codificante com cerca de 22 nucleótidos e que regulam a expressão de alguns genes, tem sido associado à linfomagenese do LB. Alguns deles desempenham um papel na apoptose, diferenciação celular e proliferação celular e poderão fornecer indícios extra sobre a patogenicidade do LB (69).

E. Leucci *et al* (2008) identificaram entre casos de LB um padrão de expressão diferente em dois miRNA, hsa-let-7c e hsa-mir-34b. hsa-let-7c encontra-se infra regulado em todos os casos de LB, independentemente da presença ou ausência de translocação c-myc. hsa-mir-34b encontrava-se infra-regulado nos casos negativos para translocações MYC e supra-regulado na presença das translocações típicas (30). A. Onnis *et al* (2010) identificaram também que a expressão do miRNA, hsa-miR-9*, encontra-se supra-regulada nos casos com translocações MYC e infra-regulada nos casos negativos (70).

A identificação dos miRNA, cuja expressão se encontra alterada nos casos particulares do LB sem translocações MYC, pode representar um caminho para perceber a patogenicidade do LB, assim como de outros processos oncogénicos.

8. Clínica do Linfoma de Burkitt

Os pacientes com LB por norma apresentam múltiplas massas tumorais, ganglionares ou extra-ganglionares, de crescimento rápido, com um tempo de duplicação celular muito curto (24-48 horas) em que a quase totalidade das células estão em mitose (>95%) (7). Analiticamente apresentam níveis plasmáticos de lactato desidrogenase (LDH) e de ácido úrico elevados (sinal de alto *turnover* celular) e, não raramente apresentam sinais e sintomas de síndrome de lise tumoral (SLT). Os *Sintomas-B* (febre-inexplicada >38°C; sudação nocturna; perda de peso não justificada de pelo menos 10% do peso corporal nos últimos 6 meses) são menos frequentes mas podem estar presentes e associados a outros sintomas como fadiga (71). Alguns doentes também podem apresentar linfadenopatia generalizada.

A apresentação clássica é a de um tumor mandibular de crescimento rápido porém estão descritas outras apresentações. As apresentações na face e no abdómen são as mais frequentes, sendo também frequente os doentes apresentarem massas “*bulky*” (massas com mais de 10 cm) (72).

A apresentação clínica difere em cada uma das três variantes. As crianças com a variante endémica apresentam em 50-60% dos casos um tumor facial, mais comum na mandíbula ou órbita, sendo a apresentação abdominal menos frequente. Nas crianças com a variante esporádica apenas em 15-30% dos casos o tumor primário surge na face, sendo a apresentação abdominal mais frequente. Nos doentes com LB associado à imunodeficiência há normalmente envolvimento dos gânglios linfáticos, do SNC e da medula óssea. O aparecimento de massas nas gonadas ou o aumento bilateral das mamas está associado a puberdade, gravidez e lactação (41, 42).



Figura 13 - Conjunto de imagens de crianças com LB. Imagem original de I Magrat, distribuída sob os termos da Creative Commons Attribution License (2).

8.1 Face e pescoço

8.1.1 Mandíbula

D. Burkitt (4) descreveu muito bem esta forma de apresentação, que se caracteriza pelo aparecimento de uma massa junto ao ângulo da mandíbula. O crescimento da massa faz com que os dentes, por noma os molares, se soltem das inserções ósseas e fiquem envolvidos pela massa tumoral, acabando por cair. O crescimento da massa leva à distorção das feições faciais, podendo, em alguns casos, haver ulceração (4).

8.1.2 Órbita

O envolvimento tumoral da região orbitária e retro-orbitária manifesta-se com edema das pálpebras, quemose das conjuntivas, proptose ocular e perda de visão. Se o tratamento não for iniciado rapidamente o doente acabará por perder o olho (73).

8.1.3 Outros locais

São locais de apresentação rara na face a cavidade oral, a orofaringe e os seios nasais, destes o seio maxilar é mais frequentemente envolvido (74).

No pescoço, os gânglios cervicais e a tiróide são locais de apresentação rara mas descritos (10).

8.2 Tórax

8.2.1 Mamas

É uma apresentação rara e representa cerca de 0,05-0,25% das neoplasias malignas na mama. Surge normalmente em mulheres grávidas, mulheres que se encontram a amamentar ou na puberdade. Por norma há envolvimento bilateral e as pacientes podem detectar uma massa ou queixar-se de aumento do tamanho da mama, rubor, prurido, aumento da sensibilidade e dor. Febre e linfadenopatia, podem também estar presentes, podendo haver ulceração. Como diagnóstico diferencial tem de se considerar outras neoplasias da mama mais frequentes e um processo infeccioso, como mastite (Figura 14) (21, 42).



Figura 14 - Envolvimento do LB em ambas as mamas.

Imagem original de Ghasem Janbabai, distribuída sob os termos da Creative Commons Attribution License (21).

8.2.2 Outros locais torácicos

O tórax é um local raro de apresentação do LB, apesar de estar descrito atingimento dos gânglios axilares, atingimento da parede da caixa torácica e do mediastino (75, 76).

Os LNH que envolvem as cavidades serosas do corpo incluem uma percentagem considerável de casos de LB, que normalmente surge no contexto de SIDA. Nos doentes VIH+, o LB pode surgir como um LEP, no espaço pleural ou no pericárdio, sem a formação de uma massa tumoral. Nestes doentes, a dispneia é o sintoma mais frequente (58). O LEP também pode surgir no peritoneu, articulações ou mais raramente nas meninges, apresentando os doentes sintomatologia local como distinção abdominal (ascite), tumefacção articular e sinais meníngeos.

8.2.3 Síndrome da Veia Cava Superior

O Síndrome da Veia Cava Superior surge por compressão extrínseca da veia cava superior pela massa tumoral, ou por obstrução devido a um fenómeno trombótico. Clinicamente os pacientes podem apresentar edema da face, pescoço e extremidades superiores, rouquidão, disfagia, síncope, cefaleia, alteração do estado de consciência. O diagnóstico pode ser confirmado com recurso a métodos de imagem, nomeadamente tomografia computadorizada (TC) ou ecografia. Geralmente está associada a uma massa mediastínica (76).

8.3 Abdómen e pélvis

São várias as apresentações abdominais, sendo que em 70% dos casos quando a doença é detectada existe já uma avançada disseminação tumoral (77). A localização mais frequente é a ileo-cecal (78, 79), sendo que também estão descritas apresentações no baço,

pâncreas (80), estômago (7), fígado (81), rim (80, 81), colon (82), bexiga, ovário e testículos (77, 83). O envolvimento abdominal é mais comum na variante esporádica do LB (82). Os doentes podem ser assintomáticos ou apresentar sintomas inespecíficos como náuseas, vômitos, perda de apetite, alterações do trânsito intestinal, entre outros. O exame físico pode revelar rigidez abdominal, distensão abdominal, massa abdominal palpável, hepatoesplenomegália e, em 25% dos doentes, ascite (41). Alguns doentes podem apresentar equimoses e/ou petéquias, como resultado da trombocitopenia, ou sinais meníngeos se houver envolvimento do SNC.

8.3.1 Tracto gastrointestinal

O envolvimento da região ileocecal é mais frequente, provavelmente devido à grande concentração de tecidos linfóides nesta região. Contudo estão descritas apresentações ao longo de todo o trato gastrointestinal (41, 44, 78, 79, 82). O LB primário pode surgir no estômago em associação com *Helicobacter pylori* e nos gânglios linfáticos gástricos com erosão para o estômago (84). O LB também pode surgir na parede intestinal (e.g. íleo, cego, colon, etc) (79, 82, 85), causando tumefacção e dor na região envolvida. Pode ocorrer ainda, obstrução intestinal resultante da compressão extrínseca, do envolvimento directo do trato gastrointestinal ou como consequência de um processo de intussuscepção. A intussuscepção ileocecal secundária é mais comum em crianças e, geralmente apresenta-se com quadro de abdómen agudo (dor, febre, náuseas, vômitos e obstrução intestinal) podendo simular uma apendicite (78, 79, 82, 85).

A perfuração intestinal e hemorragia gastrointestinal também podem ocorrer, resultado do envolvimento directo do tumor na parede intestinal ou como consequência do tratamento. A quimioterapia causa necrose do tecido tumoral, criando uma zona de fragilidade na parede do intestino, que pode romper (44, 78, 79).



Figura 15 - Intussuscepção ileocecal do íleo terminal causada por LB. Imagem original de Faton T. Hoxha, distribuída sob os termos da Creative Commons Attribution License (78)

8.3.2 Pâncreas

O Pâncreas pode estar envolvido, com formação de uma massa abdominal e envolvimento dos gânglios linfáticos periaórticos. Estes doentes irão apresentar sintomas de pancreatite aguda. Em adolescentes e adultos o aparecimento de LB no pâncreas pode estar associado a estados de imunodeficiência (80).

8.3.3 Rins

Os exames de TC mostram que 90% dos doentes com envolvimento renal apresentam nefromegalia, 30% apresentam massas renais focais e 50% dos doentes apresentam hidronefrose devido a obstrução dos ureteres (82). Em um terço dos pacientes com LB há progressão para falência renal. O SLT é a causa mais comum de falência renal nos doentes com LB, sendo que a obstrução do tracto urinário, a compressão das estruturas vasculares renais por massas tumorais adjacentes e a infiltração directa do tumor no rim também podem ser causa de falência renal. Cólica renal, débito urinário diminuído e concentração de creatinina sérica aumentada são alguns achados que podem estar presentes e que indicam compromisso renal (10).

8.3.4 Ovário

É o local mais frequente para o aparecimento de LNH do sistema genital. Representando o LB 19% desses linfomas (82).

8.3.5 Testículos

Os tumores testiculares são raros nas crianças, ocorrendo o envolvimento testicular por LB em 5% dos doentes masculinos. O aumento do tamanho do testículo é a apresentação principal (41). O LB também pode afectar o cordão espermático e o epidídimo, sem envolvimento do testículo (76).

8.4 Outros locais

8.4.1 Sistema Nervoso Central

Não é uma apresentação rara de LB e geralmente é mais comum em doentes imunodeprimidos. Os sintomas são variados como: alteração leve do estado de consciência, vômitos, cefaleia, sinais meníngeos, múltiplos défices neurológicos, convulsões ou coma. O SNC era um local comum de doença recidivante, antes do uso de terapêutica profiláctica nos esquemas de tratamento do LB (86).

8.4.2 Paraespinal

Por norma é consequência da disseminação tumoral, sendo o seu envolvimento raro na apresentação primária. Os sintomas variam consoante o nível ao qual ocorre compressão da medula espinhal ou das raízes nervosas, podendo ser estas queixas álgicas, défices neurológicos como parestesias ou disfunção dos esfíncteres. Os sintomas são causados por compressão local e pelo edema vasogenico associado (87).

8.4.3 Medula óssea

O envolvimento da medula óssea por norma surge nos casos de doença avançada. Estes doentes apresentam sinais e sintomas de leucemia (21). O termo *Leucemia de Burkitt* aplica-se quando o envolvimento da medula óssea for superior a 25% (72). A *Leucemia de Burkitt* e Linfoma de Burkitt correspondem a espectros da mesma doença (6).

8.5 Complicações clínicas associadas ao LB

8.5.1 Síndrome de Lise Tumoral

O SLT é uma emergência médica, causado pela lise de uma grande quantidade de células tumorais que libertam na circulação sanguínea quantidades grandes de potássio, fosfato e ácidos nucleicos. Na maior parte das neoplasias a SLT surge após o início da terapêutica citotóxica, mas nos doentes com LB também pode surgir espontaneamente antes do início da terapêutica. As complicações metabólicas (hipercaliémia, hiperfosfatémia e hipocalcémia secundária) que resultam do SLT predispõem os doentes a insuficiência renal, arritmias cardíacas, convulsões, complicações neurológicas e morte súbita. Pode haver também a formação de cristais de ácido úrico e fosfato de cálcio que podem-se depositar em locais fora do rim como o coração, causando arritmias, e o rim, causando obstrução urinária litiásica com dor no flanco, presença de cristais na urina, hidroureter e hidronefrose, oligúria e anúria. A lesão renal vai agravar os distúrbios hidroeletrólíticos (39, 88). A tabela 6 e a tabela 7 exibem os critérios de Cairo-Bishop para definição de SLT (39).

Tabela 6 - Definição laboratorial de SLT

Definição laboratorial de SLT	
Elemento	Valor
Ácido úrico	≥ 8 mg/dL ou aumento de 25% acima do valor basal
Potássio	≥ 6 mmol/L ou aumento de 25% do valor basal
Fosfato	≥ 6,5 mg/dL ou aumento de 25% do valor basal (crianças)
	≥ 4,5 mg/dL ou aumento de 25% do valor basal (adultos)
Cálcio	≤ 7 mg/dL ou redução de 25% do valor basal
Definição laboratorial de SLT - Alteração em dois ou mais elementos, até 3 dias antes ou 7 dias depois do início da quimioterapia.	

Tabela 7 - Definição clínica de SLT

Definição clínica de SLT	
Elemento	Limite a considerar
Creatinina	≥ 1,5 vezes acima do limite superior para normalidade
Arritmia cardíaca/morte súbita	Presente
Convulsões	Presente
Definição clínica de SLT - SLT laboratorial acrescido de pelo menos um dos critérios acima descritos (não atribuídos a um agente terapêutico).	

Os doentes com Leucemia de Burkitt, Linfoma de Burkitt de estadios II ou IV e os doentes com LB estadio inicial mas com níveis plasmáticos de LDH superiores duas ou mais vezes o limite superior da normalidade, apresentam um alto risco de desenvolver SLT (Risco de SLT >5%). Por sua vez, os doentes com LB estadio inicial mas com níveis plasmáticos de LDH inferiores a duas ou mais vezes o limite superior da normalidade apresentam um risco intermédio de desenvolver SLT (Risco de SLT entre 1% e 5%) (72).

8.5.2 Síndrome de secreção inapropriada de hormona antidiurética (SIADH)

O SIADH pode ocorrer em doentes com LB e ser causa de hiponatremia, sendo que os sintomas dependem da velocidade de instalação e do grau de depleção de sódio plasmático. Normalmente os sintomas são neurológicos, reflexo do edema cerebral, sendo que numa fase inicial haverá náuseas, cefaleias e vômitos, evoluindo para convulsões, herniação, coma e morte (39).

8.5.3 Hipercalcemia

O SLT pode causar hipocalcémia mas pode também ocorrer hipercalcemia nos doentes com LB, provocada pelas lesões osteolíticas e pela produção excessiva de calcitriol. Os pacientes apresentam sintomas neurológicos inespecíficos como dificuldade de concentração, alteração de personalidade ou depressão e em casos mais graves podem apresentar letargia, estupor e sinais gastrointestinais (náuseas, anorexia, obstipação, pancreatite). Nestes doentes o risco de fractura óssea está aumentado e a capacidade de concentração renal está reduzida, levando a poliúria e polidipsia. Os doentes também podem apresentar alterações cardíacas como bradicardia, bloqueio AV e redução do intervalo QT (39).

8.5.4 Complicações Hematológicas

A infiltração da medula óssea por células tumorais, ou a quimioterapia mielotóxica podem causar citopenias graves nos doentes com LB, estando os doentes com contagens de leucócitos baixas em maior risco de infecção e sépsis. A anemia, dependendo da gravidade, pode causar vários sintomas, desde fadiga a insuficiência cardíaca. A trombocitopenia pode resultar em coagulopatias e hemorragia espontânea (39).

9. Estudos Diagnósticos

9.1 Países Desenvolvidos

O diagnóstico de LB deve ser confirmado por análise microscópica e análise imunocitoquímica. O recomendado é examinar uma biopsia de tecido suspeito, que pode ser uma neoformação, um gânglio linfático superficial ou líquido de uma efusão pleural. A biopsia de aspiração por agulha fina (BAAF) tem como vantagem ser mais rápida, barata, segura e de execução fácil, mas por norma fornece pouco material e normalmente é seguida por uma biopsia excisional para que se possam completar os estudos. A biopsia excisional é por isso preferível à BAAF. Nos casos de massas abdominais pode ser necessário fazer uma laparoscopia exploratória para recolha de amostras (39).

A análise histológica permite identificar o padrão morfológico, e a citometria de fluxo permite identificar o imunofenótipo. Para detecção das translocações de c-myc o recurso a FISH ou recurso a PCR (polymerase chain reaction) é bastante proveitoso (89).

Quando há suspeita diagnóstica de LB devem-se realizar os seguintes exames complementares de diagnóstico (Tabela 8 e 9) (39, 71, 72):

Tabela 8 - Estudos analíticos a realizar se suspeita de LB.

Estudo analítico	Comentário
Hemograma completo, com VS.	Importante para descartar a existência de pancitopenia devido a envolvimento da medula óssea.
Estudos de Coagulação (Tempo protrombina, tempo parcial tromboplastina activada, fibrinogénio, D-dímeros).	Avaliar a existência de coagulação intravascular disseminada.
Função Hepática (Níveis de bilirrubina; AST; ALT; Gama GT; Fosfatase Alcalina).	Avaliar o envolvimento hepático e a função hepática.
Função Renal (Ureia, Creatinina) e Ionograma (Sódio, Potássio, Cloro, Cálcio, Fosfato, Magnésio).	Avaliar o envolvimento do rim e a existência de STL.
Ácido Úrico.	Avaliar o “turn-over” celular.

Tabela 8 - (continuação)

Estudo analítico	Comentário
LDH	Avaliar o “turn-over” celular.
Beta 2 microglobulina	Avaliar a extensão da doença e pode ser usado como marcador de recidivas.

Em todos os pacientes deve ser descartada a presença de infecção pelo VIH e pelo Vírus da Hepatite B (VHB) (72).

Tabela 9 - Exames imagiológicos complementares de diagnóstico, a realizar se suspeita de LB.

Exames de imagem	Comentário
Radiografia do tórax.	Pesquisa de adenomegalias no mediastino e pesquisa de efusão pleural.
TC com contraste do Crânio, Tórax, Abdómen e Pelve (se insuficiência renal, realizar sem contraste).	Para avaliar a extensão da doença.
Ressonância Magnética.	Se disponível pode ser usada para avaliar o envolvimento do SNC e da coluna espinhal.
Tomografia por emissão de positrões (PET).	Para avaliar a resposta ao tratamento. Não está recomendado para o diagnóstico.
Electrocardiograma e ecocardiograma.	Se presença de arritmias.
MUGA (<i>Multi-Gated Acquisition scan</i>).	Para avaliar a fracção de ejeção cardíaca antes do início da quimioterapia (as antraciclina têm efeito cardiotóxico).

Se suspeita do envolvimento da medula óssea ou após confirmação do diagnóstico de LB devem ser realizadas biopsias aspirativas da medula óssea para pesquisa de células malignas. Se suspeita de envolvimento do SNC ou após confirmação do diagnóstico de LB, deve ser feita a análise do líquido cefalorraquidiano por punção lombar para pesquisa de células malignas. Paracentese ou toracocentese devem ser realizadas se presença de ascite ou de efusão pleural (72).

A realização destes exames não deverá atrasar o início do tratamento se suspeita de LB, sendo que o tratamento deverá ser iniciado até 48 horas após o diagnóstico de LB (7, 39).

9.2 Países em desenvolvimento

Nos países em desenvolvimento por limitações técnicas e económicas o conjunto de meios complementares de diagnóstico e tratamento realizados (MCDT) é limitado. Nestes países o diagnóstico é maioritariamente clínico e histológico (2, 45). Devem ser descartadas co-infecções como Malária, infecções por Helminthas, Schistosomas e infecção por VIH, devendo ainda ser feito diagnóstico diferencial com Sarcoma de Kaposi e Tuberculose (2, 67).

9.3 Estadiamento

O estadiamento dos LNH pode ser realizado com recurso ao sistema de classificação Ann Arbor ou ao sistema St. Jude/Murphy. Normalmente o primeiro é aplicado em adultos e o segundo em crianças (7, 16, 45). Alguns autores recusam o uso do sistema Ann Arbor por considerarem que este sistema não descreve de modo adequado a extensão da doença nos locais extra-ganglionares (20). É importante notar que o sistema de St. Jude/Murphy reconhece a Leucemia de Burkitt como uma entidade clínica diferente (6).

Aproximadamente 30% dos doentes com LB apresentam doença em estadio I ou II e 70% apresentam doença disseminada, estadio III ou IV (St.Jude/Murphy). O estadio IV do LB implica o envolvimento da medula óssea (<25%) ou do SNC sendo que 30-38% e 13-17% dos adultos apresentam envolvimento da medula óssea e do SNC respectivamente (16). Nas crianças, em 22% dos casos há envolvimento da medula óssea, tendo 22% envolvimento do SNC (16).

Na prática clínica os doentes podem ser divididos em dois grupos, os de baixo risco e os de alto risco. Os de baixo risco apresentam doença *não-bulky* (massas <10 cm), doença em estadio I ou II, bom estado geral e níveis de LDH normais. Os doentes de alto risco incluem todos os outros (72).

10. Abordagem diagnóstica

Nenhum dos parâmetros (morfológico, genético ou imunofenotípico) é patognomónico de LB, pelo que vários parâmetros têm de ser considerados para diagnóstico (90). Kikkeri N. Naresh (2011) propôs um algorítmico de diagnóstico para Linfomas de Burkitt e linfomas não-Burkitt (Tabela 10) (91). Este algoritmo divide o diagnóstico em três fases, na primeira fase é considerada a morfologia, e o imunofenótipo para CD10 e BCL2, na segunda fase é tido em conta o imunofenótipo para CD38, CD44 e Ki-67 e na terceira fase a análise por FISH para as famílias de genes de MYC, BCL2, BCL6 e imunoglobulinas (91).

Tabela 10 - Algorítmico de diagnóstico para LB

Fase	Técnica (pontuação a dar)	Pontuação cumulativa
Fase 1	<u>Morfologia</u> 3 pontos - LB típico; 2 pontos - morfologia consistente com LB mas com artefactos técnicos; 1 ponto - características sobreponíveis entre LB e LDGCB; 0 pontos - LDGCB	(Fase 1) <ul style="list-style-type: none"> <3 pontos - Não é LB 3-4 pontos - LB não pode ser excluído, passar para fase 2 5-6 pontos - 82% provável de ser LB
	<u>BCL2</u> 2 pontos - negativo; 1 ponto - fraco; 0 pontos - forte	
	<u>CD10</u> 1 ponto - positivo; 0 pontos - negativo	
Fase 2	<u>Ki-67</u> 2 pontos \geq 95%; 1 ponto - 90-95%; 0 pontos <90%	(Fase 1 + Fase 2) <ul style="list-style-type: none"> <6 pontos - Não é LB 6-7 pontos - LB não pode ser excluído, passar para fase 3 \geq8 pontos - 92% provável de ser LB
	<u>CD38</u> 1 ponto - positivo; 0 pontos - negativo	
	<u>CD44</u> 1 ponto - positivo; 0 pontos - negativo	
Fase 3	<u>FISH</u> 2 pontos - Translocações MYC-IG positivo e Translocações BCL2/BCL6 negativo; 0 pontos - Outros.	(Fase 1 + Fase 2 + Fase 3) <ul style="list-style-type: none"> 6-7 pontos - LB não pode ser excluído \geq8 pontos - 98% provável de ser LB

11. Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial do LB inclui outros tipos de LNH, tumores intra-abdominais, e tumores faciais. Entre os outros tipos de LNH destacam-se Linfoma Linfoblástico, Linfoma de Células do Manto (LCM), o LDGCB e o LB/LDGCB. (16, 22)

11.1 Tumores intra-abdominais

Nas crianças com tumores intra-abdominais as patologias mais comuns são: Tumor de Wilms e o neuroblastoma.

11.1.1 Tumor de Wilms

O tumor de Wilms, também designado de nefroblastoma, é um tumor maligno dos rins que afecta crianças entre o um e os cinco anos de idade, sendo raro em crianças com idade superior a oito anos. O modo de transmissão parece ser autossómico dominante, com variável penetração e expressividade. Ocasionalmente, o nefroblastoma tem sido associado a certas anomalias congénitas, incluindo anomalias genito-urinárias (criptorquidia, hipospádias), aniridia (ausência de uma íris) e hemihipertrofia (síndrome de Beckwith-Wiedemann). Cerca de 7% dos tumores de Wilms são bilaterais (56). Os sintomas associados mais comuns incluem dor e distensão abdominais, hematúria indolor e febre. No exame físico, o sinal mais frequente é a presença de uma massa abdominal palpável (56).

11.1.2 Neuroblastoma

O neuroblastoma é o tumor congénito mais comum e, é o tumor mais frequente durante o primeiro ano de vida. É um típico tumor pediátrico, raro após os 14 anos de idade (56). Do ponto de vista anatómico, o neuroblastoma origina-se a partir da proliferação de células do sistema neurovegetativo simpático. As localizações mais frequentes são as glândulas supra-renais (40% dos casos), e as células dos gânglios simpáticos cervicais e das regiões torácica e abdominal que, se localizam nas regiões paravertebrais. É um tumor de crescimento rápido, frequentemente diagnosticado em estádios muito avançados, com metástases disseminadas (56). Os sintomas mais frequentes incluem dor e distensão abdominais, dores ósseas localizadas, e sintomas sistémicos como anorexia, mal-estar geral, febre e diarreia. De acordo com a localização anatómica do tumor, o exame físico pode revelar hipertensão, hepatomegalia, massas e/ou equimoses da órbita, nódulos subcutâneos, massas intra-abdominais e síndrome de Horner (56).

11.1.3 Outros tumores intra-abdominais

Crianças: outros tipos de linfoma; leucemias com envolvimento extra-medular extenso; tumores hepáticos; tumores dos ovários; sarcomas (56).

Adultos: Quistos e outras neoplasias benignas; neoplasias malignas como cancro colon, recto e cancro dos ovários (56).

11.2 Tumores da face

O diagnóstico diferencial deve incluir sarcomas, carcinomas, melanoma, tumores das glândulas salivares, tumores das bainhas nervosas e entidades benignas, como paragangliomas (56).

11.3 Linfomas não Hodgkin

11.3.1 Linfoma B Linfoblástico (LBL)

O LBL é um linfoma agressivo que do ponto de vista histológico se pode assemelhar ao LB. No caso do LBL as células neoplásicas são de tamanho médio/pequeno, com escasso citoplasma basofílico, núcleo redondo, irregular ou circunvoluto, cromatina condensada e nucléolo imperceptível ou pequeno. Podem existir grânulos azurofílicos grosseiros no citoplasma. A presença de figuras mitóticas é frequente e pode existir um padrão de “céu estrelado” focal ou difuso (22). O recurso à citometria de fluxo permite a distinção entre o LB e o LBL com alto grau de certeza, no caso do LBL os linfoblastos são positivos para CD19, CD79a citoplasmático, CD22, CD10, TdT, CD34, CD24, Igμ citoplasmática (negativo para a imunoglobulina de superfície) e PAX5 (16, 22, 56).

11.3.2 Linfoma T Linfoblástico

As células são morfológicamente indistinguíveis do seu parente de linhagem B. As células de fenótipo T são TdT+, CD7+ e expressam CD3 citoplasmático ou de superfície. Variavelmente expressam CD2, CD5, CD4 e/ou CD8 (16, 22, 56).

11.3.3 Linfoma de Células do Manto (LCM)

O LCM ocorre em adultos, pelo que não deve ser considerado no diagnóstico diferencial em crianças. É composto por células linfóides de pequeno/médio tamanho com contornos nucleares irregulares, possuindo a translocação t(11;14) (q13;q32) (16, 22, 56). É um linfoma agressivo, com origem em células B periféricas da zona do manto interna,

principalmente de células naive pré-centro germinativo. A variante clássica apresenta células de pequeno/médio tamanho, com um núcleo irregular, cromatina moderadamente dispersa, nucléolo visível mas não proeminente e citoplasma pálido e escasso (22). A variante blastóide apresenta células semelhantes a linfoblastos com cromatina dispersa e um elevado índice mitótico, podendo, por vezes, visualizarem-se alguns histiócitos epitelióides dispersos, originando um aspecto de *céu estrelado* (22). A variante blastóide deste tipo de linfoma deve ser considerada no diagnóstico diferencial do LB (22, 56).

As células têm elevada expressão de IgM/IgD de superfície e são positivas para FMC7, CD19, CD20 e CD5 (LB é CD5-), podendo em casos raros serem CD5- ou expressarem CD23. A expressão de CD10 é negativa, ao contrário do LB (16, 22). A característica genética determinante deste tipo de neoplasia é a translocação t(11;14)(q13;q32), a qual provoca a hiperexpressão de BCL-1 (ou ciclina D1) pela justaposição do gene BCL-1 no cromossoma 11 com promotores dos genes na cadeia pesada das imunoglobulinas no cromossoma 14. 95% dos casos coram positivamente para a presença de ciclina D1 nuclear (16, 22, 56).

11.3.4 Linfoma difuso de grandes células B

O LDGCB constitui o tipo mais comum de LNH, representando 33% dos casos nos EUA (17). É composto por células B provenientes do centro germinativo ou de uma fase posterior a este, com pelo menos o dobro do tamanho de um linfócito e com um padrão de crescimento difuso. Habitualmente a arquitectura dos gânglios linfáticos encontra-se completamente destruída pela proliferação, “em toalha”, de grandes células atípicas, sendo frequente a presença de bandas finas de esclerose. Em casos raros, a arquitectura pode estar parcialmente alterada, afectando apenas a área interfolicular ou, menos comumente, a zona sinusoidal (16, 22).

O LDGCB encontra-se dividido em três variantes morfológicas, a variante centroblastica, a variante imunoblástica e a variante anaplásica. Na variante centroblastica há um predomínio de centroblastos, células de médio/grande tamanho, com um núcleo oval/redondo (pode ser multilobulado), cromatina vesiculosa, 2 a 4 nucléolos juntos à membrana nuclear e citoplasma escasso, sendo que alguns imunoblastos podem estar presentes. Na variante imunoblástica há um predomínio de imunoblastos (>90%), são células com um nucléolo único, central e proeminente, e com uma maior quantidade de citoplasma. Algumas das células da variante imunoblástica podem adquirir características plasmocitóides, com um núcleo mais excêntrico e um citoplasma mais eosinofílico. Alguns autores denominam esta variante de “plasmacitóide”. A variante anaplásica é constituída por células grandes ou mesmo muito grandes, um núcleo muito pleomórfico, por vezes coesivas e/ou com um crescimento sinusoidal, podendo assemelhar-se a um carcinoma indiferenciado. Qualquer das variantes descrita pode conter um número variável de histiócitos e/ou linfócitos T (22).

Na maior parte dos casos é fácil a diferenciação entre o LB e o LDGCB, contudo alguns casos de LB apresentam células de maior tamanho com características mistas entre centroblastos e imunoblastos, e com morfologia sobreposta às duas entidades. Em crianças e doentes VIH+, estes casos *borderline* normalmente apresentam translocações c-MYC e comportam-se como LB. Em adultos e doentes VIH- estes linfomas *borderline* tendem a apresentar rearranjos nos genes c-MYC e BCL2 (linfomas “double-hit”) e presume-se que sejam variantes mais agressivas de LDGCB. Alguns destes linfomas são classificados como LB/LDGCB (10).

O LDGCB expressa marcadores de células pan-B (CD19, CD20, CD22, CD79a e PAX5) e a imunoglobulina de superfície e/ou citoplasmática é positiva em 50-75% dos casos (IgM>IgG>IgA). Outros marcadores normalmente presentes são CD10 (40%), CD43 (20%), CD5 (10%), CD30 (10%), IRF4/MUM1 (40%) e p53 (30%). A fracção Ki67 varia entre 30-90% (22, 23).

A proteína BCL-2 pode ser expressa em 75% dos casos, algo que se deve a fenómenos de amplificação do gene BCL-2 (presentes até 30% dos casos), geralmente independentes da translocação t(14;18), IgH/BCL2. A t(14;18) encontra-se presente em 30% dos doentes. Em 25%-30% dos casos verificam-se rearranjos do gene BCL-6 (3q27) (22, 23). A análise das translocações Myc, Bcl2 e Bcl6 é útil no diagnóstico diferencial do LB com LDGCB ou LB/LDGCB. A presença de translocações envolvendo Bcl2 ou Bcl6 exclui o diagnóstico do LB (22).

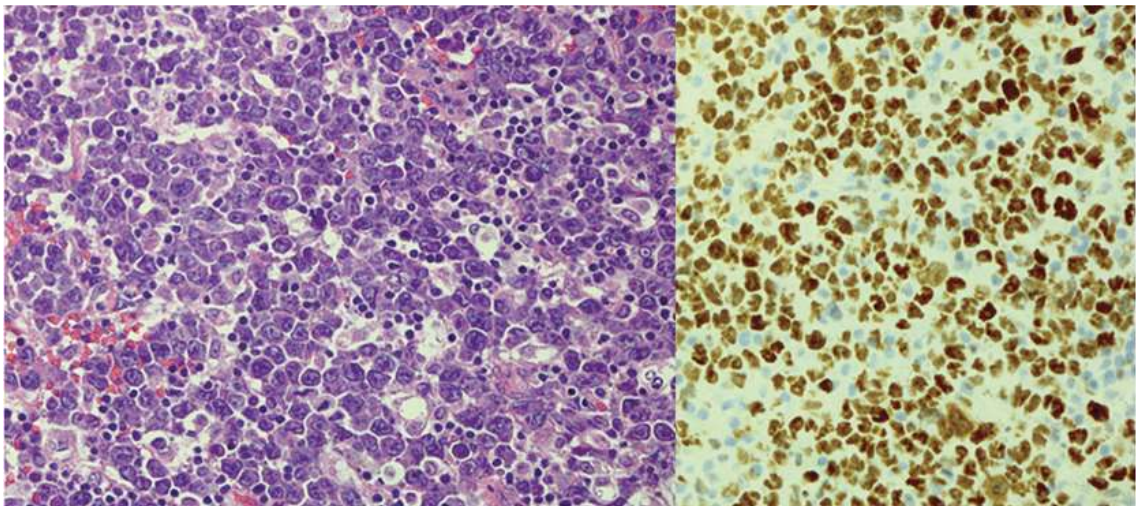


Figura 16 - Linfoma difuso de grandes células B. À esquerda, LDGCB com células de grande tamanho com um ou mais nucléolos e com infiltrado de pequenos linfócitos e histiocitos (H&E 400x). À direita, o mesmo linfoma com coloração de imunoperoxidase para a proteína Myc. Imagem original de Jonathan W. Said, reproduzida com autorização (23).

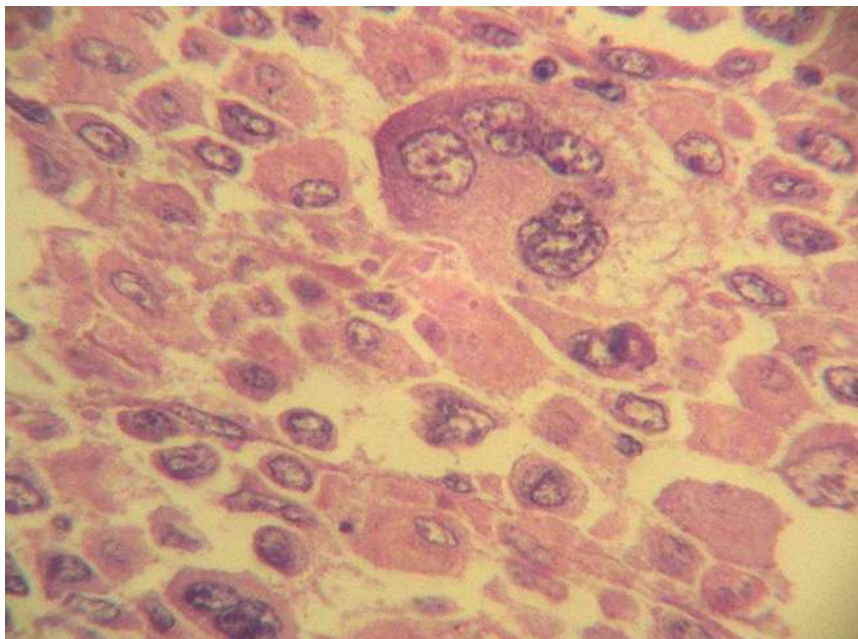


Figura 17 - Linfoma difuso de grandes células B. (x400, H&E). São visíveis núcleos irregulares, figuras mitóticas e células gigantes multinucleadas. Imagem cedida por Moreno, J. Muñoz.

11.3.5 Linfoma de células B inclassificável, com características intermediárias entre o LDGCB e o LB (LB/LDGCB)

O actual sistema de classificação da OMS, 4.^a edição (2008), apresenta alterações relativamente à edição anterior edição. A revisão dos critérios de classificação inclui novas entidades definitivas e novas entidades provisórias (entidades que não têm uma definição clara no momento actual). Uma dessas entidades provisórias é o LB/LDGCB. Este grupo envolve uma miscelânea de linfomas com características morfológicas e genéticas de LB e de LDGCB, mas que não cumprem os critérios de diagnóstico para nenhuma das entidades.

Os linfomas deste grupo apresentam uma morfologia variável, normalmente com um padrão de proliferação difuso, células linfóides de médio/grande tamanho e com uma alta taxa de proliferação (80-100%). Alguns casos assemelham-se a LB mas apresentam um fenótipo atípico, forte expressão de BCL2, ou um cariotipo complexo com translocações de MYC e Bcl2 entre outras. Outros casos assemelham-se a LDGCB com morfologia centroblastica e com translocações “double-hit” ou “triple-hit” envolvendo os genes Bcl2, Myc e Bcl6 (23). Em 60% dos casos a translocação Myc/IgH t(8,14) está presente, e em 40% dos casos há uma outra translocação associada a Myc (23).

O LB/LDGCB é positivo para os marcadores de células pan-B, embora a expressão de CD20 e das cadeias leves de imunoglobulinas possa estar diminuída. As células neoplásicas exibem também marcadores de origem no centro germinativo, CD10+, BCL6+, IRF4/MUM1-.

Diferente do LB, a maioria é Bcl2+. A expressão de Myc é elevada, mesmo na ausência de translocações do gene o que pode estar relacionado com fenómenos de amplificação genética ou cópias extra do gene (23).

Estes linfomas tendem a aparecer em adultos mais velhos, com doença em estadios avançado (III ou IV) e com linfadenopatia generalizada. São linfomas bastante agressivos, com má resposta à quimioterapia e de mau prognóstico (23).

A categoria LB/LDGCB não é válida para os casos de LB com morfologia histológica atípica, nem para casos de LDGCB com fracção de crescimento elevada, padrão *céu estrelado*, e presença de translocações Myc.

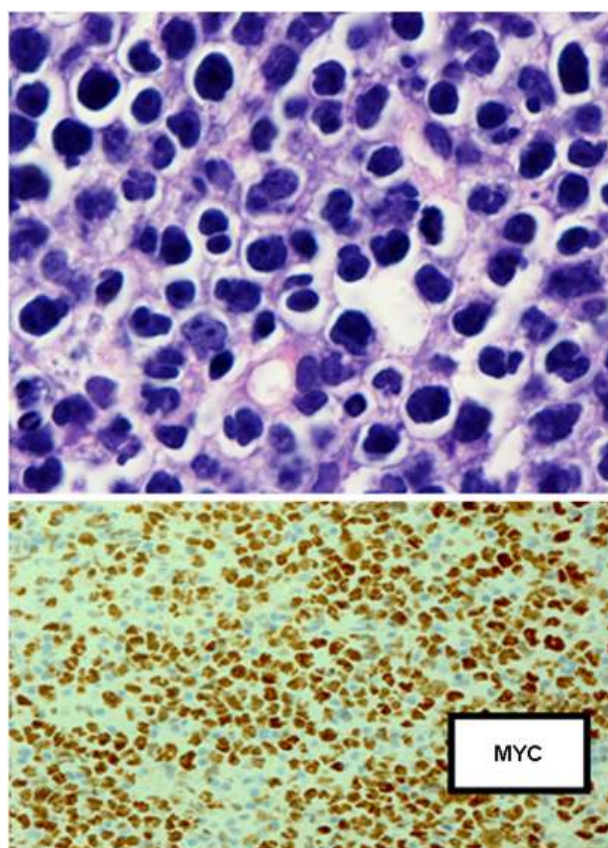


Figura 18 - Linfoma de células B inclassificável, com características intermediárias entre o LDGCB e o LB. Em cima, LB/LDGCB com padrão de proliferação difuso, com células linfóides de tamanho médio a grande, com pequenos nucléolos e um ligeiro infiltrado de pequenos linfócitos e histiocitos (H&E 400x). Em baixo, o mesmo linfoma com coloração de imunoperoxidase para a proteína Myc (240x).

Imagem original de Jonathan W. Said, reproduzida com autorização (23).

12. Conclusão

O Linfoma de Burkitt é um LNH muito agressivo, apresentando três variantes clínicas: endêmica, esporádica e a associada à imunodeficiência. Histologicamente as três variantes são similares, porém do ponto de vista clínico e epidemiológico as diferenças são mais marcadas. O LBe é mais frequente na região da África equatorial (35), surge em crianças entre os 4 e 7 anos, normalmente como um tumor da face ou abdominal, e exibe uma forte relação com a infecção por *P. falciparum* (14). O LBs está associado aos casos de LB nos EUA e na Europa, surge em crianças mais velhas e adultos (13), normalmente, como um tumor abdominal. O LBi surge, principalmente, em doentes VIH+ com contagens de linfócitos T CD4+ elevadas, sendo raro com contagens baixas de linfócitos (12, 13).

Histologicamente, o LB exibe um padrão em *céu estrelado*, com células neoplásicas de tamanho médio (12 μ), macrófagos dispersos pela lâmina e um índice de proliferação celular elevado (Ki67>95%) (9). As células neoplásicas apresentam uma origem a partir de linfócitos B maduros e de células do centro germinativo (22).

A característica genética mais relevante do LB é a hiperexpressão do gene c-myc que promove a expressão de genes envolvidos no crescimento celular e divisão celular. A sua desregulação normalmente ocorre como resultado duma translocação entre o gene Myc e uma das cadeias pesadas ou leves de imunoglobulina (t(8;14), t(2;8), t(8;22)). Para além de c-Myc, estão também descritas mutações envolvendo as proteínas p53, p14^{ARF}, BIM, PUMA e a via PI3K/AKT/mTOR. (10) Em 5%-10% dos LB não ocorrem rearranjos no gene c-mYC (30).

O VEB parece ter um papel importante no desenvolvimento do LB. *In vitro*, o VEB promove nos linfócitos infectados o crescimento e divisão celular, aumentando a probabilidade de ocorrência de translocações cromossómicas (61). Contudo, *in vivo*, a expressão do padrão de Latência I, deixa várias dúvidas sobre o mecanismo oncogénico do VEB no LB. O estado imunitário do doente parece influenciar o potencial oncogénico do VEB no LB (61, 62).

A infecção pelo *P. falciparum* também desempenha um papel na oncogénese do LB. A sequência de eventos que envolvem as repetidas infecções por *P. falciparum* parece afectar a homeostase das células B infectadas pelo VEB, com o conseqüente aumento dos títulos virais do VEB (51, 52) e expansão do número de Linfócitos B latentes, resistentes a estímulos apoptóticos (54). A conjugação destes factores, associados ao comprometimento da imunidade mediada por células T CD8+ (49), parece ser o mecanismo pelo qual a infecção por *P. falciparum* aumenta o risco de LBe.

Relativamente ao papel da infecção por VIH no LBi, este é muito pouco compreendido. Sabe-se apenas que o risco de LB em indivíduos VIH+ é maior com contagens de linfócitos CD4+ altas (>200 células/ μ L) (12, 13), e que neste indivíduos existe uma alta expressão da enzima AID em células monoclonais do sangue periférico, 8 anos antes do desenvolvimento de LB (10, 13).

O LB é a neoplasia maligna que apresenta crescimento celular mais rápido (7). Os doentes com LB apresentam, frequentemente, múltiplas massas tumorais, ganglionares ou extra-ganglionares (7), níveis plasmáticos de LDH e de ácido úrico elevados e sinais e sintomas de SLT. Os *Sintomas-B*, menos frequentes, também podem estar presentes, assim como outros sintomas resultantes do envolvimento local do linfoma (71).

Para o diagnóstico do LB a biopsia excisional é preferível à BAAF. O diagnóstico deve ser feito por análise histológica, por análise imunocitoquímica (citometria de fluxo) e em condições ideais deve-se proceder à detecção das translocações de c-myc, por recurso a FISH (89). O estadiamento do LB pode ser realizado com recurso ao sistema de classificação Ann Arbor, em adultos, ou ao sistema St. Jude/Murphy, em crianças (7, 16, 45). Aproximadamente 30% dos doentes com LB apresentam doença em estadio I ou II e 70% apresentam doença disseminada, estadio III ou IV (St.Jude/Murphy) (16). O diagnóstico diferencial do LB faz-se, principalmente, com outros LNH, como o LDGCB, LB/LDGCB, o linfoma linfoblástico B e T e o LCM.

Muito há ainda a compreender sobre a patofisiologia do LB. Apesar de ser uma patologia pouco comum na Europa, a melhor compreensão sobre os mecanismos envolvidos na sua génese, não só permitirá uma abordagem terapêutica mais efectiva, melhorando o prognóstico dos doentes, como também contribuirá para compreender os mecanismos patofisiológicos de outras neoplasias que partilham com o LB características em comum (e.g. hiperexpressão de c-Myc, infecção pelo VEB, VIH e *P. falciparum*).

Referências Bibliográficas

1. Davies JN, Elmes S, Hutt MS, Mtimavalye LA, Owor R, Shaper L. Cancer in an African Community, 1897-1956. An Analysis of the Records of Mengo Hospital, Kampala, Uganda. *British medical journal*. 1964;1(5379):336-41.
2. Magrath I. Denis Burkitt and the African lymphoma. *Ecancermedicalsecience*. 2009;3:159.
3. Biography of Denis Burkitt [Internet]. Trinity College Dublin; 2011 [updated 2011 Maio 23; cited 2013 Dez 22]. Available from: <http://www.medicine.tcd.ie/tercentenary/news-events/burkitt-biography.php>.
4. Burkitt D. A sarcoma involving the jaws in African children. *British Journal of Surgery*. 1958;46(197):218-23.
5. O'Connor GT, Davies JN. Malignant tumors in African children. With special reference to malignant lymphoma. *The Journal of pediatrics*. 1960;56:526-35.
6. Blum KA, Lozanski G, Byrd JC. Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood*. 2004;104(10):3009-20.
7. Afanas N, Carvalho M, Almeida M, Costa V, Silva I, Oliva T. Linfoma de Burkitt. *Acta Médica Portuguesa*. 2011;24(5).
8. Zech L, Haglund U, Nilsson K, Klein G. Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *International journal of cancer*. 1976;17(1):47-56.
9. Hecht JL, Aster JC. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *Journal of clinical oncology*. 2000;18(21):3707-21.
10. Robertson ES. *Burkitt's Lymphoma*: New York: Springer; 2013.
11. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet*. 1964;1(7335):702-3.
12. Smith SM. AIDS-related BL and CD4 count: a clue? *Blood*. 2010;116(25):5435-6.
13. Guech-Ongey M, Simard EP, Anderson WF, Engels EA, Bhatia K, Devesa SS, et al. AIDS-related Burkitt lymphoma in the United States: what do age and CD4 lymphocyte patterns tell us about etiology and/or biology? *Blood*. 2010;116(25):5600-4.

14. Orem J, Mbidde EK, Lambert B, de Sanjose S, Weiderpass E. Burkitt's lymphoma in Africa, a review of the epidemiology and etiology. *African health sciences*. 2007;7(3).
15. Orem J, Mulumba Y, Algeri S, Bellocco R, Mangan FW, Mbidde EK, et al. Clinical characteristics, treatment and outcome of childhood Burkitt's lymphoma at the Uganda Cancer Institute. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2011;105(12):717-26.
16. Ferry JA. Burkitt's lymphoma: clinicopathologic features and differential diagnosis. *The oncologist*. 2006;11(4):375-83.
17. Longo D, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Jameson J, Loscalzo J. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 18th Edition: McGraw-Hill Education; 2011.
18. Queiroga EMD. Linfoma de Burkitt: características clinicopatológicas, imunoistoquímicas e associação com o vírus de Epstein-Barr (EBV) em populações adulta e pediátrica em diferentes regiões geográficas no Brasil [Tese de Doutorado]. S. Paulo: Universidade de S. Paulo; 2009.
19. Perkins AS, Friedberg JW. Burkitt lymphoma in adults. *ASH Education Program Book*. 2008;2008(1):341-8.
20. Agostinho CSF. Estudo imunohistoquímico do Ki-67 em adenocarcinomas do cólon: Correlação entre a expressão do Ki-67 e a diferenciação tumoral [Tese de Mestrado]. Covilhã: Universidade da Beira Interior; 2010.
21. Janbabai G, Kayedimajid S, Alian S, Naghshvar F, Rashidi M, Farazmandfar T. Bilateral breast swelling in a 23-year-old woman with Burkitt lymphoma. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 2012;17(12):1188.
22. Andrade CJDS. Linfomas: síntese anátomo-clínica [Tese de Mestrado]. Coimbra: Universidade de Coimbra; 2009.
23. Said JW. Aggressive B-cell lymphomas: how many categories do we need? *Modern Pathology*. 2013;26:S42-S56.
24. Novocastra™ Primary Antibodies [Internet]. Leica Biosystems; 2014 [cited 2014 Feb 02]. Available from: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/novocastra-reagents/primary-antibodies/>.
25. Hasserjian RP, Ott G, Elenitoba-Johnson KSJ, Balague-Ponz O, Jong Dd, Leval Ld. Commentary on the WHO classification of tumors of lymphoid tissues (2008): "Gray zone"

- lymphomas overlapping with Burkitt lymphoma or classical Hodgkin lymphoma. *Journal of Hematopathology* 2009;2(2):89-95.
26. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011;117(19):5019-32.
 27. Bell A, Rickinson A. Epstein-Barr virus, the TCL-1 oncogene and Burkitt's lymphoma. *Trends in microbiology*. 2003;11(11):495.
 28. Kelly GL, Rickinson AB. Burkitt lymphoma: revisiting the pathogenesis of a virus-associated malignancy. *ASH Education Program Book*. 2007;2007(1):277-84.
 29. Robbiani DF, Bothmer A, Callen E, Reina-San-Martin B, Dorsett Y, Difilippantonio S, et al. AID is required for the chromosomal breaks in c-myc that lead to c-myc/IgH translocations. *Cell*. 2008;135(6):1028-38.
 30. Leucci E, Cocco M, Onnis A, De Falco G, Van Cleef P, Bellan C, et al. MYC translocation-negative classical Burkitt lymphoma cases: an alternative pathogenetic mechanism involving miRNA deregulation. *The Journal of pathology*. 2008;216(4):440-50.
 31. Dave SS, Fu K, Wright GW, Lam LT, Kluin P, Boerma E-J, et al. Molecular Diagnosis of Burkitt's Lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(23):2431-42.
 32. Hummel M, Bentink S, Berger H, Klapper W, Wessendorf S, Barth TF, et al. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(23):2419-30.
 33. Piccaluga PP, De Falco G, Kustagi M, Gazzola A, Agostinelli C, Tripodo C, et al. Gene expression analysis uncovers similarity and differences among Burkitt lymphoma subtypes. *Blood*. 2011;117(13):3596-608.
 34. Ambrosio MR, Piccaluga PP, Ponzoni M, Rocca BJ, Malagnino V, Onorati M, et al. The alteration of lipid metabolism in Burkitt lymphoma identifies a novel marker: adipophilin. *PLoS one*. 2012;7(8):e44315.
 35. Burkitt D. Determining the climatic limitations of a children's cancer common in Africa. *British medical journal*. 1962;2(5311):1019.
 36. Distribution of Endemic Malaria [Internet]. MARA/ARMA; 2001 [cited 2014 Abr 10]. Available from: <http://www.mara.org.za/>.

37. Dalldorf G, Linsell C, Barnhart F, Martyn R. An Epidemiologic Approach to the Lymphomas of African Children and Burkitt's Sacroma of the Jaws. *Perspectives in biology and medicine*. 1964;7:435.
38. Goma L. The Environmental Background to Cases of Bukitt's Lymphoma Syndrome in Uganda. *East African medical journal*. 1965;42:62.
39. Molyneux EM, Rochford R, Griffin B, Newton R, Jackson G, Menon G, et al. Burkitt's lymphoma. *The Lancet*. 2012;379(9822):1234-44.
40. Baik S, Mbaziira M, Williams M, Ogwang MD, Kinyera T, Emmanuel B, et al. A case-control study of Burkitt lymphoma in East Africa: are local health facilities an appropriate source of representative controls? *Infectious agents and cancer*. 2012;7(1):1-7.
41. Biko DM, Anupindi SA, Hernandez A, Kersun L, Bellah R. Childhood Burkitt lymphoma: abdominal and pelvic imaging findings. *American Journal of Roentgenology*. 2009;192(5):1304-15.
42. Thieringer F, Sartorius G, Kalf K, Heinzelmann V, Vetter M. Bilateral Breast Masses with a Rare Etiology. *Case reports in oncological medicine*. 2013;2013.
43. Mwanda OW. Aspects of epidemiological and clinical features of patients with central nervous system Burkitt's lymphoma in Kenya. *East African medical journal*. 2004(8 Suppl):S97-103.
44. Khanna M, SR. B. Primary Burkitt's Lymphoma Of The Appendix Presenting As Acute Abdomen: A Case Report. *Gastrointestinal Radiol*. 2008;2(5):9-14.
45. Snow RW, Omumbo JA, Lowe B, Molyneux CS, Obiero J-O, Palmer A, et al. Relation between severe malaria morbidity in children and level of Plasmodium falciparum transmission in Africa. *The Lancet*. 1997;349(9066):1650-4.
46. Moormann AM, Chelimo K, Sumba PO, Tisch DJ, Rochford R, Kazura JW. Exposure to holoendemic malaria results in suppression of Epstein-Barr virus-specific T cell immunosurveillance in Kenyan children. *Journal of Infectious Diseases*. 2007;195(6):799-808.
47. Weiss GE, Crompton PD, Li S, Walsh LA, Moir S, Traore B, et al. Atypical memory B cells are greatly expanded in individuals living in a malaria-endemic area. *The Journal of Immunology*. 2009;183(3):2176-82.
48. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol100B. Lyon, France: IARC Press; 2012. p. 49-80.

49. Piriou E, Asito AS, Sumba PO, Fiore N, Middeldorp JM, Moormann AM, et al. Early age at time of primary Epstein-Barr Virus infection results in poorly controlled viral infection in infants from Western Kenya: clues to the Etiology of Endemic Burkitt Lymphoma. *Journal of Infectious Diseases*. 2012;205(6):906-13.
50. Njie R, Bell AI, Jia H, Croom-Carter D, Chaganti S, Hislop AD, et al. The effects of acute malaria on Epstein-Barr virus (EBV) load and EBV-specific T cell immunity in Gambian children. *Journal of Infectious Diseases*. 2009;199(1):31-8.
51. Donati D, Zhang LP, Chen Q, Chêne A, Flick K, Nyström M, et al. Identification of a polyclonal B-cell activator in *Plasmodium falciparum*. *Infection and immunity*. 2004;72(9):5412-8.
52. Peng SL. Signaling in B cells via Toll-like receptors. *Current opinion in immunology*. 2005;17(3):230-6.
53. Pone EJ, Xu Z, White CA, Zan H, Casali P. B cell TLRs and induction of immunoglobulin class-switch DNA recombination. *Frontiers in bioscience*. 2012;17:2594-615.
54. Rowe M, Kelly GL, Bell AI, Rickinson AB, editors. *Burkitt's lymphoma: the Rosetta Stone deciphering Epstein-Barr virus biology*. Seminars in cancer biology; 2009: Elsevier.
55. Magrath I. Epidemiology: clues to the pathogenesis of Burkitt lymphoma. *British journal of haematology*. 2012;156(6):744-56.
56. Freedman AS, Aster JC. Epidemiology, clinical manifestations, pathologic features, and diagnosis of Burkitt lymphoma [Internet]. UpToDate; 2014 [updated 2014 Mar 24; cited 2014 Abr 06]. Available from: <http://www.uptodate.com/contents/epidemiology-clinical-manifestations-pathologic-features-and-diagnosis-of-burkitt-lymphoma>.
57. Zia M. AIDS-Related Lymphomas [Internet]. Medscape; 2014 [updated 2014 Mar 20; cited 2014 Abr 10]. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/1389907-overview>.
58. Carbone A, Cesarman E, Spina M, Gloghini A, Schulz TF. HIV-associated lymphomas and gamma-herpesviruses. *Blood*. 2009;113(6):1213-24.
59. Petrich AM, Sparano JA, Parekh S. Paradigms and Controversies in the Treatment of HIV-Related Burkitt Lymphoma. *Advances in hematology*. 2012;2012.
60. Sousa JC, Ferreira WC. *Microbiologia*. 3. 1 ed: Lisboa: Lidel; 2002.
61. Thorley-Lawson DA. EBV the prototypical human tumor virus—just how bad is it? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005;116(2):251-61.

62. Allday MJ, editor How does Epstein-Barr virus (EBV) complement the activation of Myc in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma? *Seminars in cancer biology*; 2009: Elsevier.
63. Bornkamm GW. Epstein-Barr virus and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: More questions than answers. *International Journal of Cancer*. 2009;124(8):1745-55.
64. Biegging KT, Swanson-Mungerson M, Amick AC, Longnecker R. Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma: a role for latent membrane protein 2A. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2010;9(5):901.
65. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. *Robbins Basic Pathology*. 8 ed: Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007.
66. Spender LC, Inman GJ. Developments in Burkitt's lymphoma: novel cooperations in oncogenic MYC signaling. *Cancer management and research*. 2014;6(27):27-38.
67. Ministry of Health and Social Welfare. *Burkitt's lymphoma national treatment guidelines*. Tanzania: Ocean Road Cancer Institute; 2009.
68. Ryan K, Birnie G. Myc oncogenes: the enigmatic family. *Biochem J*. 1996;314:713-21.
69. Di Lisio L, Sanchez-Beato M, Gómez-López G, Rodríguez M, Montes-Moreno S, Mollejo M, et al. MicroRNA signatures in B-cell lymphomas. *Blood cancer journal*. 2012;2(2):e57.
70. Onnis A, De Falco G, Antonicelli G, Onorati M, Bellan C, Sherman O, et al. Alteration of microRNAs regulated by c-Myc in Burkitt lymphoma. *PloS one*. 2010;5(9):e12960.
71. San Miguel JF, Sánchez-Guijo FM. *Hematología: Manual básico razonado*. 3 ed: Barcelona: Elsevier España, S.L.; 2009.
72. Kanbar AH. Burkitt Lymphoma and Burkitt-like Lymphoma [Internet]. *Medscape*; 2010 [updated 2014 Mar 31; cited 2014 Abr 10]. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/1447602-overview>.
73. Carmody J, Misra RP, Langford MP, Byrd WA, Ditta L, Vekovius B, et al. Orbital sporadic Burkitt lymphoma in an adult diabetic African American female and a review of adult orbital cases. *Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)*. 2011;5:509.
74. Lee DH, Yu MS, Lee B-J. Primary Burkitt's Lymphoma in the Nasal Cavity and Paranasal Sinuses. *Clinical and experimental otorhinolaryngology*. 2013;6(3):184-6.
75. Aderele W, Seriki O, Osunkoya B. Pleural effusion in Burkitt's lymphoma. *British journal of cancer*. 1975;32(6):745.

76. Kaul P, Javangula K. Burkitt lymphoma masquerading as cardiac tamponade. *Journal of cardiothoracic surgery*. 2007;2(1):30.
77. Manganaro L, Bernardo S, Sergi ME, Sollazzo P, Vinci V, De Grazia A, et al. Burkitt's Lymphoma Presented as Advanced Ovarian Cancer without Evidence of Lymphadenopathy: CT and MRI Findings. *Case Reports in Radiology*. 2013;2013:5.
78. Hoxha F, Hashani S, Krasniqi A, Kurshumliu F, Komoni D, Hasimja S, et al. Intussusceptions as acute abdomen caused by Burkitt lymphoma: a case report. *Cases Journal*. 2009;2(1):9322.
79. Bălănescu N, Topor L, Malureanu D, Stoica I. Ileocolic intussusception due to Burkitt lymphoma: a case report. *Journal of medicine and life*. 2013;6(1):61.
80. Naik S, Tayapongsak K, Robbins K, Manavi CK, Pettenati MJ, Grier DD. Burkitt's Lymphoma Presenting as Late-Onset Posttransplant Lymphoproliferative Disorder following Kidney and Pancreas Transplantation: Case Report and Review of the Literature. *Case reports in oncology*. 2013;6(1):6-14.
81. Ji. D. Pattern of Organ Involvement in Burkitt's Lymphoma in Ibadan: A Review. *Journal of the National Medical Association*. 1977;69(5):319-23.
82. Ziade F, von der Weid N, Beck-Popovic M, Nydegger A. Burkitt's lymphoma-an atypical presentation. *BMC pediatrics*. 2012;12(1):113.
83. Bianchi P, Torcia F, Vitali M, Cozza G, Matteoli M, Giovanale V. An atypical presentation of sporadic ovarian Burkitt's lymphoma: case report and review of the literature. *Journal of ovarian research*. 2013;6(1):46.
84. Baumgaertner I, Copie-Bergman C, Levy M, Haioun C, Charachon A, Baia M, et al. Complete remission of gastric Burkitt's lymphoma after eradication of *Helicobacter pylori*. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2009;15(45):5746.
85. Müller G, Dargent J, Duwel V, D'olne D, Vanvuchelen J, Haot J, et al. Leukaemia and lymphoma of the appendix presenting as acute appendicitis or acute abdomen. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 1997;123(10):560-4.
86. Ziegler JL, Bluming AZ, Morrow RH, Fass L, Carbone PP. Central nervous system involvement in Burkitt's lymphoma. *Blood*. 1970;36(6):718-28.
87. Wilkening A, Brack M, Brandis A, Heidenreich F, Dengler R, Weißenborn K. Unusual presentation of a primary spinal Burkitt's lymphoma. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2001;70(6):794-7.

88. Larson RA, Pui C-H. Tumor lysis syndrome: Definition, pathogenesis, clinical manifestations, etiology and risk factors [Internet]. UpToDate; 2014 [updated 2013 Abr 18; cited 2014 Abr 10]. Available from: <http://www.uptodate.com/contents/tumor-lysis-syndrome-definition-pathogenesis-clinical-manifestations-etiology-and-risk-factors>.
89. Aka P, Kawira E, Masalu N, Emmanuel B, Brubaker G, Magatti J, et al. Incidence and trends in Burkitt lymphoma in northern Tanzania from 2000 to 2009. *Pediatric blood & cancer*. 2012;59(7):1234-8.
90. Soldini D, Montagna C, Schüffler P, Martin V, Georgis A, Thiesler T, et al. A new diagnostic algorithm for Burkitt and diffuse large B-cell lymphomas based on the expression of CSE1L and STAT3 and on MYC rearrangement predicts outcome. *Annals of oncology*. 2013;24(1):193-201.
91. Naresh KN, Ibrahim HAH, Lazzi S, Rince P, Onorati M, Ambrosio MR, et al. Diagnosis of Burkitt lymphoma using an algorithmic approach - applicable in both resource-poor and resource-rich countries. *British Journal of Haematology*. 2011;154(6):770-6.

Anexos

1204/14

Rightlink Printable License

AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Apr 12, 2014

This is a License Agreement between Valter Rocha ("You") and American Society of Clinical Oncology ("American Society of Clinical Oncology") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by American Society of Clinical Oncology, 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	3304430134354
License date	Jan 08, 2014
Licensed content publisher	American Society of Clinical Oncology
Licensed content publication	The Journal of Clinical Oncology
Licensed content title	Molecular Biology of Burkitt's Lymphoma
Licensed content author	Jonathan L. Hecht, Jon C. Aster
Licensed content date	Nov 1, 2000
Type of Use	Dissertation/Thesis
Geographic Rights	Worldwide
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Portuguese
Title of your thesis / dissertation	Burkitt Lymphoma (etiology, epidemiology, clinic)
Expected completion date	Apr 2014
Estimated size(pages)	50
Customer Tax ID	230831044
Billing Type	Invoice
Billing address	
	Portugal
Total	0,00 EUR
Terms and Conditions	

General Terms & Conditions

Permission is granted upon the requester's compliance with the following terms and conditions:

1. A creditline will be prominently placed in your product(s) and include: for books-the author,

<https://www.copyright.com/CustomerAdmin/PLF.jsp?ref=bd95d58-54b1-46db-be47-a332b999cb>

1/2

170414

Rightslink Printable License

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Apr 17, 2014

This is a License Agreement between Valter Rocha ("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	3371450933505
License date	Apr 17, 2014
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Modern Pathology
Licensed content title	Aggressive B-cell lymphomas: how many categories do we need[quest]
Licensed content author	Jonathan W Said
Licensed content date	Nov 16, 2012
Volume number	26
Issue number	S1
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	5
High-res required	no
Figures	Figure 1. Figure 11. Figure 12. Table 3.
Author of this NPG article	no
Your reference number	
Title of your thesis / dissertation	Burkitt Lymphoma (etiology, epidemiology, clinic)
Expected completion date	Apr 2014
Estimated size (number of pages)	50
Customer Tax ID	230831044
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions for Permissions

<https://us100.copyright.com/AppDispatchServlet>

1/3

130414

Rightlink Printable License

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Apr 12, 2014

This is a License Agreement between Valter Rocha ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, 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.

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Valter Rocha
Customer address	
License number	3303170613613
License date	Jan 06, 2014
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Seminars in Cancer Biology
Licensed content title	Burkitt's lymphoma: The Rosetta Stone deciphering Epstein-Barr virus biology
Licensed content author	Martin Rowe, Gemma L. Kelly, Andrew I. Bell, Alan B. Rickinson
Licensed content date	December 2009
Licensed content volume number	19
Licensed content issue number	6
Number of pages	12
Start Page	377
End Page	388
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Portuguese
Title of your thesis/dissertation	Burkitt Lymphoma (etiology, epidemiology, clinic)

<https://s100.copyright.com/CustomersAdmin/PLF.jsp?ref=20858670-1374-4683-a2db-3beac86d79>

15

140414

Rightslink Printable License

**BMJ PUBLISHING GROUP LTD. LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Apr 14, 2014

This is a License Agreement between Valter Rocha ("You") and BMJ Publishing Group Ltd. ("BMJ Publishing Group Ltd.") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by BMJ Publishing Group Ltd., 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	3367690196734
License date	Apr 14, 2014
Licensed content publisher	BMJ Publishing Group Ltd.
Licensed content publication	The BMJ
Licensed content title	Determining the Climatic Limitations of a Children's Cancer Common in Africa
Licensed content author	Denis Burkitt
Licensed content date	Jan 1, 1962
Volume number	2
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	Individual
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table/extract
Number of figure/table/extracts	1
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Portuguese
Circulation/distribution	4
Title of your thesis / dissertation	Burkitt Lymphoma (etiology, epidemiology, clinic)
Expected completion date	Apr 2014
Estimated size(pages)	50
Customer Tax ID	230831044
BMJ VAT number	674738491
Billing Type	Invoice
Billing address	
	Portugal
Permissions Cost	0.00 EUR

<https://ic100.copyright.com/AppDispatchServlet>

15

19/04/14

Rightslink Printable License

**JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Apr 17, 2014

This is a License Agreement between Valter Rocha ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by John Wiley and Sons, 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	3371650190780
License date	Apr 17, 2014
Licensed content publisher	John Wiley and Sons
Licensed content publication	British Journal of Haematology
Licensed content title	Epidemiology: dues to the pathogenesis of Burkitt lymphoma
Licensed copyright line	© 2012 Blackwell Publishing Ltd
Licensed content author	Ian Magrath
Licensed content date	Jan 20, 2012
Start page	744
End page	756
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Original Wiley figure/table number(s)	Figure 3.
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of languages	1
Languages	Portuguese
Title of your thesis / dissertation	Burkitt Lymphoma (etiology, epidemiology, clinic)
Expected completion date	Apr 2014
Expected size (number of pages)	50
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

Terms and Conditions are not available at this time.

If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 48 hours of the license date. Payment should be in the form of a check or

<https://s100.copyright.com/AppDispatchServlet>

1/2

1306/14


Rightslink Printable License

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Apr 12, 2014

This is a License Agreement between Valter Rocha ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, 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.

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Valter Rocha
Customer address	
License number	3304431014753
License date	Jan 08, 2014
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Seminars in Cancer Biology
Licensed content title	How does Epstein-Barr virus (EBV) complement the activation of Myc in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma?
Licensed content author	Martin J. Allday
Licensed content date	December 2009
Licensed content volume number	19
Licensed content issue number	6
Number of pages	11
Start Page	366
End Page	376
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Portuguese

<https://s100.copyright.com/CustomerAdmin/PLF.jsp?ref=95271c50-3b53-42d3-a71e-d1e46489c5>

15