



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

THIAGO EUGÊNIO GOUVEIA HERBST

**Sarcoma Histiocítico: análise molecular pela técnica de
Hibridação Genômica Comparativa, MicroRNA e
Imunoistoquímica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título
de Mestre no programa de Pós-graduação em
Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues

**Botucatu
2015**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

THIAGO EUGÊNIO GOUVEIA HERBST

**Sarcoma Histiocítico: análise molecular pela técnica de
Hibridação Genômica Comparativa, MicroRNA e
imunoistoquímica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título
de Mestre no programa de Pós-graduação em
Patologia.

Orientadora: Prof(a). Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues

**Botucatu
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Herbst, Thiago Eugenio Gouveia.

Sarcoma histiocítico : análise molecular pela técnica de hibridação genômica comparativa, microRNA e imunohistoquímica / Thiago Eugenio Gouveia Herbst. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Maria Aparecida Custodio Domingues
Capes: 40105008

1. Sarcoma Histiocítico. 2. Linfoma. 3. Imuno-histoquímica. 4. Expressão gênica. 5. Morfologia.

Palavras-chave: Imunohistoquímica; MicroRNA; Morfologia; Sarcoma Histiocítico.



Dedicatória

*Aos meus pais, **Carlos e Léia**, exemplos de vida.*

*A minha madrinha, **Alzira**, vida dedicada à família.*

*A minha avó, **Eidília**, fonte de sabedoria e segurança.*

*A minha namorada, **Ângela**, sempre a meu lado.*



Agradecimientos

Aos meus professores,

Aos funcionários,

E amigos que sempre estiveram junto a mim ensinando e apoiando minha

formação acadêmica e profissional



Sumário

Lista de abreviações e siglas	
Resumo	
Abstract	
REVISÃO DA LITERATURA.....	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
OBJETIVOS.....	33
Objetivo Geral.....	34
Objetivos Específicos.....	34
CONSIDERAÇÃO.....	35
ARTIGO.....	37
RESUMO.....	39
ABSTRACT.....	40
INTRODUÇÃO.....	41
CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	44
Caracterização da amostra.....	44
Avaliação morfológica dos casos.....	46
Confecção do micro arranjo de tecidos.....	46
Estudo imunoistoquímico.....	47
Ensaio de expressão de miRNA em larga escala.....	48
Análise Estatística.....	49
RESULTADOS.....	50
Avaliação morfológica.....	52
Estudo imunoistoquímico.....	54
Resultados do miRNA.....	59
DISCUSSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	65
CONCLUSÕES.....	71
ANEXO.....	74



Lista de Abreviaturas e Siglas

SH:	Sarcoma Histicítico
LNH:	Linfoma não-Hodgkin
LF:	Linfoma Folicular
SCD:	Sarcoma de células dendríticas
FISH:	Hibridação in situ por fluorescência
LDGCB:	Linfoma difuso de grandes células B
BMP:	B-cell / myeloid progenitors
SALP:	Síndrome auto-imune linfoproliferativa
LM:	Linfoma de células do manto
DRD:	Doença de Rosai-Dorfman
IHQ:	Imunoistoquímica
TMA:	Microarranjo de Tecidos
BSA:	Albumina bovina sérica
HE:	Hematoxilina & Eosina
miRNA:	MicroRNA
miR:	MicroRNA
CGH:	Hibridação Genômica Comparativa



Resumo

O Sarcoma Histiocítico (SH) é uma neoplasia maligna caracterizada pela proliferação de células grandes que possuem aspecto morfológico e imunofenotípico semelhantes ao histiócito maduro tecidual. É uma neoplasia rara, perfazendo menos que 1% dos Linfomas Não-Hodgkin. Tal raridade pode ser explicada pela dificuldade de sua caracterização diagnóstica e morfológica, confundindo-se com outras neoplasias malignas pleomórficas. Os objetivos do presente estudo são: avaliar alterações no padrão de ganhos e perdas genômicas pela técnica de Hibridação Genômica Comparativa (CGH-array), avaliação do perfil de MicroRNA (miRNA), apontar os principais critérios morfológicos e marcadores imunoistoquímicos (IMH) que venham a definir esta entidade e identificar quais entidades que erroneamente podem levar a subdiagnóstico. Para tanto, foram revisados 7.600 laudos anatomopatológicos e, destes, foram selecionados 47 casos possíveis de SH, com apresentação nodal. Somando-se a estes, quatro casos sabidamente com diagnóstico de SH foram incluídos na análise. Foram avaliados 12 critérios morfológicos e 05 marcadores IMH. Dos 47 casos, foram localizados 07 SH, cujo diagnóstico inicial foi de neoplasia indiferenciada metastática (carcinoma indiferenciado) ou melanoma metastático. Os marcadores IMH que se mostraram mais eficientes para complementação diagnóstica foram CD163 e CD68. A avaliação do perfil de 377 miRNAs demonstrou *clusterização* de 51 miRNA, quando comparado ao controle, sendo 44 hipoexpressos e 07 hiperexpressos, sendo os mais relevantes: miR-10b-5p, miR-455-5p e miR-19 (hiperexpressos); miR-486-5p, miR-92a, miR-15b-5p (hiporegulados). Tais miRNA estão envolvidos nas vias da apoptose, crescimento e proliferação celular. Os principais genes envolvidos na patogenia e candidatos a validação com futuros estudos são: ERBB2, TGFB1, TNF(ativados) e TP53 e PD98059 (inibidos). Tais genes podem corresponder a futuros alvos terapêuticos. A técnica de *CGH array* demonstrou ser inviável em amostras parafinadas.

Palavras chaves: Sarcoma Histiocítico, Morfologia, Imunoistoquímica, MicroRNA.



Abstract

Histiocytic sarcoma (HS) is a malignant neoplasm characterized by the proliferation of large cells that have morphological and immunophenotypic features similar to mature tissue histiocytes. It is a rare neoplasm, accounting for less than 1% of non-Hodgkin lymphomas. This rarity is partly explained by the difficulties in its diagnostic and morphological characterization, since it is confused with other pleomorphic malignant neoplasms. The objectives of this study were to evaluate changes in genomic gains and losses using the comparative genomic hybridization technique (CGH-array), microRNA profile (miRNA) evaluation, determine the principal morphological criteria and immunohistochemical markers (IMH) that could define this entity, and identify entities that can mistakenly lead to underdiagnosis. To achieve this, 7,600 pathology reports were reviewed and, of these, 47 possible cases of HS with nodal presentation were selected. Four cases with an established diagnosis of HS were also included in the analysis. Twelve morphological criteria and 5 IMH markers were evaluated. Among the 47 cases, 7 cases of HS were identified that had initially been diagnosed as undifferentiated metastatic neoplasm (undifferentiated carcinoma) or metastatic melanoma. The IMH markers that were most efficient for complementary diagnosis were CD163 and CD68. Evaluation of the profiles of 377 miRNAs showed clustering of 51 miRNA compared with the control; 44 were hypoexpressed and 7 were hyperexpressed and the most relevant were: miR-486-5p, miR-92a, miR-15b-5p (hyporegulated); and miR-10b-5p, miR-455-5p and miR-19 (hyperexpressed). These miRNA are involved in apoptosis, cell growth and proliferation pathways. The main genes involved in pathogenesis and candidates for validation in future studies are: ERBB2, TGFB1, TNF (activated); and TP53 and PD98059 (inhibited). These genes may represent future therapeutic targets. The CGH-array proved to be unfeasible in paraffin-embedded samples.

Keywords: Histiocytic Sarcoma, Morphology, Immunohistochemistry, MicroRNA



Revisão da Literatura

Introdução

O Sarcoma Histiocítico (SH) é uma neoplasia hematopoética rara, que corresponde a menos de 1% dos linfomas não-Hodgkin (LNH), e cujas características morfológicas e imunofenotípicas remetem à diferenciação histiocítica (ou macrofágica)^{1,2}. Em sua definição, proposta inicialmente por Mathé e cols. (1970), é necessária a exclusão da proliferação relacionada à Leucemia Monocítica Aguda³. Associada à raridade dessa neoplasia, controvérsias históricas existentes em sua terminologia, critérios diagnósticos e grande variabilidade de apresentação clínica, têm dificultado sua caracterização e reconhecimento, possivelmente levando a diagnósticos equivocados^{2,4}. Por definição, se origina de células hemopoiéticas imaturas da medula óssea, o que o diferencia dos Sarcomas de Células Dendríticas Foliculares, Sarcoma de Células Dendríticas Interdigitantes, Tumor de Células Fibroblásticas Foliculares e Xantogranuloma Juvenil, que se originam de células mesênquimais dendríticas-relacionadas⁵.

Na epidemiologia do SH, observa-se ligeiro predomínio pelo sexo masculino, acometendo crianças e adultos, sendo estes geralmente a partir da 5ª década de vida (idade média 55 anos)⁶. Takahashi e Nakamura (2008) descrevem a existência de uma distribuição etária bimodal, com dois picos de incidência: de 0 a 29 anos, e um pico maior de 50 a 69 anos de idade⁷. A maioria dos casos de SH desenvolvem-se em sítios extranodais, sendo os principais: pele, partes moles, e trato gastrointestinal, podendo mais raramente comprometer outros sítios^{4,8,9,10,11,12,13}. Existe acometimento linfonodal primário em

aproximadamente um terço dos casos¹.

As manifestações clínicas associadas a essa neoplasia são diversas, variando de manifestações sistêmicas (e.g. febre, perda ponderal) a sinais e sintomas localizados, como erupção cutânea, lesões ósseas líticas, tosse, hepatoesplenomegalia, adenomegalia, e dor abdominal decorrente de sangramento ou de obstrução intestinal^{1,2,4}. Alterações laboratoriais como trombocitopenia refratária, pancitopenia, hipoalbuminemia e hipogamaglobulinemia também são descritas na literatura^{14,15}. De modo geral, o SH apresenta comportamento agressivo e evolução rápida com pobre resposta à quimioterapia e/ou radioterapia, porém existem relatos de exceções. Diante do limitado número de casos estudados na literatura, não existem evidências quanto à melhor abordagem terapêutica para esta neoplasia em cada situação, bem como parâmetros prognósticos. De modo geral, em casos de doença localizada opta-se pelo tratamento cirúrgico e/ou radioterápico e, nos casos de doença disseminada, tratamento quimioterápico seguindo-se a linha de tratamento para linfoma não-Hodgkin de grau intermediário a alto. Em primeira linha o esquema de preferência é o CHOP e em segunda linha de tratamento esquemas a base de platina (ICE, DAP, ESHAP) (<http://www.nccn.org/professionals/physician>). Há indícios de que o estágio inicial avançado e o maior tamanho do tumor primário estejam associados à menor sobrevida global^{2,4,12,13,16,17}.

Em seu aspecto histológico, o SH é heterogêneo, com cerca de 20 critérios morfológicos descritos em literatura, onde se destacam seu padrão difuso de crescimento, células grandes, bizarras e com citoplasma eosinofílico, além de aspecto pleomórfico, em meio a um estroma reacional. Entretanto, outras

neoplasias malignas de maior incidência (i.e. carcinomas indiferenciados, melanomas, sarcomas, linfoma de Hodgkin, outros LNH) também apresentam aspectos morfológicos semelhantes ao SH, sendo necessário extenso painel imunohistoquímico para confirmar a linhagem histiocítica e afastar esses diagnósticos diferenciais. A busca por um painel de marcadores voltado para a determinação da linhagem histiocítica revelou, na última década, diversos marcadores úteis, como CD68, lisozima, proteína S-100, vimentina, e CD163, sendo este último atualmente considerado o mais específico^{2,4,10,18,19}. Dorfman e cols. (2010) também sugeriram um papel importante dos receptores de fosfatidilserina TIM-3 e TIM-4 no reconhecimento de neoplasias de linhagem histiocítica e de células dendríticas²⁰.

A etiopatogenia do SH permanece desconhecida. Diversos estudos têm relatado o aparecimento sincrônico do SH com neoplasias germinativas do mediastino e/ou de células B maduras (ou em pacientes com história pregressa dessas neoplasias); a análise de rearranjos clonais nos genes *IGH* e *IGK*, bem como o compartilhamento de translocações entre ambas as neoplasias, tem apontado para uma possível origem clonal do SH a partir de neoplasias de células B pré-existentes^{10,16,18,21,22}. Feldman e cols. (2008) demonstraram, pela primeira vez, a presença da t(14; 18) em seis casos de SH e sarcomas de células dendríticas (SCD), cuja manifestação clínica ocorreu 2-12 meses após o diagnóstico de linfoma folicular (LF); nesse estudo, as amostras de LF também apresentavam a referida translocação quando analisadas pela técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), sendo também observado rearranjo clonal das regiões VDJ do gene *IGH*²¹. Wang e cols. (2012) observaram a

presença da translocação t(14; 18) (*IGH/BCL2*) em células neoplásicas do SH em um paciente com história progressiva de linfoma folicular; a mesma translocação foi observada um ano e meio após em uma terceira neoplasia que se desenvolveu no mesmo paciente (linfoma difuso de grandes células B - LDGCB)¹². Ainda, em um relato de caso recente, Hure e cols. (2012) descreveram a presença da translocação envolvendo os genes da ciclina D1 e da cadeia pesada de imunoglobulina em células do SH, em um paciente com diagnóstico sincrônico de Linfoma do Manto (LM)¹⁸. Outros achados semelhantes descritos em neoplasias de linhagem B (e.g. Leucemia Linfocítica Crônica / Linfoma Linfocítico, Linfoma de Zona Marginal Extranodal, etc), além da identificação de fatores de transcrição desta linhagem em histiócitos neoplásicos (e.g. OCT-2, PAX-5), levaram à elaboração de pelo menos três teorias envolvendo a etiopatogenia do SH: (1) origem clonal comum entre as neoplasias a partir de uma célula pluripotencial, (2) desdiferenciação, e (3) transdiferenciação^{18,21,22,23,24}. A existência de uma origem clonal comum implica na existência de uma célula progenitora neoplásica capaz de se diferenciar em linhagem B e mielóide a depender da natureza do estímulo (*B-cell / myeloid progenitors* – BMP), sendo ela quiescente durante a maior parte do tempo e, portanto, resistente aos esquemas quimioterápicos disponíveis. Células dessa natureza foram observadas na medula óssea normal de seres humanos adultos, apresentando o perfil: CD34+, CD19+, CXCL4 -. A depender do meio em que estão inseridas, as BMP seriam capazes de formar colônias linfóides ou mielóides^{22,25}. A suposta presença de células pluripotenciais envolvidas na gênese do SH também chama atenção para a concomitância dessa neoplasia com tumores de células germinativas do mediastino. A teoria do processo de diferenciação em duas etapas (ou da “desdiferenciação”) também tem sido

bastante discutida. De acordo com essa teoria, uma célula B madura, que teve sua passagem pelo centro germinativo e sofreu hipermutação somática, seria capaz de regredir em seu estágio de diferenciação, e seguir rumo à outra linhagem (mielóide, por exemplo). Desse modo, a despeito de seu imunofenótipo histiocítico, rearranjos em regiões variáveis de *IGH* permaneceriam nesses tumores, apontando para uma possível origem de células B. Os fatores que levariam a esse fenômeno não são bem compreendidos, porém acredita-se que alterações genéticas e epigenéticas estejam envolvidas na mudança do perfil de fatores de transcrição da célula B. Essa participação foi questionada após diversas descrições sobre o aumento da expressão de fatores envolvidos na diferenciação macrofágica (e.g. C/EBP- α , C/EBP- β e PU.1) em histiócitos neoplásicos, bem como pela ausência de expressão de fatores importantes no “comprometimento” com a linhagem B (e.g. PAX-5, BOB.1)^{21,22,23,25}. XIE e cols. (2004) apontaram, por meio de estudos *in vitro*, que as células B podem sofrer “reprogramação” em um ambiente propício²⁵. Outro ponto interessante é a manutenção da expressão de OCT-2 em histiócitos neoplásicos, um fator presente em células B e envolvido na formação do centro germinativo; desse modo, as células do SH são negativas para marcadores de imunofenótipo B, porém mantêm a expressão de OCT-2, sugerindo também uma origem a partir de célula B²³. A terceira teoria envolvida na origem do SH é a da “transdiferenciação”. Wang e cols. (2011), ao estudar um caso de SH e LDGCB em um paciente com história prévia de LF, sugeriram que diferentes subclones de células B maduras do LF foram capazes de evoluir por diferentes rotas (“evolução divergente”): uma para linhagem B (originando um LDGCB), e outra para a linhagem histiocítica (originando um SH), o que os autores denominaram

“cisevolução” e “transevolução”, respectivamente²³. Na teoria da transdiferenciação, mesmo uma célula B madura, aparentemente comprometida com sua linhagem, seria capaz de modificar-se fenotipicamente, e dar origem, de modo direto, a uma célula de outra linhagem. Shao e cols. (2011), em dois dos 7 casos estudados entre SH e SCD, descreveram a expressão fraca de PAX-5 em células dendríticas neoplásicas e de aspecto histiocítico. Uma vez que o PAX-5 indica comprometimento com a linhagem B, os autores interpretaram esse achado como possíveis células em etapa intermediária de transdiferenciação; os demais casos descritos na literatura apontam para a ausência de PAX-5 no SH/SCD, mesmo nos casos fortemente sugestivos de monoclonalidade com neoplasias de células B²². Os achados descritos na literatura e citados anteriormente apontam para um potencial de plasticidade celular maior do que o imaginado, mesmo em células que estão aparentemente em seu estágio terminal de diferenciação.

Salientam-se os casos de SH que se desenvolvem em pacientes sem história prévia de neoplasias germinativas ou de células B, não são relatados rearranjos clonais ou as translocações anteriormente citadas, exceto por um artigo na literatura². A presença de mutações envolvendo o gene de *Fas-L* e a via extrínseca da apoptose, além da desregulação do padrão Th2 de resposta imune (com expressão anormal de IL-4 e IL-10) também foi levantada com um fator possivelmente associado ao surgimento do SH em pacientes com Síndrome Autoimune Linfoproliferativa (SALP) e Doença de Rosai-Dorfman (DRD)¹⁷. Wu e cols. (2008) associaram, ainda, a história pregressa de irradiação em sistema nervoso central com o desenvolvimento de SH nesta topografia²⁶.

Os estudos citogenéticos realizados no SH são raros em literatura e

demonstram resultados que refletem a heterogeneidade desta neoplasia. Entre as anormalidades descritas estão a trissomia do cromossomo 9, deleção do braço longo do cromossomo 5 e trissomia do cromossomo 8. Há relatos de cariótipos normais em uma proporção de casos^{27,28,29}.

A metodologia da CGH (hibridação genômica comparativa), descrita por Kallioniemi et al. (1994), permite a análise de perdas e ganhos de regiões em todo o genoma, sem desvios para qualquer região cromossômica em particular. Para esta metodologia é requerida pequena quantidade de DNA e pode ser aplicada a tecido fixado e/ou incluído em parafina³⁰. O procedimento padrão é a marcação de DNA tumoral e de referência (normal) em iguais razões molares com diferentes haptenos (sondas). Este conjunto de sondas marcadas é misturado para permitir uma competição entre elas quando da hibridização em metáfases normais. A quantidade de DNA teste ou de referência ligado ao cromossomo normal é caracterizada pela intensidade da fluorescência, tomando-se como referência a hibridização dos DNAs normais na lâmina controle. Recentemente, foi descrito o método de CGH baseado em *arrays* (CGH *arrays*), o qual é utilizado na detecção de regiões mínimas de deleções e ampliações genômicas. O princípio metodológico é semelhante ao da CGH cromossômico, entretanto, supera suas limitações de resolução pelo uso de clones imobilizados em uma lâmina de vidro em posição bem definida. Alvos de DNA para microarray podem ser derivados de clones genômicos incluindo YACs (0,2 a 2 Mb em tamanho), BACs (300 kb), P1s (~70-100 kb), PACs (~130-150 kb) e cosmídeos (~30-45 kb) sendo, portanto, de várias ordens de magnitude menores do que os cromossomos alvo. Esta diminuição no tamanho do alvo aumenta o poder de detecção de não-

balanceamentos genômicos em comparação com o CGH cromossômico³¹. O DNA teste diferencialmente marcado (tumoral) e o de referência (controle) são co-hibridizados em fragmentos genômicos clonados e fixados em posições definidas formando um *chip*. Os DNAs hibridados são detectados pelo uso de dois fluorocromos distintos. Diferenças na intensidade digitalizada dos padrões de hibridação do DNA podem ser interpretadas como diferenças no número de cópias entre os genomas teste e de referência. Existe apenas um relato em literatura utilizando a metodologia de CGH *array* em amostras de SH canino, visto que esta neoplasia é frequente nestes animais. Dentre as alterações encontradas, os autores deram ênfase as perdas no genes *CDKN2A/B*, *RB1* e *PTEN*³², *INK4A/ARF*, *CDKN2A/p14ARF*, *TP53* e *MDM2*^{33,34,35,36,37,38,39,40}.

.Com as novas descobertas sobre o genoma humano, os RNAs não codificadores (miRNA) surgiram como importantes fatores moleculares que desempenham um papel fundamental na regulação da expressão gênica⁴¹. Os miRNAs correspondem a pequenas sequencias de 20 a 24 nucleotídeos que atuam na regulação da expressão gênica pela repressão da tradução ou degradação do transcrito^{42,43}. Atualmente, plataformas com 377 miR possibilitam a pesquisa de perfis, que são analisados por programas específicos. Estes perfis são altamente específicos para cada neoplasia. Os miRNAs têm um importante papel em processos biológicos normais como desenvolvimento, apoptose, diferenciação e proliferação celular, contribuindo também com o desenvolvimento e progressão de diversos tipos tumorais^{44,45}.

Até o momento, não há trabalho na literatura que proponha a análise do perfil de miRNA em amostras de SH de humanos ou mesmo cães, onde a

prevalência da doença é maior. A importância destes estudos estaria voltada na capacidade de grupos de miRNAs estarem associados a vias que venham a explicar as diferentes teorias de etiopatogenia, descritas previamente, e indicar genes e proteínas-alvo relacionadas a futuras terapias específicas. Apesar do progresso observado no estudo da patogenia do SH, a raridade dessa neoplasia aparentemente tem limitado o avanço no conhecimento do comportamento biológico, reconhecimento (diagnóstico morfológico e imunoistoquímico) e melhor abordagem terapêutica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization Classification of Tumors: pathology and genetics tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2001.
 2. Vos JA, Abbondanzo SL, Barekman CL, Andriko JW, Miettinen M, Aguilera NS. Histiocytic sarcoma: a study of five cases including the histiocyte marker CD163. *Mod Pathol.* 2005; 18:693-704.
 3. Mathé G, Gerard Marchant R, Texier JL, Schlumberger JR, Berumen L, Paintrond M. The two varieties of lymphoid tissue reticulossarcomas, histiocytic and histioblastic types. *Br J Cancer.* 1970; 24:687-695.
 4. Hornick JL, Jaffe ES, Fletcher CD. Extranodal histiocytic sarcoma. Clinicopathologic analysis of 14 cases of a rare epithelioid malignancy. *Am J Surg Pathol.* 2004; 28:1133-44.
 5. Dalia S, Shao H, Sagatis E, Cualing H, Sokol I. Dendritic Cells and Histiocytic Neoplasms: Biology, diagnosis and treatment. *Cancer Control.* 2014; 21:290-300.
 6. Soria C, Orradre JL, Garcia-Almagro D, Martinez B, Algara P, Piris MA. True histiocytic lymphoma (monocytic sarcoma). *Am J Dermatopathol.* 1992; 14:511-7.
 7. Takahashi E, Nakamura S. Histiocytic sarcoma : an updated literature review based on the 2008 WHO classification. *J Clin Exp Hematop.* 2013;53(1):1-8.
-

-
8. Copie-Bergman C, Wotherspoon AC, Norton AJ, Diss TC, Isaacson PG. True histiocytic lymphoma: A morphologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 13 cases. *Am J Surg Pathol.* 1998; 22:1386-92.
 9. Pileri SA, Grogan TM, Harris NL, Banks P, Campo E, Chan JKC, et al. Tumours of histiocytes and accessory dendritic cells: An immunohistochemical approach to classification from the International Lymphoma Study Group based on 61 cases. *Histopathology.* 2002; 41:1-29.
 10. Congyang L, Xinggui W, Hao L, Weihua H. Synchronous histiocytic sarcoma and diffuse large B cell lymphoma involving the stomach: a case report and review of the literature. *Int J Hemat.* 93:247-52, 2011.
 11. Laviv Y, Zagzag D, Fichman-Horn S, Michowitz S. Primary central nervous system histiocytic sarcoma. *Brain Tumor Pathol.* 2013 Jul; 30(3):192-5
 12. Wang J, Li T, Chen H, Liu Q. A case of primary central nervous system histiocytic sarcoma. *Clin Neurol Neurosurg.* 2012.
 13. Gomi K, Tanaka M, Yoshida M, Ito S, Sonoda M, Iwasaki F, Niwa T, Aida N, Kigasawa H, Tanaka Y. Primary cerebellar histiocytic sarcoma in a 17-month-old girl: Case report. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics* Vol. 10 / No. 2, Pages 126-129, 2012
 14. Sim J, Yun-Yan H, Leung R, So J, Kwong Y. Histiocytic sarcoma simulating immune thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol;* 92(4): 555–556, 2013
-

-
15. Yamada S, Tasaki T, Satoh N, Nabeshima A, Kitada S, Noguchi H, Yamada K, Takeshita M, Sasaguri Y. Primary splenic histiocytic sarcoma complicated with prolonged idiopathic thrombocytopenia and secondary bone marrow involvement: a unique surgical case presenting with splenomegaly but non-nodular lesions. *Diagn Pathol*; 7: 143, 2012.
 16. Shinoda H, Yoshida A, Teruya-Feldstein J. Malignant histiocytoses/disseminated histiocytic sarcoma with hemophagocytic syndrome in a patient with mediastinal germ cell tumor. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*.;17(4):338-44, 2009
 17. Venkataraman G, McClain K, Pittaluga S, Rao V, Jaffe E. Development of disseminated histiocytic sarcoma in a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome and associated Rosai-Dorfman disease. *Am J Surg Pathol*;34(4):589-94, 2010
 18. Hure MC, Elco CP, Ward D, Hutchinson L, Meng X, Dorfman D, Yu H. Histiocytic sarcoma arising from clonally related mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2012; 30(5):49-53.
 19. Patnaik A, Mishra S, Senapati S. A rare case of primary extranodal, extradural histiocytic sarcoma of the thoracic spine and review of literature. *Surg Neurol Int*. 2012; 3: 96.
 20. Dorfman DM, Hornick JL, Shahsafaei A, Freeman GJ. The phosphatidylserine receptors, T cell immunoglobulin mucin proteins 3 and 4, are markers of histiocytic sarcoma and other histiocytic and dendritic cell neoplasms. *Hum Pathol*. 2010 Oct;41(10):1486-94.
-

-
21. Feldman AL, Arber DA, Pittaluga S, Martinez A, Burke JS, Raffeld M, Camos M, Warnke R, Jaffe ES. Clonally related follicular lymphomas and histiocytic/dendritic cell sarcomas: evidence for transdifferentiation of the follicular lymphoma clone. *Blood*. 2008 Jun 15;111(12):5433-9.
 22. Shao H, Xi L, Raffeld M, Feldman AL, Ketterling RP, Knudson R, Rodriguez-Canales J, Hanson J, Pittaluga S, Jaffe ES. Clonally related histiocytic/dendritic cell sarcoma and chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma: a study of seven cases. *Mod Pathol*. 2011 Nov;24(11):1421-32.
 23. Wang E, Papalas J, Hutchinson CB, *et al*. Sequential development of histiocytic sarcoma and diffuse large b-cell lymphoma in a patient with a remote history of follicular lymphoma with genotypic evidence of a clonal relationship: a divergent (bilineal) neoplastic transformation of an indolent B-cell lymphoma in a single individual. *Am J Surg Pathol* 2011;35:457–463.
 24. Stoecker MM, Wang E. Histiocytic/dendritic cell transformation of B-cell neoplasms: pathologic evidence of lineage conversion in differentiated hematolymphoid malignancies. *Arch Pathol Lab Med*. 2013 Jun;137(6):865-70.
 25. Xie H, Ye M, Feng R, Graf T. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell*. 2004;117:663–676.
-

-
26. Wu W, Tanrivermis Sayit A, Vinters HV, Pope W, Mirsadraei L, Said J. Primary central nervous system histiocytic sarcoma presenting as a postradiation sarcoma: case report and literature review. *Hum Pathol.* 2013 Jun;44(6):1177-83.

 27. Van der Valk P, Meijer CJ, Willenzi R, Van Oosteron AT, Spandeer PJ, te Velte J. Histiocytic sarcoma (true histiocytic lymphoma): a clinicopathological study of 20 cases. *Histopathology*, 8:105-123, 1984.

 28. Loheler J, Franz T, Fusco A, Pragnell I, Ostertag W. Murine retrovirus-induced malignant histiocytosis, an experimental model for the disease in humans. *Leukemia* 1:58-59, 1987.

 29. Muraresco ED, Lyghezan R, Negru D, Chiselita IR, Plamadeala P, Mihailovici MS. *Rom J Morphol Embryol.* 2005;46(3):183-7.

 30. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D. Optimizing comparative genomic hybridization for the analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 10: 231-243, 1994.

 31. Kirchhoff M, Rose H, Lundsteen C. High resolution comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *J Med Genet*, 38:740-744, 2001.
-

-
32. Hedan B, Thomas R, Motsinger-Reif A, Abadie J, Andre C, Cullen J, Breen M. Molecular cytogenetic characterization of canine histiocytic sarcoma: A spontaneous model for human histiocytic cancer identifies deletion of tumor suppressor genes and highlights influence of genetic background on tumor behavior. *BMC Cancer*. 26;11:201, 2011.

 33. Weintraub M, Bhatia KG, Chandra RS, Magrath IT, Ladisch S: p53 expression in Langerhans cell histiocytosis. *J Pediatr Hematol Oncol* 20:12-17, 1998.

 34. Bank MI, Rengtved P, Carstensen H, Petersen BL: p53 expression in biopsies from children with Langerhans cell histiocytosis. *J Pediatr Hematol Oncol*. 24:733-736, 2002.

 35. Leroux D, Mugneret F, Callanan M, Radford-Weiss I, Dastugue N, Feuillard J, Le Mee F, Plessis G, Talmant P, Gachard N, et al: CD4(+), CD56(+) DC2 acute leukemia is characterized by recurrent clonal chromosomal changes affecting 6 major targets: a study of 21 cases by the Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique. *Blood* 99:4154-4159, 2002.

 36. Murakami I, Gogusev J, Fournet JC, Glorion C, Jaubert F: Detection of molecular cytogenetic aberrations in langerhans cell histiocytosis of bone. *Hum Pathol*. 33:555-560, 2002.

 37. Sander B, Middel P, Gunawan B, Schulten HJ, Baum F, Golas MM, Schulze F, Grabbe E, Parwaresch R, Fuzesi L: Follicular dendritic cell sarcoma of the spleen. *Hum Pathol*. 38:668-672, 2007.
-

-
38. Dacic S, Trusky C, Bakker A, Finkelstein SD, Yousem SA: Genotypic analysis of pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *Hum Pathol.* 34:1345-1349, 2003.
 39. Carrasco DR, Fenton T, Sukhdeo K, Protopopova M, Enos M, You MJ, Di Vizio D, Nogueira C, Stommel J, Pinkus GS, et al: The PTEN and INK4A/ARF tumor suppressors maintain myelolymphoid homeostasis and cooperate to constrain histiocytic sarcoma development in humans. *Cancer Cell* 9:379-390, 2006.
 40. Kumar R, Khan SP, Joshi DD, Shaw GR, Ketterling RP, Feldman AL: Pediatric histiocytic sarcoma clonally related to precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia with homozygous deletion of CDKN2A encoding p16(INK4A). *Pediatr Blood Cancer* 2010.
 41. Esteller, M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet*, v.12, n.12, p.861-74, Dec 2011.
 42. Lee, R.C.; Ambros, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, v. 294, n. 5543, p. 862-4, Oct 2001
 43. Lim, L.P. et al. Vertebrate miRNA genes. *Science*, v. 299, n. 5612, p.1540, Mar 2003
 44. Bartel, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function cell, v. 116, n. 2, p. 281-97, jan 2004.
 45. Kloosterman, W.P.; Plasterk, R.H. The diverse functions of miRNAs in animal development and disease. *Dev Cell*, v. 11, n. 4, p. 441-50, Oct 2006
-



Objetivos

OBJETIVO GERAL

Avaliar, em SH humanos alterações no padrão de ganhos e perdas genômicas, pela técnica de CGH *array*, perfil de expressão de miRNAs, critérios morfológicos e de possíveis marcadores imunoistoquímicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão das proteínas candidatas à melhor definição diagnóstica morfológica do SH utilizando-se a técnica de imunoistoquímica;
 - Identificar os principais critérios morfológicos que possam levar a suspeita e diagnóstico anatomopatológico desta neoplasia;
 - Identificar quais as neoplasias malignas que morfológicamente podem levar ao subdiagnóstico anatomopatológico de SH;
 - Identificar os principais miRNA associados a patogenia do SH e futuros alvos terapêuticos.
-

Consideração

Em virtude da qualidade inadequada das amostras fixadas e incluídas em parafina, resultando em DNA de baixa qualidade, optou-se por excluir a técnica de CGHarray

Artigo

*Sarcoma Histiocítico: análise do perfil de MicroRNA,
Avaliação Morfológica e Imunoistoquímica*

*Artigo escrito segundo recomendações para publicação do Modern Pathology
(http://mts-mpa.nature.com/cgi-bin/main.plex?form_type=display_auth_instructions;
acessado em 01/11/2014)*

Sarcoma Histiocítico: análise do perfil de MicroRNA, Avaliação Morfológica e Imunoistoquímica

Thiago E. G. Herbst (1); Mauricio Ribeiro (1); Hellen Huasne (2); Sara Martorelli (2); Fernando Augusto Soares (2); Silvia Regina Rogatto (1,2); Maria Aparecida C. Domingues (1)

(1) Departamento⁶ de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brasil.

(2) Departamento de Patologia, Hospital A.C. Camargo, São Paulo, Brasil.

Endereço de correspondência:
Profa Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues, MD, PhD
Departamento de Patologia
Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade de São Paulo
Distrito de Rubião Junior, s/n - Botucatu, São Paulo - Brasil
CEP: 18618-970 – Fone 14 38801658
e-mail: mdomingues@fmb.unesp.br

RESUMO

O Sarcoma Histiocítico (SH) é uma neoplasia maligna caracterizada pela proliferação de células grandes que possuem aspecto morfológico e imunofenotípico semelhantes ao histiócito maduro tecidual. É uma neoplasia rara, perfazendo menos que 1% dos Linfomas Não-Hodgkin. Tal raridade pode ser explicada pela dificuldade de sua caracterização diagnóstica e morfológica, confundindo-se com outras neoplasias malignas pleomórficas. Os objetivos do presente estudo são: avaliar do perfil de MicroRNA (miRNA), apontar os principais critérios morfológicos e marcadores imunoistoquímicos (IMH) que venham a definir esta entidade e identificar quais entidades que erroneamente podem levar a subdiagnostico. Para tanto, foram revisados 7.600 laudos anatomopatológicos e, destes, foram selecionados 47 casos possíveis de SH, com apresentação nodal. Somando-se a estes, quatro casos sabidamente com diagnóstico de SH foram incluídos na análise. Foram avaliados 12 critérios morfológicos e 05 marcadores IMH. Dos 47 casos, foram localizados 07 SH, cujo diagnóstico inicial foi de neoplasia indiferenciada metastática (carcinoma indiferenciado) ou melanoma metastático. Os marcadores IMH que se mostraram mais eficientes para complementação diagnóstica foram CD163 e CD68. A avaliação do perfil de 377 miRNAs demonstrou *clusterização* de 51 miRNA, quando comparado ao controle, sendo 44 hipoexpressos e 07 hiperexpressos, sendo os mais relevantes: miR-10b-5p, miR-455-5p e miR-19 (hiperexpressos); miR-486-5p, miR-92a, miR-15b-5p (hiporegulados). Tais miRNA estão envolvidos nas vias da apoptose, crescimento e proliferação celular. Os principais genes envolvidos na patogenia e candidatos a validação com futuros estudos são: ERBB2, TGFB1, TNF(ativados) e TP53 e PD98059 (inibidos). Tais genes podem corresponder a futuros alvos terapêuticos.

Palavras chaves: Sarcoma Histiocítico, Morfologia, Imunoistoquímica, MicroRNA

ABSTRACT

Histiocytic sarcoma (HS) is a malignant neoplasm characterized by the proliferation of large cells that have morphological and immunophenotypic features similar to mature tissue histiocytes. It is a rare neoplasm, accounting for less than 1% of non-Hodgkin lymphomas. This rarity is partly explained by the difficulties in its diagnostic and morphological characterization, since it is confused with other pleomorphic malignant neoplasms. The objectives of this study were to evaluate changes microRNA profile (miRNA), determine the principal morphological criteria and immunohistochemical markers (IMH) that could define this entity, and identify entities that can mistakenly lead to underdiagnosis. To achieve this, 7,600 pathology reports were reviewed and, of these, 47 possible cases of HS with nodal presentation were selected. Four cases with an established diagnosis of HS were also included in the analysis. Twelve morphological criteria and 5 IMH markers were evaluated. Among the 47 cases, 7 cases of HS were identified that had initially been diagnosed as undifferentiated metastatic neoplasm (undifferentiated carcinoma) or metastatic melanoma. The IMH markers that were most efficient for complementary diagnosis were CD163 and CD68. Evaluation of the profiles of 377 miRNAs showed clustering of 51 miRNA compared with the control; 44 were hypoexpressed and 7 were hyperexpressed and the most relevant were: miR-486-5p, miR-92a, miR-15b-5p (hyporegulated); and miR-10b-5p, miR-455-5p and miR-19 (hyperexpressed). These miRNA are involved in apoptosis, cell growth and proliferation pathways. The main genes involved in pathogenesis and candidates for validation in future studies are: ERBB2, TGFB1, TNF (activated); and TP53 and PD98059 (inhibited). These genes may represent future therapeutic targets. The CGH-array proved to be unfeasible in paraffin-embedded samples.

Keywords: Histiocytic Sarcoma, Morphology, Immunohistochemistry, MicroRNA

INTRODUÇÃO

O Sarcoma Histiocítico (SH) é uma neoplasia hematopoética rara, que corresponde a menos de 1% dos linfomas não-Hodgkin (LNH), e cujas características morfológicas e imunofenotípicas remetem à diferenciação histiocítica (ou macrofágica)^{1,2}. Em sua definição, proposta inicialmente por Mathé e cols., é necessária a exclusão da proliferação relacionada à Leucemia Monocítica Aguda³. Associada à raridade dessa neoplasia, controvérsias históricas existentes em sua terminologia, critérios diagnósticos e grande variabilidade de apresentação clínica têm dificultado sua caracterização e reconhecimento, possivelmente levando a diagnósticos equivocados^{2,4}. Por definição, se origina de células hemopoiéticas imaturas da medula óssea, que o diferencia dos Sarcomas de Células Dendríticas Foliculares, Sarcoma de Células Dendríticas Interdigitantes, Tumor de Células Fibroblásticas Foliculares e Xantogranuloma Juvenil, que se originam de células mesenquimais dendríticas-relacionadas⁵.

Na epidemiologia do SH observa-se ligeiro predomínio pelo sexo masculino, acometendo crianças e adultos, sendo estes geralmente a partir da 5ª década de vida (idade média 55 anos)⁶. Takahashi e Nakamura descrevem, por sua vez, a existência de uma distribuição etária bimodal, com dois picos de incidência: de 0 a 29 anos, e um pico maior de 50 a 69 anos de idade⁷. A maioria dos casos de SH desenvolvem-se em sítios extranodais, sendo os principais: pele, partes moles, e trato gastrointestinal, podendo mais raramente comprometer outros sítios^{4,8,9,10,11,12,13}.

As manifestações clínicas associadas a essa neoplasia são diversas,

variando de manifestações sistêmicas (e.g. febre, perda ponderal) a sinais e sintomas localizados, como erupção cutânea, lesões ósseas líticas, tosse, hepatoesplenomegalia, adenomegalia, e dor abdominal decorrente de sangramento ou de obstrução intestinal ^{1,2,4}. Alterações laboratoriais como trombocitopenia refratária, pancitopenia, hipoalbuminemia e hipogamaglobulinemia também são descritas na literatura ^{14,15}. De modo geral, o SH apresenta comportamento agressivo e evolução rápida com pobre resposta à quimioterapia e/ou radioterapia, porém existem relatos de exceções. Diante do limitado número de casos estudados na literatura, não existem evidências quanto à melhor abordagem terapêutica para esta neoplasia em cada situação, bem como parâmetros prognósticos.

Em seu aspecto histológico, o SH é heterogêneo, com cerca de 20 critérios morfológicos descritos em literatura, onde se destaca seu padrão difuso de crescimento, células grandes, bizarras e com citoplasma eosinofílico, além de aspecto pleomórfico, em meio a um estroma reacional. Entretanto, outras neoplasias malignas de maior incidência (i.e. carcinomas indiferenciados, melanomas, sarcomas, linfoma de Hodgkin, outros LNH) também apresentam aspectos morfológicos semelhantes ao SH, sendo necessário extenso painel imunohistoquímico para confirmar a linhagem histiocítica e afastar esses diagnósticos diferenciais. A busca por um painel de marcadores voltado para a determinação da linhagem histiocítica revelou ao longo dos anos diversos marcadores úteis, como CD68, lisozima, proteína S-100, vimentina, e CD163, sendo este último atualmente considerado o mais específico ^{2,4,10,16,17}. A etiopatogenia do SH permanece desconhecida. Diversos estudos têm relatado o

aparecimento sincrônico do SH com neoplasias germinativas do mediastino e/ou de células B maduras (ou em pacientes com história pregressa dessas neoplasias); a análise de rearranjos clonais nos genes *IGH* e *IGK*, bem como o compartilhamento de translocações entre ambas as neoplasias, tem apontado para uma possível origem clonal do SH a partir de neoplasias de células B pré-existentes^{10,16,18,,19,20}. Wang e cols., (2011) observaram a presença da translocação t(14; 18) (*IGH/BCL2*) em células neoplásicas do SH em um paciente com história pregressa de linfoma folicular; a mesma translocação foi observada 1 ano e meio após em uma terceira neoplasia que se desenvolveu no mesmo paciente (linfoma difuso de grandes células B - LDGCB)²¹. Ainda, em um relato de caso recente, Hure e cols., (2012) descreveram a presença da translocação envolvendo os genes da ciclina D1 e da cadeia pesada de imunoglobulina em células do SH, em um paciente com diagnóstico sincrônico de Linfoma do Manto (LM)¹⁶. A suposta presença de células pluripotenciais envolvidas na gênese do SH também chama atenção para a concomitância dessa neoplasia com tumores de células germinativas do mediastino. Os estudos citogenéticos realizados no SH são raros em literatura e demonstram resultados que refletem a heterogeneidade desta neoplasia. Entre as anormalidades descritas estão a trissomia do cromossomo 9, deleção do braço longo do cromossomo 5 e trissomia do cromossomo 8. Há relatos de cariótipos normais em uma proporção de casos^{22,23,24}. Na literatura existe apenas um relato utilizando a metodologia de *array* em amostras de SH canino, visto que esta neoplasia é frequente nestes animais. Dentre as alterações encontradas, os autores deram ênfase as perdas no genes *CDKN2A/B*, *RB1* e *PTEN*²⁵, *INK4A/ARF*, *CDKN2A/p14ARF*, *TP53* e *MDM2*^{26,27,28,29,30,31,32,33}.

Com as novas descobertas sobre o genoma humano, os RNAs (miRNAs) não codificadores surgiram como importantes fatores moleculares que desempenham um papel fundamental na regulação da expressão gênica³⁴. Os miRNA correspondem a pequenas sequências de 20 a 24 nucleotídeos que atuam na regulação da expressão gênica pela repressão da tradução ou degradação do transcrito^{35,36}. Os miRNAs têm um importante papel em processos biológicos normais como desenvolvimento, apoptose, diferenciação e proliferação celular, contribuindo também com o desenvolvimento e progressão de diversos tipos tumorais^{37,38}. Os objetivos deste estudo são: avaliar o perfil de miRNA em SH humanos, previamente diagnosticados, analisar a expressão proteica, pela técnica de imunistoquímica (em casos suspeitos e confirmados) e avaliação morfológica. Estes dados poderão contribuir para melhor compreensão da patogenia, diagnóstico morfológico e futuras terapias-alvo.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Caracterização da amostra:

A partir da análise retrospectiva de **7.600 laudos** anátomo-patológicos presentes nos arquivos do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-UNESP), no período de 1988 a 2006, **dos livros de “Biopsia de Consulta Externa”, foram selecionadas 140 casos cujas hipóteses diagnósticas envolviam o SH e seus diagnósticos diferenciais**, subdivididos em três grupos, a saber: casos cujo diagnóstico envolvia os termos: “linfoma

histiocítico”, “linfoma histiocítico verdadeiro”, “histiocitose maligna”, “sarcoma histiocítico”, “neoplasia histiocítica maligna”, “histiocitoma maligno”, “linfoma não-Hodgkin com predominância histiocítica”, “linfoma histiocitóide”, “carcinoma de células histiocitoides”, “linfoma de Hodgkin tipo histiocítico” (agrupados como **“lesões histiocíticas malignas”**), casos cuja nomenclatura não envolvia o termo histiócito, porem **com termos padronizados**: metástase linfonodal de melanoma maligno sem lesão primária conhecida, metástase linfonodal de carcinoma indiferenciado sem lesão primária conhecida, metástase linfonodal de sarcoma fusocelular, linfoma anaplásico, linfoma difuso de grandes células B, linfoma de Hodgkin – depleção linfocítica, “linfoma não-Hodgkin pleomórfico de grandes células”, “linfoma pleomórfico”; casos cuja conclusão diagnóstica era indeterminada: “neoplasia indiferenciada”, “metástase de neoplasia indiferenciada, linfoma não-Hodgkin de alto grau não responsivo a CHOP”, sarcoma indiferenciado”, “neoplasia maligna metastática de grandes células” estes agrupados como **“outros diagnósticos suspeitos”**. Destes três grupos foram selecionados **47 casos**, que tiveram **a apresentação clínica nodal e condições técnicas adequadas** (bloco disponível e amostra representativa). As lâminas de Hematoxilina-Eosina foram selecionadas para avaliação morfológica e marcação de área para confecção do Microarranjo de Tecidos (TMA). Foram incluídos quatro casos diagnosticados como SH pela morfologia e estudo imunoistoquímico, provenientes do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, representando casos controles positivos.

Esse estudo tem a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (número 2718/08).

Avaliação morfológica dos casos

A partir das lâminas de Hematoxilina-Eosina, utilizadas para a identificação de regiões de interesse, foi feita a avaliação morfológica de cada caso, apontando a presença ou ausência de cada aspecto, a saber: (1) tamanho celular (médio a grande), (2) presença de cromatina vacuolada, (3) presença de carioteca irregular, (4) presença de inclusão nuclear, (5) citoplasma eosinofílico vacuolado, (6) células bizarras, (7) coesividade, (8) morfologia epitelióide, (9) hemofagocitose, (10) infiltrado inflamatório, (11) hemossiderina, e apoptose (12).

Confeção do Micro Arranjo de Tecidos (TMA)

A plataforma de TMA foi confeccionada no Departamento de Patologia da Faculdade de medicina de Botucatu-UNESP. Foram incluídas amostras diagnosticadas como SH e casos suspeitos de SH, rastreados por critérios morfológicos e imunoistoquímicos. A elaboração da plataforma ocorreu conforme descrito por Nagai et al., (2007): foram identificadas regiões de interesse para o estudo a partir de lâminas de Hematoxilina-Eosina dos casos selecionados; em seguida, foram obtidas amostras circulares (com 1.0 mm de diâmetro) representativas dessas regiões a partir dos blocos correspondentes, sendo que cada amostra obtida foi disposta em bloco receptor, por meio de um aparelho *Tissue Microarray (Beecher Instruments®, Silver Spring, USA)*, assumindo espaçamento de 0.2 mm entre dois cores. Para cada plataforma confeccionada, foi simultaneamente elaborado um mapa contendo a localização exata de cada caso. As lâminas originadas de blocos receptores foram imersas em uma camada

de parafina e mantidas a -20°C até 24h antes das reações de imunistoquímica³⁹.

Estudo Imunoistoquímico (IHQ)

Para o estudo imunoistoquímico utilizou-se os anticorpos primários: proteína S-100 (DAKO, 1:200), CD68 (DAKO, 1:100), CD163 (DAKO, 1:100), Vimentina (DAKO, 1:200) e Lisozima (DAKO, 1:200). A técnica de IHQ foi realizada seguindo o protocolo padrão do Departamento de Patologia, Hospital das Clínicas, UNESP, Botucatu. Foram obtidas secções de $3\mu\text{m}$ de espessura, e montadas em lâminas adesivas (Instrumedics Inc ®, Hackensack, NJ). Em seguida, as lâminas passaram por processo de desparafinização em xilol, seguido por etanol absoluto, como preparo para a hidratação em água corrente. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado em solução de peróxido de hidrogênio a 3%, durante 10 min, em temperatura ambiente. Para a etapa de recuperação antigênica, as lâminas foram imersas em tampão citrato 0,01M, pH=6,0 e colocadas em câmara pressurizada (Pascal, DakoCytomation, Dinamarca) por 3 min. As lâminas foram dispostas em bandejas especiais e receberam os anticorpos primários diluídos em albumina bovina sérica (BSA) 1%, permanecendo incubados a 4°C *overnight*. Em seguida, foram aplicados os anticorpos secundários, seguidos do polímero de detecção, por 30 min cada um (HiDef Detection TM, HRP System, 954D-30, Cell Marque, Rocklin, CA, USA). Para a etapa de revelação, foi utilizada solução de 3,3' diaminobenzidina (DAB Dako Cytomation, K3468) por 5 min, e a contracoloração foi feita com Hematoxilina de Harris. Os cortes foram desidratados em etanol com graduações crescentes (60%, 65%, 95% e 100%) e diafanizados em xilol, sendo as lâminas,

por fim, montadas em resina sintética (Permount, FISHER SP, 15-500). Na leitura das reações foram considerados os critérios de intensidade e extensão da imunomarcação: A) intensidade, variando de 0 a 3 (onde 0 = marcação nula, 1 = fraca, 2 = moderada, 3 = forte), e B) extensão, variando de 0 a 3 (onde 0 = marcação nula, 1 = até 1/3 do core, 2 = de 1/3 a 2/3 do core, 3 = acima de 2/3 do core).

Ensaio de expressão de miRNA em larga escala

Foram selecionadas 4 amostras de casos confirmados de SH. O RNA total das amostras será isolado com o reagente Trizol (*Invitrogen Life Science Technologies, Carlsbad, CA, USA*) conforme recomendações do fabricante e será estocado em freezer -80°C até a utilização. A quantificação da expressão de miRNAs será realizada pelo sistema *TaqMan Human MicroRNA Assay Set v2.0 (Applied Biosystems)* no aparelho *7900 HT Fast Real Time PCR (Applied Biosystems)*. Para a síntese de cDNA será utilizado um conjunto de iniciadores pré-definidos desenhados de forma que permaneçam em uma estrutura de *loop (Megaplex™ RT Primers, Applied Biosystems)*. O *pool* de iniciadores *Megaplex RT primers (Human Pool A)* será utilizado para os ensaios com as plataformas de *array*. Este kit contém iniciadores para 377 miRNAs específicos e para três miRNAs controles endógenos e um controle negativo. Para a síntese de cDNA será utilizado 3 µL (350ng) de RNA total e 4.5 µL do mix de reação *Megaplex™ RT Primers A (Applied Biosystems)* em um volume final de 7,5µL de reação por amostra, segundo as instruções do fabricante (*Applied Biosystems*). Uma vez convertido em cDNAs, estes miRNAs serão submetidos a uma etapa de

amplificação utilizando o Kit *Megaplex™ PreAmp Primers Human Pool A* e *TaqMan® PreAmp Master Mix (Applied Biosystems)*. Para a PCR serão adicionados 450µL de *TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG, 2X (Applied Biosystems)*, 6µL do produto amplificado e 444µL de água, deste mix, um volume de 100 µL será transferido para cada uma das 8 portas de entrada da plataforma *TaqMan MicroRNA Array* que são conectadas por canais de microfluidos até os 48 *micro-wells* que contém os *primer/probe TaqMan* liofilizados. A plataforma será centrifugada duas vezes por 1 minuto a 1200 rpm para distribuição uniforme do líquido na porta de entrada da plataforma a cada um dos *micro-wells*. A plataforma será selada e levada ao *Biosystems Prism 7900HT Fast Real-Time PCR sequence detection System (Applied Biosystems)* para quantificar os níveis de expressão de cada miRNA. As condições da PCR serão as que seguem: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 94,5°C, 30 segundos a 97°C, 1 minuto a 59.7°C durante 40 ciclos.

Análise estatística

Trata-se de uma análise retrospectiva e descritiva. As comparações entre os valores de expressão de miRNA para os grupos serão realizadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para quantificação da expressão dos miRNA de interesse utilizou-se o modelo matemático proposto por PFAFFL (2001).

RESULTADOS

Dos 47 casos representados no TMA, a distribuição de hipóteses diagnósticas prévias à consulta em ordem decrescente, foi: metástase de carcinoma indiferenciado (21 casos – 31,8%), metástase de melanoma (14 casos – 21,2%), outros diagnósticos (9 casos – 13,6%), linfoma anaplásico (6 casos – 9%), linfoma de Hodgkin depleção linfocítica (5 casos – 7,5%), linfoma difuso de grandes células B (4 casos – 6%), lesões histiocíticas malignas sem especificação (3 casos – 4,5%), e sarcoma fusocelular (3 casos – 4,5%). Dentro do grupo “outros diagnósticos”, estão: linfoma sem especificação, linfoma não-Hodgkin com predomínio histiocítico, fibro-histiocitoma maligno, e neoplasia indiferenciada sem especificação. Vale pontuar que o maior número de hipóteses diagnósticas se deve ao fato de que, em diversos casos, o patologista do serviço de origem enviou mais de uma hipótese (47 casos representados e 66 hipóteses diagnósticas). O **Gráfico 1** ilustra a distribuição das hipóteses diagnósticas de casos incluídos na plataforma de TMA.

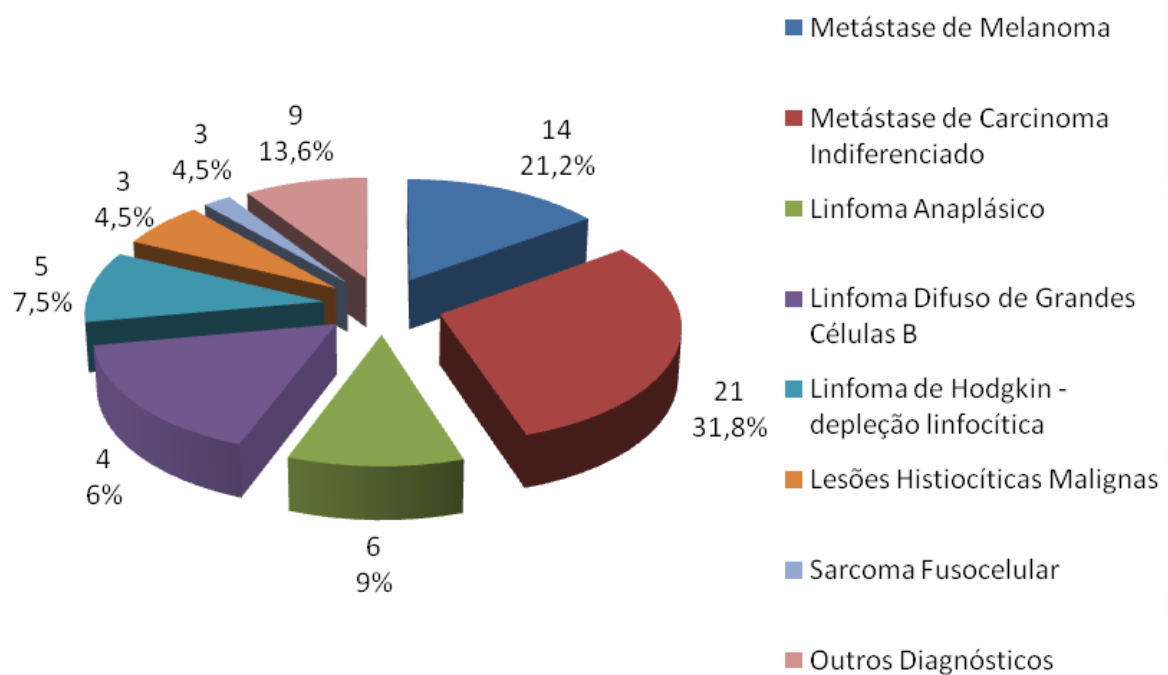


Gráfico 1 – Distribuição (número de casos / %) das hipóteses diagnósticas dos casos do TMA .

Observa-se que: **57,5% dos casos foram enviados** com hipóteses diagnósticas **não relacionadas** a neoplasias malignas linfo-hemopoéticas (metástase de melanoma, metástase de carcinoma indiferenciado e sarcoma fusocelular).

Avaliação morfológica:

Tamanho celular médio a grande foi observado em 47 casos (100%), citoplasma eosinofílico e vacuolado em 40 casos (85%), cromatina vacuolada em 37 casos (78%), morfologia epitelióide e apoptose em 35 casos (74%), presença de infiltrado inflamatório peritumoral em 32 casos (68%), presença de coesividade celular em 28 casos (60%), presença de células bizarras em 25 casos (53%), carioteca irregular em 24 casos (51%), inclusão nuclear em 12 casos (25,5%), hemofagocitose em 9 casos (19%), e depósito de hemossiderina em apenas 2 casos (4%). **Tabela1/ Fig.1.**

Tabela.1 – Características morfológicas dos 47 casos avaliados

Tamanho celular médio a grande	100%
Citoplasma eosinofílico e vacuolado	85%
Cromatina vacuolada	78%
Morfologia epitelióide e apoptose	74%
Infiltrado inflamatório	68%
Coesividade celular	60%
Células bizarras	53%
Carioteca irregular	51%
Inclusão nuclear	25,5%
Hemofagocitose	19%
Hemossiderina	4%

Numeração dos critérios conforme descrição morfológica:

(1) tamanho celular (médio a grande), (2) presença de cromatina vacuolada, (3) presença de carioteca irregular, (4) presença de inclusão nuclear, (5) citoplasma eosinofílico vacuolado, (6) células bizarras, (7) coesividade, (8) morfologia epitelióide, (9) hemofagocitose, (10) infiltrado inflamatório, (11) hemossiderina, e apoptose (12).

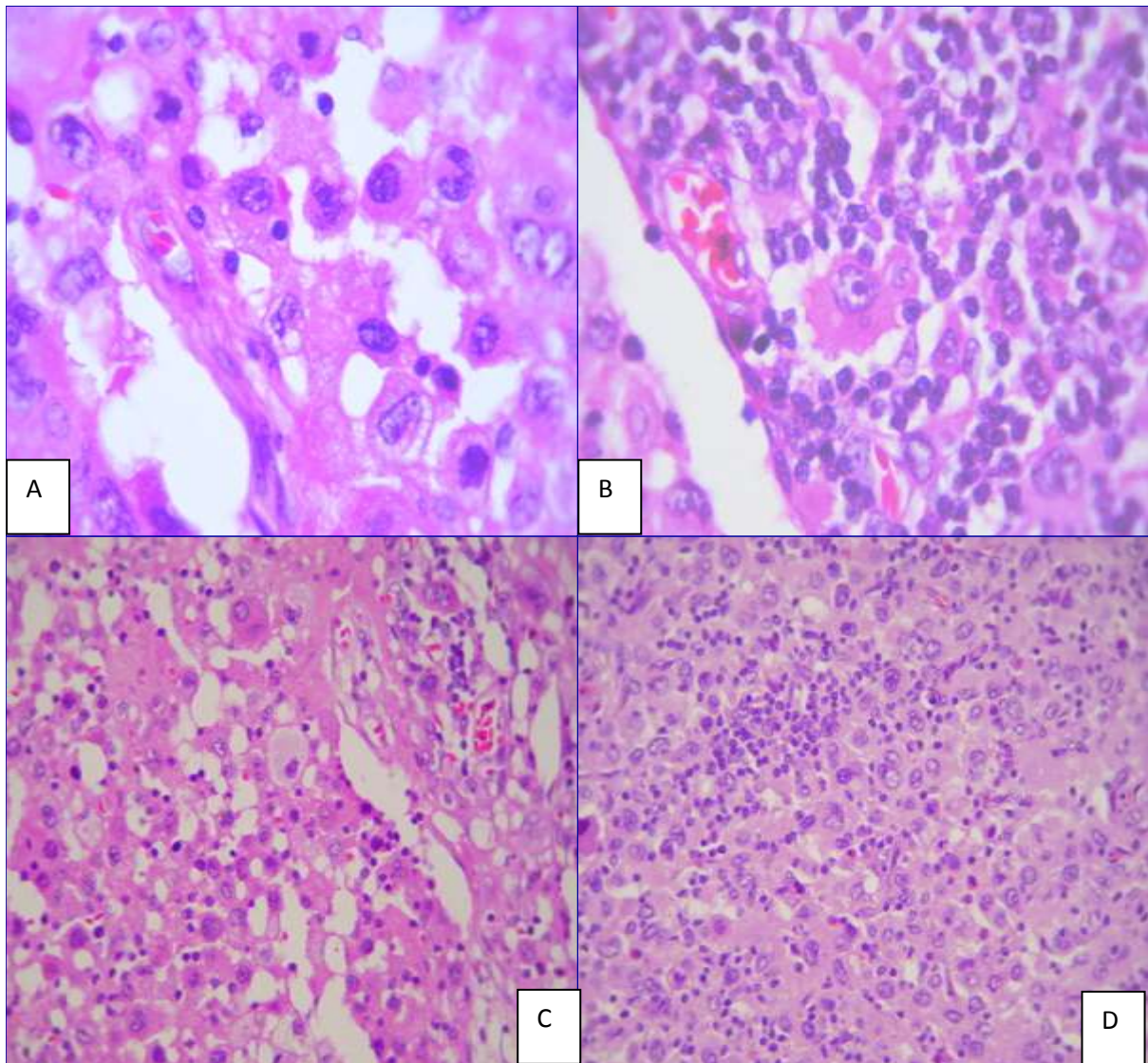


Fig.1 – Aspectos morfológicos avaliados na coloração de Hematoxilina Eosina: A) células grandes, coesividade celular, eosinofilia citoplasmática, citoplasma vacuolado, núcleos pleomórficos, nucléolos evidentes; B), C) e D) infiltrado inflamatório, fagocitose de linfócitos H.E. 400X e 100X.

Estudo Imunoistoquímico:

O estudo imunoistoquímico, das plataformas de TMA, revelou **Fig.2:**

1- Lisozima: 47 amostras sendo encontrados 1 caso positivo (intensidade / extensão = 2/3).

2- S-100: 47 amostras incluídas, sendo encontrado 2 casos positivos (intensidade / extensão = 3/3).

3- Vimentina: 47 amostras incluídas, sendo **todos os casos negativos.**

4- CD68: 47 amostras incluídas, **sendo encontrados 7 casos positivos, difusamente** (intensidade / extensão = 3/2).

5- CD163: 47 amostras incluídas, sendo encontrados **7 casos positivos (todos com positividade intensa e difusa 3/3).**

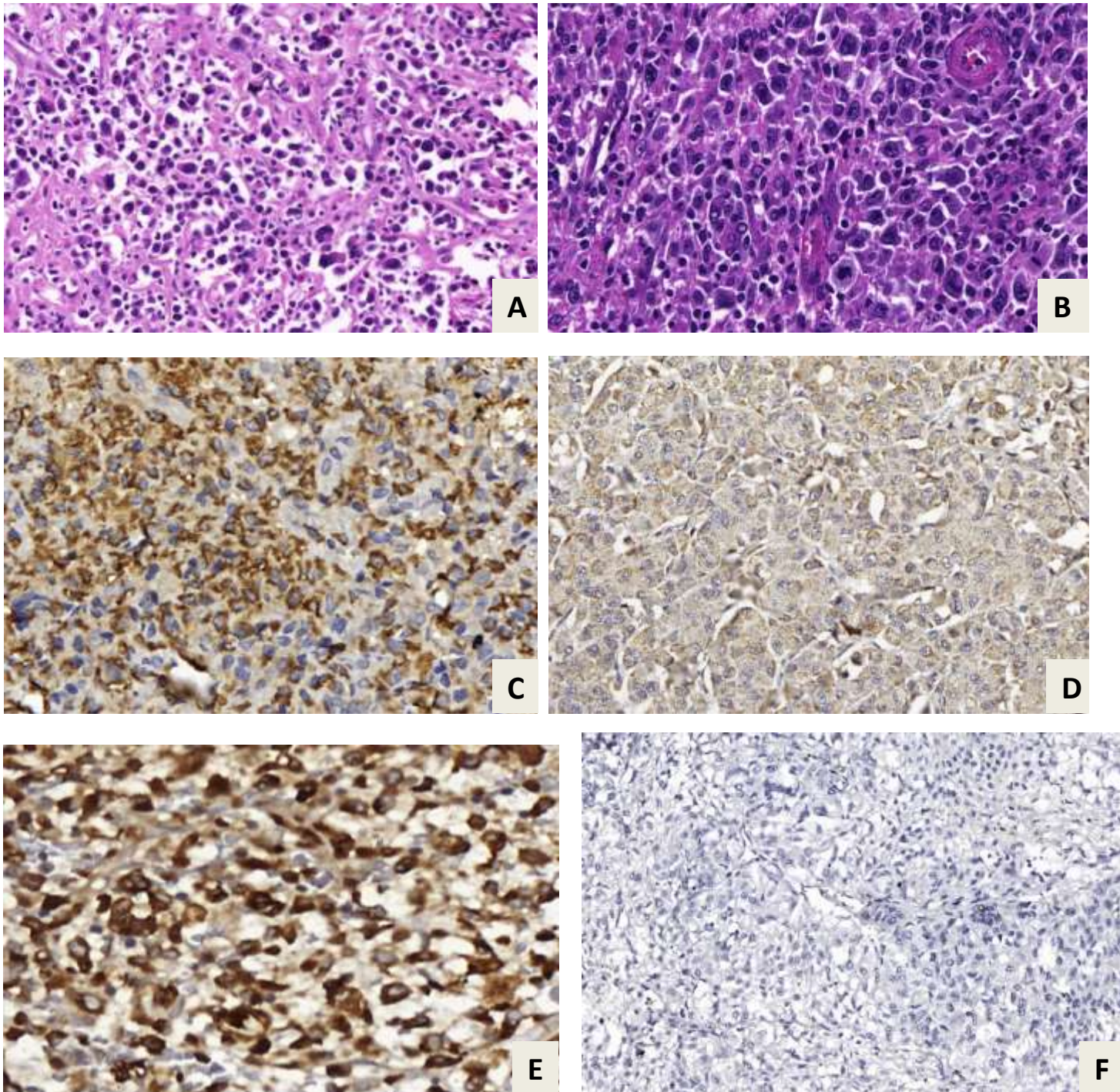


Fig. 2 -A) e B) Caso estudado com morfologia indeterminada. HE, 200X.
C) Análise imunoistoquímica: marcador CD68 positivo, confirmando SH. IMH, 200X;
D) Análise imunoistoquímica: marcador Lizosima positivo, confirmando SH. IMH, 200X;
E) Análise imunoistoquímica: marcador CD 163 positivo, confirmando SH. IMH, 400X;
F) Análise imunoistoquímica: marcador Vimentina negativo. IMH, 200X;

O diagnóstico de SH foi firmado a partir do achado da positividade de pelo menos um marcador de linhagem histiocítica (CD68 e CD163) associado à presença de critérios morfológicos descritos previamente, conforme proposto pela literatura⁷.

Foram observados sete casos positivos para CD68, que também o foram para CD163, não sendo observados casos com positividade isolada para nenhum desses marcadores. Esses casos foram negativos para lisozima, vimentina, e proteína-S100.

A **Tabela 3** apresenta características epidemiológicas, morfológicas e perfil imunoistoquímico de todos os casos de SH diagnosticados no serviço de Patologia da FMB-UNESP.

Tabela 3 – Distribuição das características dos casos de SH diagnosticados no serviço de Patologia da FMB-UNESP

CO	HD Prévia	Diagnóstico final	Sexo	Idade (anos)	Etnia	Sítio primário	Marcadores Positivos	Aspectos Morfológicos
CO 1	NE	SH	masculino	30	branco	pele	CD68, CD163, Vimentina, Lisozima, S100	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12
CO 2	NE	SH	feminino	65	branca	linfonodo	CD68, CD163, Vimentina, Lisozima, S100	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11
CO 3	NE	SH	feminino	42	branca	intestino	CD68, CD163, Vimentina, Lisozima, S100	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12
CO 4	TT/CEM*	TT/CEM+SH	masculino	21	branco	MO	CD68, CD163, Lisozima	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10
CO 5	NISE	SH	ND	ND	ND	ND	CD68, CD163	1, 5, 7, 8, 12
CO 6	MCI	SH	ND	ND	ND	ND	CD68, CD163	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 12
CO 7	MM, LSE	SH	feminino	70	branca	linfonodo	CD68, CD163	1, 2, 3, 5, 6, 8, 10, 12
CO 8	NISE	SH	masculino	71	branco	linfonodo	CD68, CD163	1, 2, 3, 7, 8, 12
CO 9	SH	SH	feminino	74	branca	linfonodo	CD68, CD163	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10
CO 10	SH	SH	ND	ND	ND	pele	CD68, CD163	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12
CO 11	LDGCB, SH	SH	feminino	ND	ND	pele	CD68, CD163	1, 2, 5, 6, 7, 8, 9

Abreviações: CO – casos para consultoria; HD – hipótese diagnóstica; SH – Sarcoma Histiocítico; MCI – Metástase de Carcinoma indiferenciado; MM – metástase de melanoma; LDGCB – linfoma difuso de grandes células B; NISE – neoplasia indiferenciada sem especificação; LSE – linfoma sem especificação; TT – teratoma; CEM – carcinoma embrionário do mediastino; NE – não existente; ND – não disponibilizado; *TT/CEM foram diagnósticos sincrônicos; Números dos critérios morfológicos: (1) tamanho celular médio e grande; (2) cromatina vacuolada; (3) carioteca irregular; (4) inclusão nuclear; (5) citoplasma eosinofílico vacuolado; (6) células bizarras; (7) coesividade; (8) morfologia epitelíode; (9) hemofagocitose; (10) infiltrado inflamatório; (11) depósito de hemossiderina; (12) presença de apoptose; DDE – diagnosticado durante o estudo, de modo prospectivo

Conforme apresentado na **Tabela 3**, foram diagnosticados 07 (14,8%) casos de SH no serviço de Patologia da FMB-UNESP, após revisão morfológica e painel selecionado. Foram incluídos quatro casos previamente diagnosticados antes do início do estudo (CO1 a CO4), um deles diagnosticado no período do estudo (CO4). É importante destacar que dentre os 07 casos diagnosticados de modo retrospectivo, em apenas três a hipótese de SH estava presente apenas pela morfologia; nos demais casos, a avaliação morfológica em si não foi suficiente para o diagnóstico, permitindo apenas hipóteses não especificadas (como carcinoma, linfoma, neoplasia indiferenciada) ou mesmo outros diagnóstico (como metástases de melanoma ou de carcinoma indiferenciado). Os dois principais diagnósticos diferenciais mais frequentemente, que necessitaram de avaliação imunoistoquímica para confirmar ou afastar a hipótese de SH, **foram metástase de Neoplasia indiferenciada sem especificação, Metástase de Carcinoma e Metástase de Melanoma.**

Resultados no miRNA

A análise do perfil de miRNA obtido de quatro amostras de SH com diagnóstico confirmado, em comparação com o controles (linfócitos periférico), mostrou “clusterização” definida pela baixa ou hiper-expressão de miRNA. **Figura 3.**

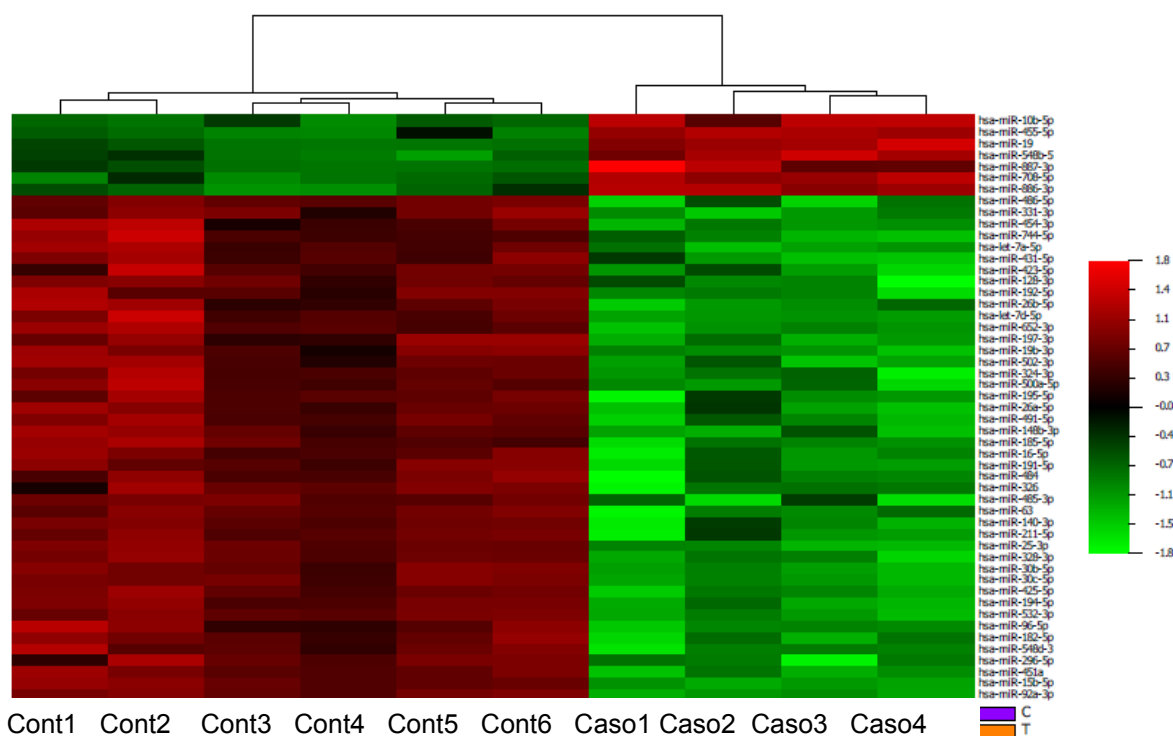


Fig.3 - Matriz de expressão do perfil de miRNAs de quatro amostras de SH humanos e seis controles: “clusterização” demonstrando hiper expressão (vermelho) e baixa expressão (verde). Dendograma horizontal representados pelos miRNA e vertical pelos casos controle (Cont) e casos estudados (Caso).

Foram analisados 377 miRNA, destes, 51 se mostraram diferentemente expressos, quando comparados com linfócitos normais (controle) (FDR $p \leq 0,0001$): 44 exibiram baixa expressão (verde) e 07 hiperexpressão (vermelho)

Figura 3 e Anexo 1. Dos miRNA hiperexpressos com FC alto, os mais relevantes

são: miR-10b-5p, miR-455-5p e miR-19; dos baixo regulados com FC negativo destaca-se miR-486-5p, miR-92a, miR-15b-5p. **Anexo1**

As possíveis vias indiretas de sinalização celular associadas a estes miRNAs são: as vias de crescimento e proliferação celular e apoptose. **Figura 4.**

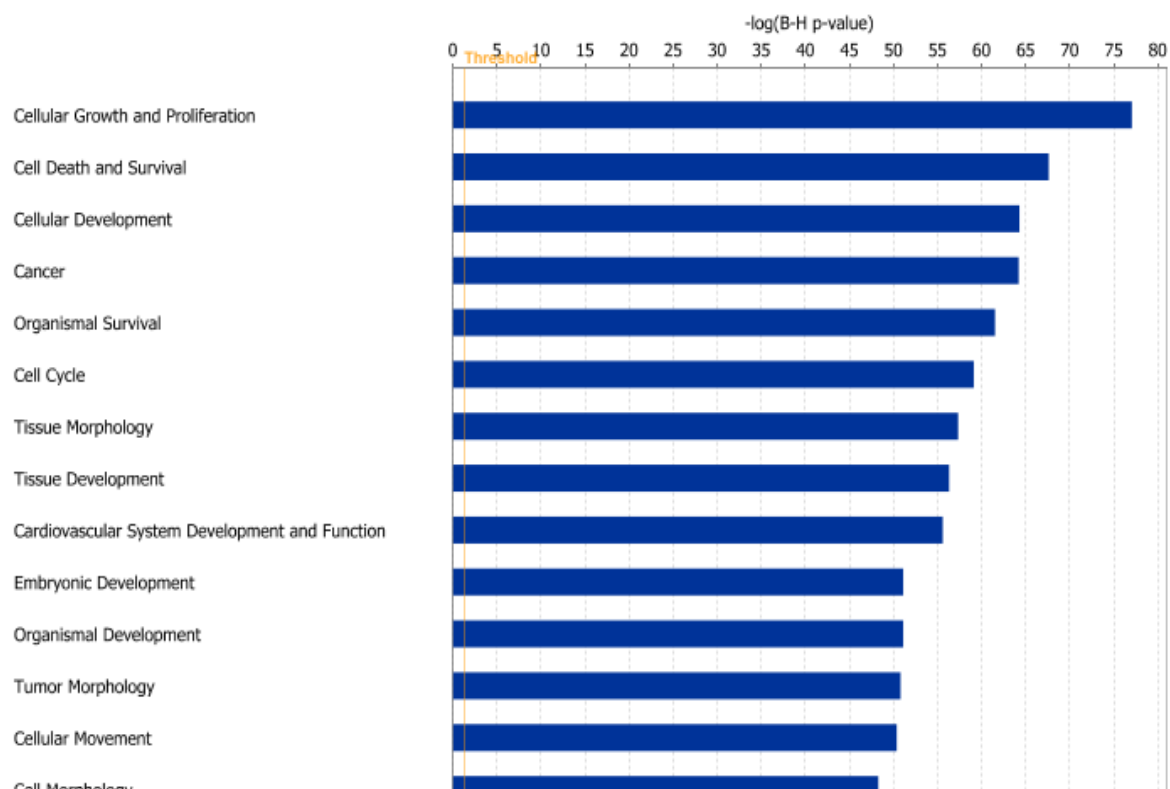


Fig. 4 - Principais vias de sinalização celular associadas aos miRNAs de quatro amostras de SH humano.

Tais vias de sinalização são observadas em outras neoplasias malignas, com destaque para Leucemia Mieloide Crônica. **Figura 5.**

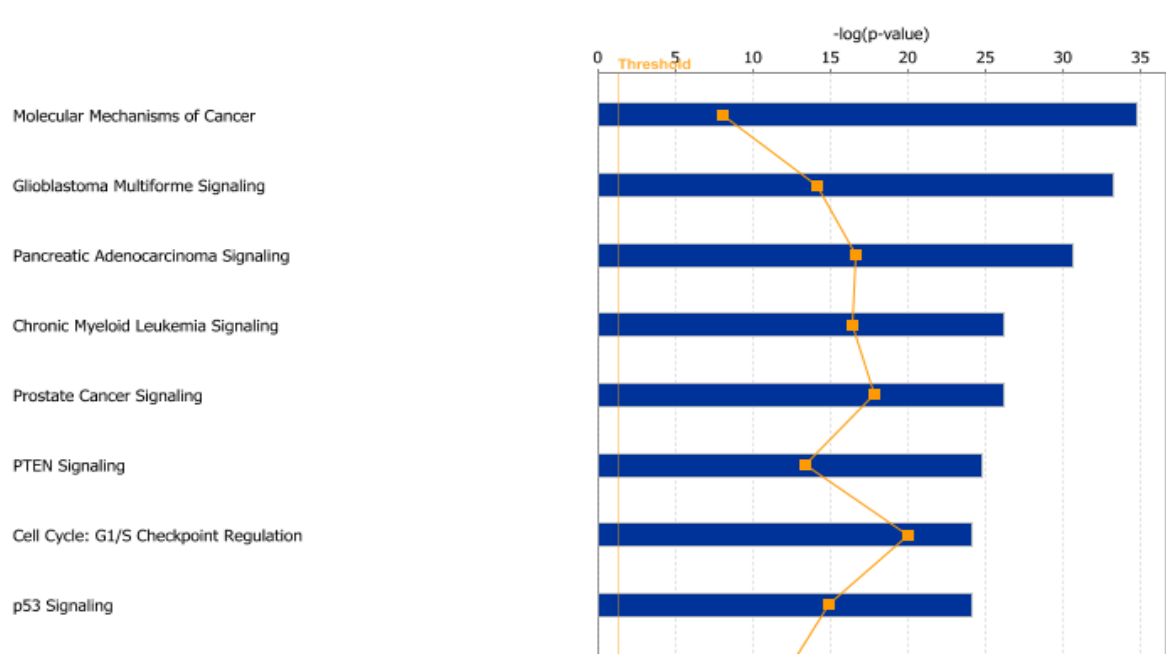


Fig. 5 - Vias canônicas da expressão de miRNA em SH humano: vias comuns a outras neoplasias malignas.

Análises realizadas no *Ingenuity Systems* demonstram que os prováveis genes alvo ERBB2, TGFB1, TNF encontram-se ativados e TP53 e PD98059, inibidos.

DISCUSSÃO

O SH é uma neoplasia rara, perfazendo menos de 1% dos linfomas não-Hodgkin e seu comportamento biológico, de modo geral, é agressivo^{1,2}. Controvérsias históricas existentes em sua terminologia, critérios diagnósticos e, grande variabilidade de apresentação clínica, têm dificultado sua caracterização e reconhecimento, possivelmente levando a diagnósticos equivocados^{2,4}. Apesar do crescimento no número de estudos sobre a patogênese desta neoplasia, bem como a busca por possíveis fatores prognósticos, a limitação ainda é clara. Esta

decorre da raridade da doença e da casuística limitada observada na literatura, sendo a maior a de JAFFE e col., 2004, com o estudo, multicêntrico relatando 15 casos com apresentação clínica extra-nodal¹. O advento da imunohistoquímica e de sua acessibilidade, fez com que diversas neoplasias pleomórficas, antes diagnosticadas como carcinomas anaplásicos, linfomas anaplásicos, melanomas, dentre outros, fossem confirmadas como SH¹. Este fato gerou a seguinte hipótese: para diagnóstico de SH, além dos critérios morfológicos, a complementação por estudo imunohistoquímico, com marcadores mais específicos levariam a diagnósticos mais precisos? Atualmente, é preconizado que o diagnóstico de SH deva ser feito baseado na morfologia, associada à presença de um dos marcadores de linhagem histiocítica, a saber: CD68 e CD163⁷. Nossos resultados embasam as teorias acima, quando demonstra que 07 (14%) casos, dentre 47 revisados, foram subdiagnosticados. Isso se deu devido ao fato de não estarem incluídos, no painel imunohistoquímico inicial, os marcadores CD68 e/ou CD163. Em concordância com a literatura, a positividade dos marcadores CD68 e/ou CD163 se mostrou de forte (intensidade entre 2 e 3) e difusa (extensão entre 2 e 3); não foi observada expressão focal para nenhum desses marcadores. Na nossa casuística os diagnósticos morfológicos, que levaram ao maior conflito com o diagnóstico de SH foram: Carcinoma Indiferenciado, incluído nas hipóteses de Neoplasia indiferenciada não especificada e Melanoma Metastático. Observamos ainda que, a presença de um único marcador imunohistoquímico específico associado à linhagem histiocítica, e a presença de critérios morfológicos selecionados, pós-revisão, como: tamanho celular (células grande e médias), citoplasma eosinofílico e vacuolado, coesividade celular e apoptose e presença de infiltrado inflamatório intra tumoral, foram suficientes para ao diagnóstico final de

SH. Este dado tem interesse clínico imediato, visto que, nos casos de neoplasias indiferenciadas metastáticas, com sítio primário desconhecido, a suspeita de SH deve ser firmada ou afastada com um marcador de linhagem histiocítica que, necessariamente, deva ser incluído no painel de imunohistoquímico.

Interessante observar que, 100% dos casos novos encontrados na revisão, tiveram a imunopositividade negativa para vimentina e S100. Explica-se este fato pela qualidade do material estocado, que conforme descrições prévias, pode ser avaliada pela pesquisa deste marcador: a negatividade da vimentina no estroma das neoplasias indica que o material estocado apresenta restrições quanto ao seu uso para pesquisas moleculares e imunohistoquímica. Essa associação é descrita na literatura, como no estudo realizado por Shinoda e cols. (2009)¹⁸.

Apesar das dificuldades técnicas detectadas, a análise do perfil miRNA foi eficiente. Os miRNA correspondem a pequenas sequências de 20 a 24 nucleotídeos que atuam na regulação da expressão gênica pela repressão da tradução ou degradação do transcrito^{35,36}. Os miRNAs têm um importante papel em processos biológicos normais como desenvolvimento, apoptose, diferenciação e proliferação celular, contribuindo também com o desenvolvimento e progressão de diversos tipos tumorais^{37,38}. Observamos que, a fragmentação do DNA das amostras incluídas em parafina, não interferiu na análise dos miRNA, visto que estes são de tamanhos diminutos e podem ser detectados em plataformas robustas e específicas. Nossos resultados são inéditos ao relacionar um perfil para SH de 51 miRNA diferentemente expressos; destes 07 estão hiperexpressos e 44 apresentaram baixa expressão, sendo os mais relevantes: miR-10b-5p, miR-455-5p e miR-19 (hiper expressos) e miR-486-5p, miR-92a, miR-15b-5p (baixo

regulados). Este perfil indica a existência de alterações de miRNA associados a vias de crescimento e proliferação celular, e principalmente as vias intrínseca e extrínseca da apoptose. A principal associação molecular, com outras neoplasias malignas se dá com perfil da Leucemia Mieloide Crônica. Estes resultados apontam para possíveis genes envolvidos na patogenia e candidatos a validação em futuros estudos: ERBB2, TGFB1, TNF (ativados) e TP53 e PD98059, inibidos. Tais genes podem corresponder a futuros alvos terapêuticos.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization Classification of Tumors: pathology and genetics tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2001.
 2. Vos JA, Abbondanzo SL, Barekman CL, Andriko JW, Miettinen M, Aguilera NS. Histiocytic sarcoma: a study of five cases including the histiocyte marker CD163. *Mod Pathol.* 2005; 18:693-704.
 3. Mathé G, Gerard Marchant R, Texier JL, Schlumberger JR, Berumen L, Paintrond M. The two varieties of lymphoid tissue reticulosarcomas, histiocytic and histioblastic types. *Br J Cancer.* 1970; 24:687-695.
 4. Hornick JL, Jaffe ES, Fletcher CD. Extranodal histiocytic sarcoma. Clinicopathologic analysis of 14 cases of a rare epithelioid malignancy. *Am J Surg Pathol.* 2004; 28:1133-44.
 5. Dalia S, Shao H, Sagatis E, Cualing H, Sokol I. Dendritic Cells and Histiocytic Neoplasms: Biology, diagnosis and treatment. *Cancer Control.* 2014; 21:290-300.
 6. Soria C, Orradre JL, Garcia-Almagro D, Martinez B, Algara P, Piris MA. True histiocytic lymphoma (monocytic sarcoma). *Am J Dermatopathol.* 1992; 14:511-7.
 7. Takahashi E, Nakamura S. Histiocytic sarcoma : an updated literature review based on the 2008 WHO classification. *J Clin Exp Hematop.* 2013;53(1):1-8.
-

8. Copie-Bergman C, Wotherspoon AC, Norton AJ, Diss TC, Isaacson PG. True histiocytic lymphoma: A morphologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 13 cases. *Am J Surg Pathol.* 1998; 22:1386-92.
 9. Pileri SA, Grogan TM, Harris NL, Banks P, Campo E, Chan JKC, et al. Tumours of histiocytes and accessory dendritic cells: An immunohistochemical approach to classification from the International Lymphoma Study Group based on 61 cases. *Histopathology.* 2002; 41:1-29.
 10. Congyang L, Xinggui W, Hao L, Weihua H. Synchronous histiocytic sarcoma and diffuse large B cell lymphoma involving the stomach: a case report and review of the literature. *Int J Hemat.* 93:247-52, 2011.
 11. Laviv Y, Zagzag D, Fichman-Horn S, Michowitz S. Primary central nervous system histiocytic sarcoma. *Brain Tumor Pathol.* 2013 Jul; 30(3):192-5
 12. Wang J, Li T, Chen H, Liu Q. A case of primary central nervous system histiocytic sarcoma. *Clin Neurol Neurosurg.* 2012.
 13. Gomi K, Tanaka M, Yoshida M, Ito S, Sonoda M, Iwasaki F, Niwa T, Aida N, Kigasawa H, Tanaka Y. Primary cerebellar histiocytic sarcoma in a 17-month-old girl: Case report. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics* Vol. 10 / No. 2, Pages 126-129, 2012
 14. Sim J, Yun-Yan H, Leung R, So J, Kwong Y. Histiocytic sarcoma simulating immune thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol;* 92(4): 555–556, 2013
-

15. Yamada S, Tasaki T, Satoh N, Nabeshima A, Kitada S, Noguchi H, Yamada K, Takeshita M, Sasaguri Y. Primary splenic histiocytic sarcoma complicated with prolonged idiopathic thrombocytopenia and secondary bone marrow involvement: a unique surgical case presenting with splenomegaly but non-nodular lesions. *Diagn Pathol*; 7: 143, 2012.
 16. Hure MC, Elco CP, Ward D, Hutchinson L, Meng X, Dorfman D, Yu H. Histiocytic sarcoma arising from clonally related mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2012; 30(5):49-53.
 17. Patnaik A, Mishra S, Senapati S. A rare case of primary extranodal, extradural histiocytic sarcoma of the thoracic spine and review of literature. *Surg Neurol Int*. 2012; 3: 96.
 18. Shinoda H, Yoshida A, Teruya-Feldstein J. Malignant histiocytoses/disseminated histiocytic sarcoma with hemophagocytic syndrome in a patient with mediastinal germ cell tumor. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*.;17(4):338-44, 2009
 19. Feldman AL, Arber DA, Pittaluga S, Martinez A, Burke JS, Raffeld M, Camos M, Warnke R, Jaffe ES. Clonally related follicular lymphomas and histiocytic/dendritic cell sarcomas: evidence for transdifferentiation of the follicular lymphoma clone. *Blood*. 2008 Jun 15;111(12):5433-9.
 20. Shao H, Xi L, Raffeld M, Feldman AL, Ketterling RP, Knudson R, Rodriguez-Canales J, Hanson J, Pittaluga S, Jaffe ES. Clonally related histiocytic/dendritic cell sarcoma and chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma: a study of seven cases. *Mod Pathol*. 2011 Nov;24(11):1421-32.
-

21. Wang E, Papalas J, Hutchinson CB, *et al.* Sequential development of histiocytic sarcoma and diffuse large b-cell lymphoma in a patient with a remote history of follicular lymphoma with genotypic evidence of a clonal relationship: a divergent (bilineal) neoplastic transformation of an indolent B-cell lymphoma in a single individual. *Am J Surg Pathol* 2011;35:457–463.
 22. Van der Valk P, Meijer CJ, Willenzi R, Van Oosteron AT, Spandeeer PJ, te Velte J. Histiocytic sarcoma (true histiocytic lymphoma): a clinicopathological study of 20 cases. *Histopathology*, 8:105-123, 1984.
 23. Loheler J, Franz T, Fusco A, Pragnell I, Ostertag W. Murine retrovirus-induced malignant histiocytosis, an experimental model for the disease in humans. *Leukemia* 1:58-59, 1987.
 24. Muraresco ED, Lyghezan R, Negru D, Chiselita IR, Plamadeala P, Mihailovici MS. *Rom J Morphol Embryol*. 2005;46(3):183-7.
 25. Hedan B, Thomas R, Motsinger-Reif A, Abadie J, Andre C, Cullen J, Breen M. Molecular cytogenetic characterization of canine histiocytic sarcoma: A spontaneous model for human histiocytic cancer identifies deletion of tumor suppressor genes and highlights influence of genetic background on tumor behavior. *BMC Cancer*. 26;11:201, 2011.
 26. Weintraub M, Bhatia KG, Chandra RS, Magrath IT, Ladisch S: p53 expression in Langerhans cell histiocytosis. *J Pediatr Hematol Oncol* 20:12-17, 1998.
 27. Bank MI, Rengtved P, Carstensen H, Petersen BL: p53 expression in biopsies from children with Langerhans cell histiocytosis. *J Pediatr Hematol Oncol*. 24:733-736, 2002.
-

28. Leroux D, Mugneret F, Callanan M, Radford-Weiss I, Dastugue N, Feuillard J, Le Mee F, Plessis G, Talmant P, Gachard N, et al: CD4(+), CD56(+) DC2 acute leukemia is characterized by recurrent clonal chromosomal changes affecting 6 major targets: a study of 21 cases by the Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique. *Blood* 99:4154-4159, 2002.
 29. Murakami I, Gogusev J, Fournet JC, Glorion C, Jaubert F: Detection of molecular cytogenetic aberrations in langerhans cell histiocytosis of bone. *Hum Pathol.* 33:555-560, 2002.
 30. Sander B, Middel P, Gunawan B, Schulten HJ, Baum F, Golas MM, Schulze F, Grabbe E, Parwaresch R, Fuzesi L: Follicular dendritic cell sarcoma of the spleen. *Hum Pathol.* 38:668-672, 2007.
 31. Dacic S, Trusky C, Bakker A, Finkelstein SD, Yousem SA: Genotypic analysis of pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *Hum Pathol.* 34:1345-1349, 2003.
 32. Carrasco DR, Fenton T, Sukhdeo K, Protopopova M, Enos M, You MJ, Di Vizio D, Nogueira C, Stommel J, Pinkus GS, et al: The PTEN and INK4A/ARF tumor suppressors maintain myelolymphoid homeostasis and cooperate to constrain histiocytic sarcoma development in humans. *Cancer Cell* 9:379-390, 2006.
 33. Kumar R, Khan SP, Joshi DD, Shaw GR, Ketterling RP, Feldman AL: Pediatric histiocytic sarcoma clonally related to precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia with homozygous deletion of CDKN2A encoding p16(INK4A). *Pediatr Blood Cancer* 2010.
-

34. Esteller, M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet*, v.12, n.12, p.861-74, Dec 2011.
 35. Lee, R.C.; Ambros, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, v. 294, n. 5543, p. 862-4, Oct 2001
 36. Lim, L.P. et al. Vertebrate miRNA genes. *Science*, v. 299, n. 5612, p.1540, Mar 2003
 37. Bartel, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function cell, v. 116, n. 2, p. 281-97, jan 2004.
 38. Kloosterman, W.P.; Plasterk, R.H. The diverse functions of miRNAs in animal development and disease. *Dev Cell*, v. 11, n. 4, p. 441-50, Oct 2006
 39. Nagai MA, Fregnani JHTG, Netto MM, Brentani MM, Soares FA. in *Caenorhabditis elegans* Down-regulation of *PHLDA1* gene expression is associated with breast cancer progression. *Breast Cancer Res Treat.* 106:49-56, 2007.
-

Conclusões

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- SH não é apenas uma neoplasia hematopoética rara, mas também subdiagnosticada;
 - Na presença de aspectos morfológicos relevantes (células grandes e médias, citoplasma eosinofílico e vaculado, coesividade celular e apoptose, presença de infiltrado inflamatório intra tumoral) há necessidade da inclusão no painel imunohistoquímico de um marcador histiocitário específico;
 - Apesar das dificuldades encontradas ao longo do estudo, o achado de 07 novos casos subdiagnosticados pode ser considerado animador, e demonstra que os diagnósticos de Neoplasia Indiferenciada Inespecificada (Carcinoma Indiferenciados) Metastáticos e Melanoma Metastático, na ausência de sítio primário, devem fazer diferencial morfológico e imunohistoquímico com SH;
 - Resultados inéditos demonstram um perfil de 51 miRNA diferentemente expressos; destes 07 estão hiperexpressos e 44 apresentaram baixa expressão, sendo os mais relevantes: miR-10b-5p, miR-455-5p e miR-19 (hiper expressos) e miR-486-5p, miR-92a, miR-15b-5p (baixo regulados);
 - Este perfil indica a existência de alterações de miRNA associados a vias de crescimento e proliferação celular, e principalmente as vias intrínseca e extrínseca da apoptose;
 - A principal associação molecular, com outras neoplasias malignas se dá com perfil da Leucemia Mielóide Crônica;
 - Os principais genes envolvidos na patogênese e candidatos a validação
-

em futuros estudos: ERBB2, TGF β 1, TNF (ativados) e TP53 e PD98059 (inibidos). Tais genes podem corresponder a futuros alvos terapêuticos.

- O marcador vimentina é dependente da qualidade do material estocado e, como sugestão deveria ser pesquisado antes de análises genômicas em larga escala.

Anexo

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in class Tumor	Geom mean of intensities in class Normal	Fold-change T/N	MicroRNAID
1,40E-05	0,000151	0,00017	1	-5882,352941	hsa-miR-486-5p
< 1e-07	< 1e-07	0,002	1	-500	hsa-miR-92a-3p
< 1e-07	6,82E-06	0,002	1	-500	hsa-miR-15b-5p
8,00E-07	2,73E-05	0,0028	1	-357,1428571	hsa-miR-451a
6,55E-05	0,000397	0,003	1	-333,3333333	hsa-miR-485-3p
3,86E-05	0,000285	0,0033	1	-303,030303	hsa-miR-211-5p
5,16E-05	0,000335	0,0036	1	-277,7777778	hsa-miR-296-5p
< 1e-07	6,82E-06	0,0049	1	-204,0816327	hsa-miR-532-3p
2,00E-07	1,09E-05	0,005	1	-200	hsa-miR-25-3p
1,06E-05	0,000132	0,0062	1	-161,2903226	hsa-miR-63
3,56E-05	0,000278	0,0062	1	-161,2903226	hsa-miR-96-5p
3,24E-05	0,00026	0,0066	1	-151,5151515	hsa-miR-140-3p
1,30E-06	3,18E-05	0,0068	1	-147,0588235	hsa-miR-425-5p
1,00E-06	2,73E-05	0,0071	1	-140,8450704	hsa-miR-194-5p
1,00E-07	6,82E-06	0,0083	1	-120,4819277	hsa-miR-30c-5p
2,88E-05	0,000238	0,0087	1	-114,9425287	hsa-miR-548d-3
3,00E-07	1,17E-05	0,0088	1	-113,6363636	hsa-miR-30b-5p
1,03E-05	0,000132	0,0092	1	-108,6956522	hsa-miR-182-5p
1,36E-05	0,000151	0,0094	1	-106,3829787	hsa-let-7a-5p
1,40E-06	3,18E-05	0,0099	1	-101,010101	hsa-miR-328-3p
6,53E-05	0,000397	0,011	1	-90,90909091	hsa-miR-431-5p
1,75E-05	0,000171	0,013	1	-76,92307692	hsa-miR-185-5p
2,01E-05	0,000183	0,016	1	-66,66666667	hsa-miR-192-5p
8,27E-05	0,000452	0,016	1	-62,5	hsa-miR-423-5p
1,52E-05	0,000154	0,019	1	-52,63157895	hsa-miR-148b-3p
2,69E-05	0,000229	0,019	1	-52,63157895	hsa-miR-16-5p
6,82E-05	0,000405	0,02	1	-50	hsa-miR-484
6,43E-05	0,000397	0,021	1	-47,61904762	hsa-miR-128-3p
1,95E-05	0,000183	0,022	1	-45,45454545	hsa-miR-197-3p
5,50E-06	9,38E-05	0,026	1	-38,46153846	hsa-miR-652-3p
9,06E-05	0,000485	0,026	1	-38,46153846	hsa-miR-326
1,01E-05	0,000132	0,028	1	-35,71428571	hsa-miR-191-5p
4,71E-05	0,000321	0,031	1	-32,25806452	hsa-miR-26b-5p
1,44E-05	0,000151	0,033	1	-30,3030303	hsa-miR-19b-3p
7,60E-06	0,000112	0,036	1	-27,77777778	hsa-let-7d-5p
7,73E-05	0,000445	0,037	1	-27,02702703	hsa-miR-195-5p
2,66E-05	0,000229	0,038	1	-26,31578947	hsa-miR-500a-5p
3,73E-05	0,000283	0,039	1	-25,64102564	hsa-miR-502-3p
4,43E-05	0,00031	0,048	1	-20,83333333	hsa-miR-26a-5p
4,32E-05	0,00031	0,052	1	-19,23076923	hsa-miR-324-3p
1,43E-05	0,000151	0,065	1	-15,38461538	hsa-miR-491-5p
8,05E-05	0,000448	0,084	1	-11,9047619	hsa-miR-454-3p
7,30E-06	0,000112	0,091	1	-10,98901099	hsa-miR-331-3p
7,82E-05	0,000445	0,12	1	-8,333333333	hsa-miR-744-5p
1,70E-06	3,57E-05	52,62	1	52,62	hsa-miR-886-3p
1,00E-06	2,73E-05	61,71	1	61,64	hsa-miR-708-5p
5,04E-05	0,000335	458,25	1	458,25	hsa-miR-887-3p
7,80E-06	0,000112	747,02	1	747,88	hsa-miR-548b-5
3,00E-07	1,17E-05	1988,55	1	1988,55	hsa-miR-19
3,80E-06	7,41E-05	7940,42	1	7940,42	hsa-miR-455-5p
4,30E-06	7,83E-05	28674,89	1	28674,89	hsa-miR-10b-5p

