



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

Dominique Fonseca Rodrigues Lacet

**QUAL O SIGNIFICADO CLÍNICO-PATOLÓGICO DA
IMUNOEXPRESSÃO DE CD20 NO LINFOMA DE
HODGKIN CLÁSSICO?**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Claudino Oliveira

**Botucatu
2020**

Dominique Fonseca Rodrigues Lacet

QUAL O SIGNIFICADO CLÍNICO-PATOLÓGICO DA
IMUNOEXPRESSÃO DE CD20 NO LINFOMA DE
HODGKIN CLÁSSICO?

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Claudino Oliveira

Botucatu
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Lacet, Dominique Fonseca Rodrigues.

Qual o significado da imunoexpressão de CD20 no linfoma de Hodgkin clássico? / Dominique Fonseca Rodrigues Lacet.
- Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Cristiano Claudino Oliveira
Capes: 40105008

1. Hodgkin, Doença de. 2. Microambiente tumoral.
3. Linfoma. 4. Antígenos CD20. 5. Imunoistoquímica.

Palavras-chave: Antígeno CD20; Desfecho clínico; Doença de Hodgkin; Imunoistoquímica; Microambiente tumoral.

*Aos meus pais, Edir e Ana.
Ao meu marido, Thiago.*

AGRADECIMENTOS

Esse texto é sobre privilégios. No país da desigualdade social, da desigualdade racial, do machismo, tenho certeza que alguma pessoa em algum lugar do país sonha com o que tenho agora – e talvez não realize. E reconheço que, ainda que mulher, faço parte de um recorte elitista e branco, que teve e tem inúmeras oportunidades que se misturam com pessoas incríveis que se misturam com trocas, projetos, construções e privilégios.

Meus pais, Edir e Ana – a quem dedico esta tese – sempre tão batalhadores, me proporcionaram amor, valores, educação. E por causa deles entrei em medicina numa universidade pública. E na federal, conheci o Tico, meu amor, companheiro de vida e de profissão, que junto com meus pais formou o bonde dos apoiadores incondicionais das minhas empreitadas. Incluindo esta. Esta que começou em um estágio na Unesp, em uma conversa informal em um almoço ao acaso em uma padaria de Botucatu. Professor Cristiano, Cris, tão i-m-e-n-s-o na sua importância e generosidade que me faltam palavras para expressar minha gratidão.

Sou da lista de pessoas que fazem lista de tudo. E em tempos de túneis sem luz, dependemos cada vez mais uns dos outros na ciência (e na vida). Segue então a lista de quem também fez essas 96 páginas acontecerem. Dr. Paulo Guilherme, Rose, Lô e toda a equipe do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Luxemburgo pela torcida e pelo tempo dedicado às minhas solicitações. Profa. Flávia Freitas, Profa. Paula Piedade, Profa. Cibele Fontes e meus queridos alunos da UNIFENAS por permitirem a adequação dos meus horários ao doutorado. Frá, Jessiquinha, Rodrigo, Jéssica, Tayenne, Kamille e Logan por emprestar a mesa, o microscópio, o computador, as experiências e a companhia nos dias frios da cuesta. Dr. Marcelo Padovani pela disponibilização do TMA de seu mestrado. Professores da Unesp e colegas das disciplinas pelas trocas e aprendizados. Andrey pela ajuda na coleta dos dados. Técnicos e funcionários da Unesp e do Hospital São Luiz pela separação de blocos, confecção dos TMAs e lâminas. Luísa pela assistência tecnológica. Nenhum passo que dei pode ser desvinculado do passo que demos juntos.

Esse texto é sobre privilégios e agradecimentos. E de certo, não há como agradecer o suficiente. Há algo em mim muito maior que transborda neste momento.

Aqueles que se apaixonam pela prática sem se importar com a exatidão ou a ciência são como capitães que levam um navio sem timão e sem bússola; eles nunca estarão seguros sobre a rota seguida. A prática sempre deve estar edificada sobre uma boa teoria.

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

Introdução: O linfoma de Hodgkin (LH) possui uma composição celular única representada por uma minoria de células neoplásicas - células de Hodgkin e Reed-Sternberg (células HRS) - em um fundo inflamatório. Além da histologia, o diagnóstico também é definido pela imunoistoquímica (IHQ), com a maioria dos casos de LH clássico (LHc) expressando CD30, CD15 e PAX-5. A imunoexpressão do antígeno CD20 é variável e alguns estudos sugerem que ela pode representar uma intersecção entre a fisiopatologia do LH e o prognóstico clínico dos pacientes. Além disso, as investigações sobre o seu microambiente têm tido especial destaque nas investigações científicas da hematopatologia, vislumbrando aplicações terapêuticas.

Objetivo: Investigar a imunoexpressão de CD20 e de marcadores do microambiente tumoral no LHc, visando analisar as interfaces entre esses parâmetros e os aspectos clínico-morfológicos de interesse da onco-hematopatologia.

Métodos: Estudo retrospectivo com 184 pacientes com diagnóstico anatomopatológico de LHc. Dados clínicos foram revisados a partir dos prontuários médicos. Estudo morfológico e imunofenotípico com CD20, CD30, CD15, PAX-5, CD3, CD4, CD8, CD21, CD68, CD34, CD56, CD138, PD-1 e pesquisa de EBV por IHQ (LMP-1) e hibridização *in situ* cromogênica (CISH) foram realizados. Os dados foram tabulados e valor de p foi considerado significativo quando menor que 0,05.

Resultados: O fenótipo CD20-positivo foi encontrado em 45 (25,9%) do total de 174 pacientes com material disponível. Pacientes CD20-positivos nas células neoplásicas tendem a se curar antes, particularmente aqueles com menos de 10,5 células/CGA ($p=0,037$). À morfologia, a chance de um caso ser CD20-positivo é maior quando se tem granuloma ($p=0,034$, IC 95% 1,166-50,301). Em relação ao microambiente, o tempo até a cura foi menor nos pacientes CD20-positivos, sobretudo naqueles com mais de 25% de extensão de positividade ($p=0,0183$). O tempo até a cura ($p=0,0309$) e a taxa de óbitos ($p=0,016$) foram menores nos pacientes PD-1 negativos. Dentre os pacientes com presença de plasmócitos no microambiente, aqueles com menor número tendem a se curar antes ($p=0,0374$). Maior densidade vascular está associada a menor frequência de sintomas B ($p=0,036$) e à presença de recidiva da doença ($p=0,004$).

Conclusões: Há uma associação direta da positividade para CD20 nas células neoplásicas e no micromambiente do LHc a uma melhor evolução clínica. Há também

melhor prognóstico naqueles pacientes com ausência de imunoexpressão de PD-1, menor número de plasmócitos e menor densidade vascular. O microambiente é, certamente, cenário para estudos cada vez mais robustos sendo que os achados desse trabalho destacam os linfócitos B não neoplásicos, os plasmócitos, os linfócitos expressores de PD-1 e a densidade vascular, estão relacionados a marcadores de agressividade.

Palavras-chaves: Doença de Hodgkin, imunoistoquímica, antígeno CD20, microambiente tumoral, hibridização *in situ*, desfecho clínico.

ABSTRACT

Introduction: Hodgkin lymphoma (HL) has a unique cellular composition, containing a minority of neoplastic cells – Hodgkin and Reed-Sternberg (HRS) cells – in an inflammatory background. Beyond histology, the diagnosis is also defined by the immunophenotype, with most cases of classical HL (cHL) expressing CD30, CD15 and PAX-5. The CD20 immunoexpression is variable and it may represent an intersection between the pathophysiology of LH and the clinical prognosis of patients. In addition, investigations into its microenvironment have been given special importance in the hematopathology scientific investigations, for the purpose of therapeutic applications.

Objective: To investigate the CD20 immunoexpression and the tumor microenvironment markers in LHc, in order to analyze the interfaces between these parameters and the clinical-morphological aspects of interest in onco-hematopathology.

Methods: Retrospective study with 184 patients with pathological diagnosis of cHL. Clinical data were reviewed from medical records. Morphological and immunophenotypic study with CD20, CD30, CD15, PAX-5, CD3, CD4, CD8, CD21, CD68, CD34, CD56, CD138 and PD-1 were performed. EBV infection was tested by IHC (LMP-1) and in situ chromogenic hybridization (CISH). The data were tabulated and the p value less than 0.05 was considered significant.

Results: The CD20-positive phenotype was found in 45 (25,9%) of the total of 174 patients with available material. Patients with CD20 positivity on neoplastic cells tend to heal earlier, particularly those with less than 10.5 cells/CGA ($p=0.037$). On morphology, there was a greater chance of having CD20 positivity when there was granuloma ($p=0.034$, 95% CI 1.166-50.301). Regarding the microenvironment, the time to cure was shorter in CD20-positive patients, especially in those with more than 25% of positivity ($p=0.0183$). The time to cure ($p=0.0309$) and the death rate ($p=0.016$) were shorter in PD-1 negative patients. Among patients with the presence of plasma cells in the microenvironment, those with fewer numbers tend to heal earlier ($p=0.0374$). Higher vascular density is associated with lower frequency of B symptoms ($p=0.036$) and presence of disease recurrence ($p=0.004$).

Conclusions: There is a direct association of CD20 positivity in neoplastic cells and in microenvironment with a better clinical outcome. There is also a better prognosis in those patients with absence of PD-1 immunoexpression, fewer plasma cells and less

vascular density. The microenvironment is certainly the setting for increasingly robust studies and the findings of this work highlight non-neoplastic B lymphocytes, plasma cells, PD-1 lymphocytes and vascular density, related to aggressive behavior.

Keywords: *Hodgkin disease; immunohistochemistry; antigens, CD20; tumor microenvironment; in situ hybridization; patient outcome assessment.*

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Cenário de origem das células de Hodgkin e Reed-Sternberg no centro germinativo.

Figura 2. Células de Reed-Sternberg e suas variantes.

Figura 3. Subtipos histológicos do linfoma de Hodgkin clássico.

CAPÍTULO 2

Figura 1. Estimador de Kaplan-Meier do tempo até cura e do tempo até o óbito em relação à contagem de células neoplásicas CD20-positivas em 10 campos de grande aumento.

Figura 2. Estimador de Kaplan-Meier do tempo até cura e do tempo até o óbito em relação à porcentagem de linfócitos CD20-positivos no micromambiente.

Figura 3. Estimador de Kaplan-Meier do tempo até cura e do tempo até o óbito em relação ao CD138.

Figura 4. Estimador de Kaplan-Meier do tempo até cura e do tempo até o óbito em relação à porcentagem de linfócitos CD20-positivos no micromambiente.

Figura suplementar 1. Estimador de Kaplan-Meier do tempo até cura e do tempo até o óbito em relação à positividade para o CD20 nas células neoplásicas.

Figura suplementar 2. Imunoexpressão do CD20 nas células neoplásicas e no microambiente.

Figura suplementar 3. Estimador de Kaplan-Meier do tempo até cura e do tempo até o óbito em relação à contagem de células neoplásicas CD20-positivas no *hotspot*.

Figura suplementar 4. Estimador de Kaplan-Meier do tempo até o óbito em relação ao CD4 e CD8.

Figura suplementar 5. Estimador de Kaplan-Meier do tempo até o óbito em relação ao CD68.

Figura suplementar 6. Densidade e ectasia vascular (H&E).

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Frequência de detecção do Epstein-Barr vírus segundo os subtipos histológicos do LHc no Brasil.

Tabela 2. Sumário dos dados da literatura sobre a imunoexpressão do CD20 no linfoma de Hodgkin clássico.

Tabela 3. Estadiamento clínico dos linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin (Classificação de Ann Arbor modificada por Cotswolds).

Tabela 4. Status performance

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Características clinico-patológicas dos pacientes com linfoma de Hodgkin clássico CD20-positivos e CD20-negativos.

Tabela 2. Características morfológicas e imunofenóticas entre os grupos CD20-positivos e CD20-negativos.

Tabela 3. Correlação entre o número de células neoplásicas CD20+ e os elementos do microambiente

Tabela 4. Características clínicas em relação à densidade vascular.

Tabela 5. Poder diagnóstico do LMP1 na detecção da infecção pelo EBV, utilizando o EBER (CISH) como padrão-ouro.

Tabela suplementar 1. Características gerais dos pacientes com LHc.

Tabela suplementar 2. Características gerais dos pacientes com LHc CD20-negativos e CD20-positivos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABVD: doxorrubicina, bleomicina, vimblastina e dacarbazina

AP-1: proteína ativadora-1

BART: *BamHI-A rightward transcripts*

BCMA: antígeno de maturação de células B

BCR: receptor de antígeno de célula B

BEACOPP: bleomicina, etoposídeo, doxorrubicina, ciclofosfamida, vincristina, procarbazona e prednisona

BHRF1: *BamHI fragment H rightward open reading frame 1*

BSAP: *B-cell lineage specific activator protein*

β 2M: β 2 microglobulina

CD: *cluster of differentiation*

CG: centro germinativo

CGA: campo de grande aumento

CISH: hibridização *in situ* cromogênica

CM: celularidade mista

CIITA: *class II major histocompatibility complex transactivator*

DDR1: *discoidin domain receptor 1*

DHAP: dexametasona, cisplatina e citarabina

DL: depleção linfocitária

DMV: densidade microvascular

EBER: *EBV-encoded small RNA*

EBNA: *EBV-encoded nuclear antigens*

EBV: Epstein-Barr vírus

EN: esclerose nodular

EORTC: *European Organization for the Research and Treatment of Cancer*

FDA: *Food and Drug Administration*

GDP: gencitabina, dexametasona e cisplatina

HIV: vírus da imunodeficiência humana

HLA: antígeno leucocitário humano

HRS: Hodgkin e Reed-Sternberg

H&E: hematoxilina e eosina

ICE: ifosfamida, carboplatina e etoposídeo

IHQ: imunoistoquímica

IL: interleucina

INC: inclassificável

JAK/STAT: *janus kinase/signal transducers and activators of transcription*

LDH: desidrogenase láctica

LH: linfoma de Hodgkin

LHc: linfoma de Hodgkin clássico

LHcEN: linfoma de Hodgkin clássico esclerose nodular

LHcCM: linfoma de Hodgkin clássico celularidade mista

LHcRL: linfoma de Hodgkin clássico rico em linfócitos

LHcDL: linfoma de Hodgkin clássico depleção linfocitária

LHPLN: linfoma de Hodgkin predominância linfocitária nodular

LNH: linfoma não-Hodgkin

LMP: *latent membrane proteins*

MAPK/ERK: *mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases*

MHC: complexo principal de histocompatibilidade de classe

MS4A1: *membrane-spanning 4 domains, subfamily A, member 1*

NF-κB: *nuclear factor kappa B*

NK: *Natural Killers*

OMS: Organização Mundial da Saúde

PD-L1: *programmed cell death ligand 1*

PET: tomografia por emissão de pósitrons

PI3K/AKT: fosfatidilinositol 3-quinase/AKT

QT: quimioterapia

RANK: ativador de receptor do NF-κB

RL: rico em linfócitos

RS: Reed-Sternberg

RT: radioterapia

SNP: polimorfismo de nucleotídeo único

SSE: *status socioeconômico*

TACI: *transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor*

TARC: *thymus- and activation-regulated chemokine*

TGFβ1: *transforming growth factor beta-1*

Th: T helper

TIA1: *cytotoxic granule-associated RNA binding protein*

TMA: *tissue microarray*

TMO: transplante de medula óssea

TNF: fator de necrose tumoral

TTF: tempo até falha do tratamento

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

VHS: velocidade de hemossedimentação

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
1. LINFOMA DE HODGKIN.....	18
1.1. Epidemiologia.....	18
1.2. Fatores etiológicos.....	20
2. LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO.....	24
2.1. Patogênese.....	24
2.1.1. Microambiente tumoral.....	28
2.2. Apresentação clínica e diagnóstico.....	34
2.3. Morfologia.....	35
2.4. Imunofenótipo.....	37
2.4.1. Papel do CD20 nas células neoplásicas.....	38
2.5. Estadiamento e tratamento.....	42
3. JUSTIFICATIVA.....	44
4. OBJETIVOS.....	46
4.1. Objetivos gerais.....	46
4.2. Objetivos específicos.....	46
 CAPÍTULO II – ARTIGO.....	 60
 CONCLUSÕES FINAIS.....	 87

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. LINFOMA DE HODGKIN

Os linfomas são neoplasias malignas do sistema linfático caracterizadas pela proliferação clonal de linfócitos B ou T/NK, maduros ou imaturos, e em diversos estágios de diferenciação, que se apresentam clinicamente como lesões nodais e/ou extranodais. Classicamente, são divididos em duas grandes categorias: Linfoma de Hodgkin (LH) e Linfoma Não- Hodgkin (LNH), de acordo com as diferenças morfológicas, imunofenótípicas, moleculares e clínicas⁽¹⁾.

O LH, anteriormente chamado de Doença de Hodgkin, origina-se dos linfócitos B do centro germinativo⁽²⁾ e pode ser dividido em dois grandes grupos segundo a morfologia e o imunofenótipo das células tumorais: LH clássico (LHc) e LH predominância linfocitária nodular (LHPLN). O LHc, que corresponde à 90% de todos os LH, ainda é subdividido em quatro subtipos: esclerose nodular (EN), celularidade mista (CM), rico em linfócitos (RL) e depleção linfocitária (DL)⁽¹⁾.

1.1. EPIDEMIOLOGIA

LH é a causa incomum de incidência e de mortalidade por câncer. A GLOBOCAN estimou que aproximadamente 80 mil casos incidentes de LH e mais de 25 mil mortes ocorreram globalmente em 2018⁽³⁾. Para 2040, estima-se um aumento de 33% no número absoluto de casos de LH na América Latina devido ao crescimento e envelhecimento da população⁽⁴⁾.

No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA)⁽⁵⁾, estima-se 1590 novos casos de LH em homens e 1050 em mulheres para cada ano do triênio 2020-2022. Esses valores correspondem a um risco estimado de 1,52 de novos casos a cada 100 mil homens e um risco estimado de 0,95 para cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o LH, em homens, é o décimo segundo mais frequente na região Norte (1,05/100 mil), enquanto na região Sudeste (1,93/100 mil) ocupa a décima terceira posição. Nas demais regiões, é o décimo quarto mais frequente nas regiões Sul (1,74/100 mil), Centro-Oeste (1,32/100 mil) e Nordeste (0,98/100 mil). Para as mulheres, é a décima sexta neoplasia mais frequente na região Sudeste (1,11/100 mil). Nas demais regiões, ocupa a décima sétima posição, sendo 1,23/100 mil no Centro-Oeste, 1,12/100 mil no Sul, 0,76/100 mil no Nordeste e 0,28/100 mil na região Norte. Em 2017, em termos de mortalidade, ocorreram 355 óbitos por LH com taxa bruta de mortalidade de 0,35/100 mil em homens e 254 óbitos

(0,25/100 mil) em mulheres.

Na Europa, Estados Unidos e Japão a mortalidade tem caído nas últimas décadas, acredita-se que pelo uso de terapias mais modernas^(6,7). A taxa de mortalidade na América Latina na década de 1990 foi mais alta do que a observada nos Estados Unidos, mas se tornou similar a dos estadunidenses nos últimos anos, exceto na Costa Rica, México, Venezuela e Cuba. Isso indica uma melhora, ainda que em curso, no diagnóstico, tratamento e manejo da doença na maioria dos países da América Central e América do Sul, incluindo o Brasil⁽⁸⁾.

Nos países em desenvolvimento, o LH apresenta-se predominantemente em crianças e sua incidência decresce com a idade, enquanto nos países industrializados, a incidência aumenta com a idade. Na década de 1970, três padrões epidemiológicos foram descritos por Correa e O'Connor⁽⁹⁾ para o LH, de acordo com a idade, sexo, região geográfica e subtipo histológico:

1) tipo I, padrão presente em países em desenvolvimento e em pacientes com baixo status socioeconômico (SSE), onde a incidência é caracterizada por um pico na primeira infância (com predomínio em meninos) e um segundo pico em pacientes mais velhos, com predomínio do subtipo CM e DL e alta proporção de tumores positivos para Epstein-Barr vírus (EBV);

2) tipo II, observado em áreas rurais de países desenvolvidos, com pico de incidência na infância (maior em meninos) e segundo pico na segunda década de vida (maior em mulheres), com proporções semelhantes entre os subtipos histológicos;

3) tipo III, padrão bimodal de distribuição descrito em países desenvolvidos e em pacientes com alto SSE, caracterizado por uma baixa incidência em crianças, alta incidência em adultos jovens e um pico alto de incidência em pacientes mais velhos, exibindo principalmente o subtipo EN e tumor negativo para EBV⁽⁹⁻¹¹⁾.

Estudo epidemiológico realizado na América Latina mostrou que a maioria de seus países, incluindo o Brasil, tem o padrão bimodal tipo III, exceto Equador e Peru (com padrão mais consistente com o tipo II)⁽¹²⁾, dados corroborados por estudo epidemiológico brasileiro⁽¹³⁾.

Tem sido demonstrado que o SSE impacta na incidência de LH, com indivíduos com melhor SSE tendo maior risco de desenvolvimento da doença nos países desenvolvidos^(14,15). Além disso, Clarke et al. (2005)⁽¹⁵⁾ mostraram que o SSE varia com a idade, etnia, histologia e sexo. Um estudo epidemiológico brasileiro recente⁽¹⁶⁾ de Biasoli et al. (2018), mostrou que no Brasil, país com extrema desigualdade social,

o SSE é um fator independente associado a menor sobrevida nos pacientes com LH, na maioria das vezes pela associação com infecções. Neste estudo, pacientes com baixo SSE tiveram maior probabilidade de apresentar doença avançada e pior prognóstico. Potenciais mecanismos subjacentes associados a este impacto do SSE são atraso no diagnóstico e pior educação. Além disso, o impacto do SSE na sobrevida foi maior nos pacientes idosos (≥ 60 anos)⁽¹⁶⁾. Ademais, dados norte-americanos mostram que o LH exibe um padrão sazonal de incidência, com um aumento desta durante o inverno e primavera se comparada com o verão e o outono⁽¹⁷⁾.

Estudos epidemiológicos acerca dos subtipos do LHc mostram que o LHcEN afeta primariamente adultos jovens (15-34 anos), com predomínio feminino, estando associado a elevado SSE⁽¹⁵⁾, provavelmente por exposição tardia a infecções comuns⁽¹⁸⁾. Os subtipos CM e DL exibem uma distribuição bimodal com um primeiro pico na população pediátrica e um segundo pico nos pacientes acima de 60 anos, são mais comuns nos países em desenvolvimento e estão frequentemente associados a infecção pelo EBV^(15,19,20). O LHcRL exibe tendência a ocorrer na população idosa e é relativamente incomum (5% dos casos)⁽²¹⁾.

No Brasil, estudos mostraram predomínio de casos de LHcEN^(13,16,22,23). Oliveira et al. (2002)⁽²⁴⁾ encontraram o LHcCM como subtipo histológico predominante em estudo com a população de São Paulo e Ceará.

1.2. FATORES ETIOLÓGICOS

Embora a patogênese do LH seja complexa, as diferenças na epidemiologia descritiva ao redor do mundo forneceram indícios que refletem a etiopatogenia da doença. Evidências sugerem que o LH está relacionado a um complexo de condições do sistema imune que são, em parte, moduladas por doenças infecciosas, imunodeficiências e susceptibilidades genéticas.

Epstein-Bar vírus (EBV)

O EBV é um herpes vírus com distribuição mundial^(25,26). A infecção pelo EBV ocorre em mais de 40% dos pacientes com LH nos países ocidentais⁽²⁷⁾ e tem sido associado principalmente ao LHc, tendendo a ocorrer mais frequentemente em crianças e idosos^(28,29). Em 2008, 49% do total de casos incidentes estimados para

ocorrerem mundialmente foram atribuídos ao EBV e 70% destes em regiões menos desenvolvidas⁽³⁰⁾. No geral, a frequência do EBV varia de acordo com o status de imune do hospedeiro e o subtipo de LHc, sendo encontrado nas células de Hodgkin e Reed-Sternberg (HRS) preferencialmente nos subtipos CM e DL, e menos frequentemente no EN e RL, embora estudos brasileiros evidenciem diferenças nessa frequência no país^(13,24) (Tabela 1), além de estar presente em praticamente todos os casos no LHc de pacientes infectados pelo HIV⁽³¹⁾.

Tabela 1. Frequência de detecção do EBV segundo os subtipos histológicos do LHc no Brasil⁽²⁴⁾

Subtipo histológico	Frequência de detecção do EBV
Esclerose nodular	29,6%
Celularidade mista	83,9%
Rico em linfócitos	0%
Depleção linfocitária	25%

EBV (Epstein-Barr vírus), LHc (Linfoma de Hodgkin clássico).

Ademais, indivíduos que tiveram mononucleose infecciosa tiveram risco aumentado para desenvolver LH⁽³²⁾, principalmente LHcCM⁽³³⁾, e este risco é maior em pessoas infectadas em idade mais avançada e diminui com o tempo de infecção⁽³⁴⁾. Indivíduos com evidência sorológica de infecção pelo EBV tiveram um risco 2,5 a 4 vezes maior de desenvolver LH do que pessoas sem evidência de infecção pelo EBV⁽³⁵⁾.

No Brasil, a prevalência de LH EBV+ era de 64,1% entre 1987 e 1998, sendo mais frequente no subtipo CM, segundo Vassallo (2001)⁽²²⁾. Em 2002, Oliveira et al.⁽²⁴⁾ compararam os casos de uma instituição pública do Ceará, cujos pacientes eram de classe socioeconômica baixa ou muito baixa, com pacientes de classe média ou alta de São Paulo. No Ceará, a infecção pelo EBV foi mais prevalente nos pacientes menores de 20 anos, enquanto em São Paulo, a infecção foi encontrada predominantemente em adultos. Nos adultos cearenses, o EBV foi encontrado em mais de um terço dos casos de EN e em um terço dos casos de CM. Nos adultos paulistas, a positividade para EBV foi encontrada em todos os casos de CM, mas em nenhum caso de EN e DL.

Campos et al. (2018)⁽¹³⁾ avaliaram pacientes com LHc no estado de São Paulo entre 1954 e 2008 e observaram que os casos positivos para EBV diminuíram de 87% para 46%. Em crianças e adolescentes (<15 anos) e em adultos jovens (15-45 anos), os casos EBV+ diminuíram de 96% para 64% e de 85% para 32%, respectivamente.

O estudo também evidenciou uma prevalência maior de infecção pelo EBV no subtipo CM.

Pacientes de países em desenvolvimento e aqueles de zona rural dos países desenvolvidos possuem maior prevalência do subtipo CM e esta diferença diminui com a industrialização e urbanização. Este fato pode ser atribuído a um contato precoce com o EBV⁽³⁶⁾. No Brasil, há populações com diferentes condições socioeconômicas e a melhora destas condições em algumas regiões, particularmente no sudeste, pode estar associada a mudança do padrão epidemiológico tipo I para o tipo III nas últimas décadas^(13,16).

Vírus da imunodeficiência humana (HIV), imunodeficiências primárias, pós-transplante e autoimunidade

Alterações no sistema imunitário também são importantes no aparecimento dos linfomas, sendo englobadas à parte no capítulo 16 do livro de 2017 da Organização Mundial da Saúde (OMS)⁽¹⁾ com destaque devido ao aumento da sua epidemiologia desde a década de 1990.

O HIV tem sido associado ao aumento do risco de desenvolver muitos tipos de cânceres, incluindo o LH, provavelmente relacionado à imunodeficiência^(37,38). LH no cenário de HIV tem manifestações distintas e geralmente está associado à infecção pelo EBV^(31,39). Os subtipos CM e DL são os mais prevalentes nesses pacientes⁽⁴⁰⁾. Valores mais baixos de CD4 estão associados a um menor risco de desenvolvimento de LH⁽⁴¹⁾.

Um estudo com 500 tumores em pessoas com imunodeficiência congênita, 8,6% dos indivíduos tinham LH⁽⁴²⁾. Acredita-se que a infecção pelo EBV é um fator associado ao desenvolvimento de linfomas nestes pacientes, além de deficiências na imunorregulação e/ou rearranjos gênicos⁽⁴²⁾.

O transplante alogênico de medula óssea está associado com um elevado risco de desenvolvimento de doenças linfoproliferativas pós-transplante. Embora o LH após um transplante seja raro, um risco relativo de 6 foi demonstrado nos pacientes com LH pós-transplante⁽⁴³⁾. Pacientes submetidos a transplante de órgãos sólidos não tiveram aumento do risco de desenvolvimento de LH^(44,45). Tanto no pós-transplante de medula óssea quanto no de órgãos sólidos foi identificada associação com o EBV^(43,45).

Landgren et al. (2006)⁽⁴⁶⁾ mostraram um risco elevado de desenvolvimento de

LH em pacientes com doenças autoimunes como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, sarcoidose e púrpura trombocitopênica imune. Um aumento no risco de LH também foi associado a história familiar de sarcoidose e retocolite ulcerativa.

Susceptibilidade genética

Estudos com gêmeos e agregações familiares sugerem que a história familiar de LH tem papel considerável no desenvolvimento deste linfoma⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾. Além disso, estudos genômicos identificaram quinze polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) de nove *loci* diferentes associados ao LH, com associação forte de SNPs no antígeno leucocitário humano (HLA) de classe II⁽⁴⁹⁾. Cozen et al. (2012) identificou três SNPs no cromossomo 6p21.32 fortemente associados com o aumento do risco do subtipo EN entre adolescentes e adultos jovens de origem europeia⁽⁵⁰⁾.

Raça/Etnia

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a variabilidade de LH entre grupos étnicos permaneceu mesmo depois de se levar em conta fatores ambientais e SSE, sugerindo diferenças na susceptibilidade genética^(14,15,51).

Evens et al. (2012)⁽⁵¹⁾ em estudo sobre as disparidades raciais na população norte-americana identificaram importantes diferenças nas taxas de incidência em relação à idade, sexo, características clínicas e fatores relacionados à doença, como histologia, sintomas B e estadiamento, em relação à raça. O estudo mostrou uma distribuição bimodal para brancos e asiáticos, mais proeminente entre homens do que mulheres. Evidenciou ainda que, após os 30 anos de idade, homens negros tinham uma taxa de incidência constante enquanto mulheres negras tinham um padrão bimodal. Hispânicos em contrapartida tiveram um pequeno pico de incidência entre 20 e 29 anos acompanhado de um aumento exponencial da incidência de LH após essa idade. Além disso, a incidência de LH foi mais alta entre hispânicos do que outras raças em indivíduos com mais de 65 anos. Diferenças clinicopatológicas raciais incluíram menor frequência de EN, maior frequência de sintomas B e de doença em estadios mais avançados entre os hispânicos e negros em comparação com brancos. Este estudo ainda identificou uma significativa disparidade racial na sobrevida, demonstrando que hispânicos e negros tinham um importante aumento do risco de morte comparados aos brancos⁽⁵¹⁾. Entretanto, trata-se de um estudo da população norte-americana, podendo não ser aplicável a outros países, especialmente naqueles

com menor diversidade racial.

Outros fatores

Au et al. (2004)⁽⁵²⁾ em estudo com descendentes de imigrantes chineses no Canadá mostraram um aumento da incidência de HL nesta população quando comparada a incidência na população chinesa e de Hong Kong. Apesar do estudo ser restrito em tamanho, ele associa o aumento da incidência à ocidentalização, enfatizando a importância da influência do estilo de vida e dos fatores de risco ambientais na patogênese da doença.

Evidências epidemiológicas associam o tabagismo com um aumento do risco de desenvolvimento de LH, embora não de forma consistente^(53,54). O tabagismo está associado com o LH EBV-positivo, mas não ao EBV-negativo⁽⁵⁴⁾.

2. LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO

Em 1832, Thomas Hodgkin descreveu uma série de casos de linfonodomegalia do Hospital Guy em Londres⁽⁵⁵⁾. A descrição original de Hodgkin não ficou bem reconhecida até 1865, quando Samuel Wilks descreveu melhor a doença, atribuindo, então, o epônimo 'Doença de Hodgkin'⁽⁵⁶⁻⁵⁹⁾. Aproximadamente 60 anos depois da descrição de Thomas Hodgkin, Dorothy Reed e Carl Sternberg caracterizaram pela primeira vez as células mononucleares de Hodgkin e as multinucleadas de Reed-Sternberg (RS), que são patognômicas da doença⁽⁶⁰⁾. Atualmente, sabe-se que o LH é uma neoplasia derivada das células B, cujo microambiente celular único possui um papel importante na fisiopatologia e diagnóstico dos pacientes.

2.1. PATOGÊNESE

O LHc é uma condição heterogênea que conta com a contribuição combinada de alterações genéticas, estilo de vida e fatores ambientais em sua patogênese.

Os clones tumorais no LHc apresentam múltiplas anormalidades cromossômicas numéricas e estruturais. Algumas delas são compartilhadas por todas as células, outras estão presentes apenas em uma fração delas, indicando uma instabilidade genômica significativa. A detecção de rearranjos e mutações somáticas na região variante dos genes de imunoglobulinas nas células HRS demonstraram que

estas células são derivadas de células B maduras do centro germinativo. Além disso, as células HRS carregam mutações somáticas destrutivas que impedem a expressão do receptor de antígeno de célula B (BCR) em pelo menos um quarto dos casos. Como as células B do centro germinativo normal que adquirem mutações incapacitantes sofrem apoptose, as células HRS provavelmente se originam do centro germinativo pré-apoptótico, e eventos oncogênicos adicionais resgatam essas células da apoptose⁽²⁾. Essa é uma peculiaridade das células HRS, que persistem apesar de BCR não-funcional, evadindo da apoptose que células B similares não neoplásicas enfrentam (Figura 1). Ainda há evidências recentes de análise de expressão gênica que mostram que as células HRS podem estar relacionadas a uma população rara de células B CD30+ normais, que possuem BCRs preservados e funcionais⁽⁶¹⁾. Em casos raros, as células HRS também podem derivar das células T, pois foram detectados em alguns casos rearranjos nos genes relacionados a receptores de células T⁽²⁾.

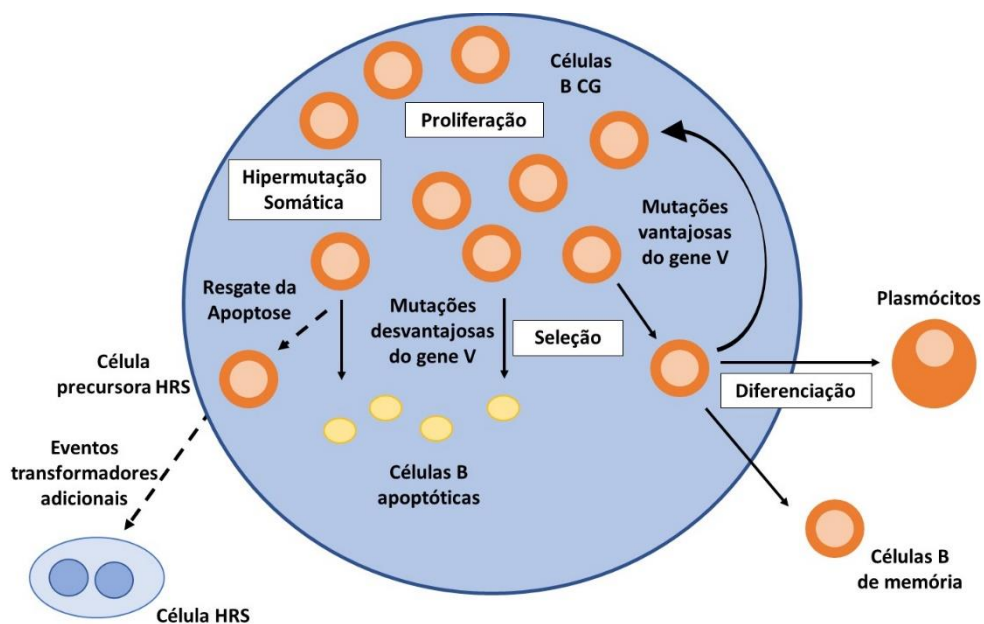


Figura 1. Cenário de origem das células de Hodgkin e Reed-Sternberg no centro germinativo. Adaptado de Küppers (2018)⁽⁶²⁾.
CG (centro germinativo), HRS (Hodgkin e Reed-Sternberg).

As células HRS são caracterizadas por uma ativação crônica de inúmeras vias de sinalização que promovem sua sobrevivência e crescimento. A via do *nuclear factor kappa B* (*NF-κB*) é constitutivamente ativada nas células HRS através da inativação de reguladores negativos por mutações pontuais e deleções (*THFAIP3*, *NFKBIA*,

NFKBIE, *TRAF3* e *CYLD*) e por amplificação de reguladores positivos ou de componentes da via NF- κ B (*NIK* e *REL*) por ganhos em número de cópias⁽⁶³⁾. As células HRS têm uma via de sinalização JAK/STAT (*janus kinase/signal transducers and activators of transcription*) ativa, a principal via de sinalização de citocinas. Essa via é presumivelmente ativada nas células HRS de maneira parácrina e autócrina, mas também através de alterações genéticas. STAT3, STAT5 e STAT6 são altamente expressos e ativados e o gene *JAK2* está frequentemente amplificado no LHC. Reguladores negativos desta via (*SCOS1* e *PTPN1*), de forma recorrente, estão inativados por mutações ou deleções⁽⁶³⁾. O fator de transcrição AP-1 (proteína ativadora-1) também está constitutivamente ativado nas células HRS, que expressa altos níveis de c-Jun e JunB⁽⁶³⁾.

As células HRS também expressam proteínas da família de receptores de fatores de necrose tumoral (TNF) como CD30, CD40, CD95, *transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor* (TACI), antígeno de maturação de células B (BCMA) e RANK (ativador de receptor do NF- κ B). A interação desses receptores de superfície com seus respectivos ligantes ativa vias de sinalização que aumentam a atividade da NF- κ B. A sinalização aberrante do Notch-1 também modula a atividade da via NF- κ B⁽⁶³⁾. As células HRS também exibem ativação constitutiva das vias de sinalização da fosfatidilinositol 3-quinase/AKT (PI3K/AKT) e MAPK/ERK (*mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases*) que também contribuem para a sobrevivência e/ou proliferação das células⁽⁶³⁾.

No LHC, ainda se observam múltiplos mecanismos de escape da imunovigilância como prejuízo na apresentação antigênica por mutações inativadoras no componente $\beta 2M$ ($\beta 2$ microglobulina) do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I) e/ou por mutações/deleções que inativam o CIITA (*class II major histocompatibility complex transactivator*) do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II). Observa-se também a secreção de fatores solúveis como a interleucina-10 (IL-10), *transforming growth factor beta-1* (TGF β 1), prostaglandinas e galectina-1, que inibem os linfócitos T citotóxicos e/ou células apresentadoras de antígenos e facilitam o escape imune por exaustão das células T⁽⁶³⁾. Há ainda recrutamento de células T reguladoras e células supressoras derivadas da linhagem mieloide⁽⁶³⁾.

A superexpressão do *programmed cell death ligand 1* (PD-L1) nas células HRS também é um importante mecanismo de escape imunológico. Esta superexpressão

se dá em parte por ganho no número de cópias do cromossomo 9p24.1. Este ganho normalmente também inclui o locus do gene *JAK2* e resulta em aumento da sinalização JAK/STAT e AP-1 e mais um aumento da expressão de PD-L1⁽⁶³⁾.

Como discutido anteriormente, atualmente há evidências convincentes de que a presença de células HRS clonais com infecção pelo EBV tem papel importante na patogênese da doença em uma parte dos casos de LH, como na sobrevivência das células HRS, na reprogramação da transcrição e na evasão imunológica das células neoplásicas⁽⁶⁴⁾.

Mais de 90% dos adultos saudáveis são infectados pelo EBV e, após infecção primária, o vírus estabelece uma infecção persistente tendo as células B de memória como reservatório⁽⁶⁵⁾. Durante a infecção latente, o EBV determina programas de expressão gênica que podem cercear a expressão de determinados genes virais, estratégia que facilita o escape imunológico⁽⁶⁶⁾, podendo ser expressos, por exemplo, cinco antígenos nucleares do EBV (*EBV-encoded nuclear antigens* - EBNA), duas proteínas latentes de membrana (*latent membrane proteins* – LMP-1 e LMP-2), pequenos RNAs não-traduzidos (*EBV-encoded small RNAs* - EBERs) além de miRs da sequência de BHRF1 (*BamHI fragment H rightward open reading frame 1*) e BARTs (*BamHI-A rightward transcripts*)⁽⁶⁷⁾. Dependendo do conjunto de produtos virais expressos, três programas de expressão gênica para a infecção latente são comumente distinguidos, denominados latências tipos I (EBER, EBNA-1), II (EBER, EBNA-1, LMP-1, LMP-2A, LMP-2B) e III (EBER, EBNA-1, LMP-1, LMP-2A, LMP-2B, EBNA-2)⁽⁶⁸⁾.

A demonstração de um genoma monoclonal do EBV nas células HRS indica que a infecção ocorre antes da expansão clonal do tumor. As células HRS EBV+ expressam o padrão de latência tipo II⁽⁶⁹⁾. No LHc associado ao EBV, o EBNA-1 é capaz de recrutar células T regulatórias e Th2⁽⁷⁰⁾, sendo observado um número maior dessas células e de células NK no LHc EBV+ em comparação com o LHc EBV negativas⁽⁷¹⁾. O LMP-1 por si só pode contribuir para a sobrevivência das células HRS através de várias vias que são constitutivamente ativadas, incluindo NF-κB, JAK/STAT e PI3K/AKT⁽⁷²⁾. O LMP-1 pode ainda induzir nas células B a expressão de um receptor de colágeno, o DDR1 (*discoidin domain receptor 1*), um receptor tirosinoquinase, que quando tem sua via ativada, promove oncogênese e o desenvolvimento de infiltrado inflamatório. Após se ligar ao colágeno, a fosforilação do DDR1 desencadeia a ativação de vias de sinalização como a via do NF-κB. No LHc EBV+, o LMP-1 aumenta

a ativação do DDR1 e modula a NF- κ B, juntamente com a sinalização através do CD40 nas células HRS⁽⁷²⁾. O LMP-2A permite a sobrevivência de células B disfuncionais no centro germinativo, pelo fato de mimetizar o BCR. A sua expressão nas células B cria um perfil de expressão similar ao das células HRS^(64,73). O LMP-2A também está associado a ativação da via Notch-1⁽⁷⁴⁾.

O EBV, especialmente através do LMP-1, estimula a produção de várias citocinas e quimiocinas pelas células HRS, incluindo CCL5, CCL17 (*thymus- and activation-regulated chemokine* – TARC) e IL-8. As células HRS também podem contribuir diretamente com o ambiente imunossupressivo através da indução/aumento da produção de fatores imunossupressivos como IL-10, galectina-1, TGF β e PD-L1, que podem inibir a resposta T citotóxica contra as células neoplásicas infectadas^(72,75,76). Os casos EBV+ possuem altos níveis de expressão de PD-L1, o que sugere que, além da amplificação/ganho 9p24.1, a expressão de PD-L1 pode ser induzida pela via do LMP-1, STAT e AP-1⁽⁷⁷⁾, destacando ainda mais a importância da regulação positiva de PD-L1 pela infecção viral⁽⁷²⁾.

Observou-se ainda que nos casos positivos para EBV há predomínio de macrófagos M1, que possuem atividade pró-inflamatória e imunoestimulante, com habilidade de promover resposta Th1 e eliminar células tumorais⁽⁷⁸⁾. Porém, vários mecanismos compensatórios para esse perfil macrofágico ajudam na sobrevivência das células HRS infectadas, como o LMP-1⁽⁷⁹⁾ e o Fas⁽⁸⁰⁾ que impedem a destruição pelas células T.

Além disso, o HLA dos pacientes com LHc pode ter um papel definidor de risco para o desenvolvimento de LHc EBV+. O HLA-A*01:01 e B*37:01 estão associados com o aumento do risco de LHc relacionado ao EBV enquanto DRB1*15:01 e DPB1*01:01 estão associados com menor risco⁽⁸¹⁾. O alelo HLA-A*02 possui papel protetivo contra o LHc relacionado ao EBV⁽⁷²⁾.

2.1.1. MICROAMBIENTE TUMORAL

A pesquisa do câncer nas últimas quatro décadas teve como foco a célula cancerosa, buscando compreender os oncogenes e genes supressores tumorais cuja ativação/supreregulação ou perda de função conferem propriedades aberrantes às células normais, contribuindo para sua transformação maligna. Porém, as células cancerosas não manifestam as doenças sozinhas e as pesquisas estão se movendo

cada vez mais em direção a desvendar os papéis das células do microambiente tumoral – autossuficiência dos sinais estimuladores de crescimento tumoral, insensibilidade do tumor para fatores que inibem sua proliferação, invasão de outros tecidos e capacidade de originar metástases, potencial ilimitado de multiplicação, indução da angiogênese e bloqueio dos mecanismos naturais de morte celular – com o objetivo de gerar terapêutica personalizada além de alterar o prognóstico de muitas formas de câncer^(82,83).

O microambiente no LHc é composto por uma grande variedade de células inflamatórias e estromais. Há uma variabilidade importante na composição deste microambiente, com poucos linfócitos no subtipo DL, um infiltrado celular misto no subtipo CM e uma importante fibrose no subtipo EN^(84,85). Devido a esse infiltrado de células inflamatórias, a histologia linfonodal normal separada em células foliculares B e áreas com células T é perdida. O infiltrado inclui células com o objetivo de eliminar as células HRS assim como células que ajudam na sobrevivência e proliferação do clone tumoral. Nas últimas décadas, as investigações acerca do microambiente no LHc têm tido um papel importante na elucidação de sua composição e relação com o prognóstico dos pacientes. Atualmente, já há evidências de que as células HRS orquestram ativamente a composição do microambiente no linfoma. Essa associação das células HRS com o microambiente e a dificuldade de crescimento dessas células em cultura ou em ratos imunodeficientes indicam que a interação entre as células neoplásicas e o microambiente tem um papel preponderante na fisiopatologia da doença⁽⁸⁶⁾.

As células HRS secretam citocinas, como IL-5, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22 e CCL28, com o objetivo de atrair as células inflamatórias⁽⁶³⁾. Estas levam a um microambiente predominantemente composto por células T – T helper (Th) e T regulatórias (Tregs) – assim como de macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, mastócitos, células B, plasmócitos e também de fibroblastos e fibras colágenas⁽⁶³⁾.

As células T CD4+ tem um papel central no microambiente do LHc e tipicamente estão em estreito contato com as células HRS (fenômeno conhecido como roseta linfocitária). Esta manifestação morfológica pode funcionar como uma fonte de sobrevivência através, principalmente, das células Th2, mas também forma uma barreira física contra as células T citotóxicas. As células T CD4+ são atraídas pelas células HRS que produzem quimiocinas e citocinas que recrutam também eosinófilos, mastócitos, macrófagos e neutrófilos. Em tumores sólidos, a resposta imune requer a

apresentação de antígenos tumorais pelas moléculas de HLA de classe I aos linfócitos T citotóxicos CD8+. Estudos sugerem que, ao contrário do que ocorre nos tumores sólidos, as células T CD4+ podem exercer um papel principal na resposta antitumoral mediada pelo PD-1 no LHc por um mecanismo dependente do HLA de classe II^(87,88). Além disso, as células T, em particular as Tregs, têm a função de resgatar as células HRS do ataque dos linfócitos T citotóxicos e das células NK. Isto pode ser particularmente relevante nos casos de LHc em que as células HRS estão infectadas pelo EBV e expressam antígenos virais que podem moldar o microambiente atraindo mais células T regulatórias e poupando as células HRS da necessidade de outros sinais de sobrevivência e de supressão da atividade dos linfócitos T citotóxicos^(70,89,90).

A taxa de células T helper (CD4+) e de células T efectoras (CD8+) pode ter correlação com o prognóstico dos pacientes com LHc. Altos níveis de CD8+ e baixos níveis de CD4+ estão associados com desfecho favorável em um estudo⁽⁹¹⁾. Alvaro-Naranjo et al. (2005)⁽⁹²⁾ demonstraram que baixo CD8+ apresentava pior desfecho nos pacientes em estadio precoce. Neste estudo, um número elevado de células T citotóxicas, demonstrado através da expressão de TIA1 (*cytotoxic granule-associated rna binding protein*) e granzima B, também se correlacionou com menor sobrevida. Este prognóstico negativo de números aumentados de linfócitos T citotóxicos também foi confirmado por outros dois estudos^(93,94).

A expressão de PD-L1 é observada em grande parte das células HRS em aproximadamente quase todos os casos de LHc⁽⁹⁵⁾. Um mecanismo de evasão imune envolve a sinalização entre o PD-L1 expresso em altos níveis nas células HRS e seu receptor (PD-1) expresso nos linfócitos T CD4+ e CD8+, suprimindo a função efectora das células T e, conseqüentemente, desativando a função antitumoral destas células. As células HRS também induzem a expressão de PD-L1 nos macrófagos, fomentando ainda mais o ambiente imunossupressor⁽⁹⁶⁾. Hollander et al. (2017)⁽⁹⁷⁾ evidenciaram que altas proporções tanto de PD-1+ quanto de PD-L1+ pela imunoistoquímica (IHQ) nos leucócitos do microambiente estão associadas a menor sobrevida livre de doença e sobrevida global. Muenst et al. (2009)⁽⁹⁸⁾ também mostraram que números maiores de linfócitos PD-1+ é um marcador prognóstico negativo para sobrevida global nos pacientes com LHc.

A natureza imunossupressora do microambiente tumoral no LHc inicia-se localmente no tumor e progride sistemicamente nos pacientes com doença avançada ou com fatores prognósticos adversos. As células HRS e as células do microambiente

expressam ligantes para receptores inibitórios nas células NK, incluindo HLA-E, HLA-G e PD-L1. A secreção de citocinas e quimiocinas, incluindo sCD25, TGF β , IL-10, CXCL9 e CXCL10 mediam a imunossupressão sistêmica⁽⁹⁹⁾.

Tzankov et al. (2008)⁽¹⁰⁰⁾ demonstraram que células Tregs FOXP3 positivas estão associadas a uma melhor sobrevida livre de doença nos pacientes com LHc. Níveis mais altos de PD-L1 estão associados a baixos níveis de linfócitos Tregs FOXP3 positivos e à quantidade maior de macrófagos e linfócitos T regulatórios PD-1 e GATA3 positivos, todos associados a pior prognóstico⁽¹⁰¹⁾.

Pouco se sabe sobre o papel das células B não-neoplásicas na patogênese do LHc e na resposta à terapia, se comparado às células T. As células B competem com as células HRS por sinais de sobrevivência como o ligante CD40 (CD40L) derivados das células T, o que pode explicar em parte o fato de maiores quantidades de células B estarem associadas a melhor sobrevida global no LHc⁽¹⁰²⁾. Para Greaves et al. (2013)⁽¹⁰²⁾, a expressão de localização não-folicular do CD20 nos linfócitos do fundo inflamatório, quando comparada com as células CD21 positivas, influenciou a sobrevida. Utilizando um ponto de corte de 1700 células/mm³, os pacientes com alta expressão não-folicular de CD20 tiveram uma melhora na sobrevida global (p=0,003) em 5 anos (87% versus 70%), em 10 anos (84% versus 52%) e em 20 anos (76% versus 43%).

Em estudo de perfil de expressão gênica, Steidl et al. (2010)⁽¹⁰³⁾ evidenciaram que a subexpressão de genes de células B centro-germinativas estava relacionada a falência de tratamento, inversamente ao encontrado na IHQ, em que alta contagem de células B no fundo inflamatório estava significativamente associada a doença em estadios avançados com maior sobrevida livre de doença. Chetaille et al. (2009)⁽⁷⁸⁾ também mostraram em seu estudo de expressão gênica, um desfecho favorável nos casos com superexpressão de genes de células B. Tudor et al. (2013)⁽¹⁰⁴⁾ estudaram diferentes populações de células B no *background* do LHc e encontraram correlação significativa entre alto número de células CD20+, em agregados ou isoladas, e uma melhor sobrevida. Panico et al. (2015)⁽¹⁰⁵⁾ também evidenciaram que as células CD20+ têm um papel prognóstico favorável no LHc e que sua depleção associada ao aumento do número de macrófagos identifica um grupo de pacientes de alto risco. Estudo recente evidenciou que baixa contagem de células B está associada a significativa redução da sobrevida livre de progressão e da sobrevida global, ao passo que a quantidade de células T, macrófagos e células HRS não estava associada com

o risco de progressão ou recidiva⁽¹⁰⁶⁾.

No LHC, os plasmócitos podem ser atraídos pela CCL28 e as citocinas IL-6 e IL-21 podem ter um papel na diferenciação dos plasmócitos. Tanto o CCL28 quanto as ILs são produzidas pelas células HRS⁽¹⁰⁷⁾. Existe apenas um estudo a respeito dos plasmócitos no LHC, que evidenciou que um elevado número de plasmócitos está associado a sintomas B, estadiamento avançado e sobrevida inferior⁽¹⁰⁸⁾.

Em relação às outras células inflamatórias, estudos mostram que números aumentados de eosinófilos⁽¹⁰⁹⁾, de mastócitos⁽¹¹⁰⁾ e de macrófagos^(103,105), indicam um pior prognóstico no LHC. Eosinófilos são recrutados através da secreção de IL-5, CCL5, CCL28 e GM-CS; mastócitos e macrófagos também são atraídos pelo CCL5 e neutrófilos pela IL-8⁽⁸⁶⁾. A expressão de IL-13 e de TGF β pelas células HRS levam à fibrose através da ativação e proliferação de fibroblastos⁽¹¹¹⁾. Fibroblastos também podem contribuir com a infiltração por eosinófilos e células Th2 através da secreção de CCL11⁽⁸⁶⁾. A secreção de IL-3 pelas células T do microambiente leva a uma regulação positiva dos ligantes do CD40 e CD30 nos eosinófilos, promovendo crescimento e proliferação das células HRS^(112,113).

Os macrófagos associados ao tumor são preditor de sobrevida global. As células HRS possuem capacidade de induzir o fenótipo M2 dos macrófagos *in vitro*⁽¹¹⁴⁾. Os macrófagos M2 têm papel anti-inflamatório e também induzem angiogênese e proliferação de células tumorais⁽¹¹⁵⁾. Há uma associação entre um maior número de macrófagos M2 e um pior prognóstico⁽¹¹⁶⁾. Em vários estudos, incluindo duas meta-análises, o número aumentado de macrófagos CD68+ e/ou CD163+ foi um preditor de desfecho adverso em pacientes adultos^(103,105,117-128). No LHC, o aumento do número de macrófagos CD68+ foi associado a uma menor sobrevida livre de progressão, a uma probabilidade aumentada de recaída após transplante e a uma sobrevida geral menor⁽¹⁰³⁾. Altos índices de CD68 e CD163 (>20%) estão correlacionados a pior prognóstico em estudo com pacientes coreanos com LH⁽¹²⁹⁾. Procházka et al. (2019)⁽¹²⁸⁾ mostraram que uma alta razão entre macrófagos CD68+ e as células HRS estava associada a um alto risco de progressão do LHC e morte. Contrariamente aos achados anteriores, Azambuja et al. (2012)⁽¹³⁰⁾, Harris et al. (2012)⁽¹³¹⁾ e Kayal et al. (2014)⁽¹³²⁾ não encontraram associação entre a imunoexpressão de CD68 e/ou CD163 com desfecho desfavorável.

Os mastócitos são atraídos para o microambiente tumoral pela IL9 e/ou pela quimiocina CCL5 produzidas pelas células HRS ou pelos linfócitos T^(133,134), pelo

aumento da angiogênese⁽¹³⁵⁾ e por estimular diretamente as células HRS via CD30⁽¹³⁶⁾. Molin et al. (2001)⁽¹³⁶⁾ demonstraram in vitro que os mastócitos eram capazes de estimular as células HRS via CD30, podendo, portanto, promover a tumorigênese. Este mesmo autor e colaboradores⁽¹¹⁰⁾, em outro estudo, demonstraram que grande número de mastócitos intratumorais estavam associados ao subtipo EN e a pior prognóstico, enquanto Keresztes et al. (2007)⁽¹³⁷⁾ em um estudo menor não encontraram associação entre a contagem de mastócito e o desfecho. Glimelius et al. (2011)⁽¹³⁸⁾ encontraram menores números de mastócitos associados a tumores EBV+ comparados aos EBV negativos. Andersen et al. (2016)⁽¹³⁹⁾ evidenciaram que maior quantidade de mastócitos intratumorais se correlacionavam significativamente com pior desfecho apenas no subtipo CM.

Em relação ao LHc associado ao EBV, o infiltrado inflamatório do microambiente tumoral é composto tanto por células contra as células HRS infectadas, como os linfócitos T citotóxicos, quanto por células inflamatórias que favorecem o crescimento e a sobrevivência do clone neoplásico^(72,134), incluindo altos números de células T regulatórias CD4+CD25+⁽¹⁴⁰⁾. Além disso, há números significativamente maiores de macrófagos CD68+ e CD163+ no microambiente do LHc EBV+ do que nos casos negativos^(78,119). A principal diferença na composição do microambiente entre LHc EBV+ e EBV- é o aumento do número de células T CD8+ e células NK nos pacientes infectados⁽⁷¹⁾.

Vassallo⁽²²⁾ demonstrou não haver influência da expressão do EBER na sobrevida. Entretanto, pacientes com mais de 10% das células neoplásicas LMP-1 positivas tinham uma melhor sobrevida, evidenciando que era a expressão forte do LMP-1, e não a simples presença do vírus, que podia desempenhar um papel nos pacientes com LHc.

Nos pacientes HIV+, observa-se uma capacidade parcialmente retida do sistema imunológico do hospedeiro para controlar a expansão do tumor, consistente com a observação de que o LHc ocorre geralmente nos pacientes HIV+ com um nível de deficiência imunológica moderada, com maiores níveis de CD4⁽⁴¹⁾. Nesses pacientes, também se observa uma grande proporção de células HRS infectadas pelo EBV e números aumentados de macrófagos CD163+⁽¹⁴¹⁾.

Angiogênese é a marca do crescimento e progressão tumoral em neoplasias sólidas e hematológicas. Korkolopoulou et al. (2005)⁽¹⁴²⁾ investigou a angiogênese em pacientes com LH utilizando a imunoexpressão pelo CD34 e observou que o calibre

vascular aumentou gradualmente com o estadiamento, ao contrário da densidade microvascular (DMV) que diminuiu com o estadiamento. A sobrevida global foi adversamente afetada pela DMV e pela área vascular total, enquanto uma menor sobrevida livre de doença estava associada à presença de vasos com endotélio achatado. Este estudo sugeriu que a angiogênese fornece informação prognóstica no LH, exigindo uma avaliação tanto qualitativa quanto quantitativa da rede microvascular. Glimelius et al. (2005)⁽¹⁴³⁾, através da imunoexpressão pelo CD31, também evidenciaram os mesmos resultados, mostrando que pacientes com maior contagem de vasos exibiam uma pior sobrevida livre de doença. Além disso, componentes celulares do microambiente como macrófagos e mastócitos também estão envolvidos na manutenção do LH. Uma associação significativa foi encontrada entre a DMV, a imunoexpressão pelo CD163 e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) sugerindo que a interação entre as células HRS e os macrófagos leva a angiogênese e pior prognóstico⁽¹²²⁾.

2.2. APRESENTAÇÃO CLÍNICA E DIAGNÓSTICO

A maioria dos pacientes com LHc apresenta-se com linfadenopatia periférica localizada dolorosa, tipicamente envolvendo linfonodos cervicais (75% dos casos), seguidos pelas regiões mediastinal, axilar e para-aórtica. Cadeias não-axiais, como os linfonodos mesentéricos e epitrocleares, raramente estão envolvidos, assim como é raro o envolvimento extranodal primário⁽¹⁾. Sintomas B (febre > 38°, sudorese noturna e perda ponderal >10% em 6 meses) estão presentes em cerca de 40% dos pacientes⁽¹⁾. O LH em pacientes HIV-positivos tende a se apresentar em estadios avançados associados a sintomas B e envolvimento extranodal⁽³⁷⁾.

O diagnóstico do LH baseia-se na apresentação clínica supracitada associada a uma avaliação morfológica e imunofenotípica. O diagnóstico é realizado, preferencialmente, através da avaliação de biópsia excisional do maior linfonodo envolvido. Esta avaliação inclui microscopia óptica de rotina através da coloração pela hematoxilina e eosina (H&E) e análise do imunofenótipo através de IHQ. Como as células RS e suas variantes são dispostas em meio a muitas células inflamatórias, estas células podem interferir na avaliação molecular e na própria citometria de fluxo no diagnóstico do LHc.

2.3. MORFOLOGIA

A morfologia das células neoplásicas e a composição do infiltrado inflamatório diferem dependendo do subtipo de LH. Entretanto, os subtipos de LHc compartilham de um imunofenótipo comum, que os diferem de outros linfomas, incluindo o LHPLN. As células diagnósticas de Reed-Sternberg (RS) são grandes, com citoplasma abundante, algo basofílico, com núcleos bilobados, duplos ou múltiplos, e dois ou mais nucléolos eosinofílicos proeminentes⁽¹⁴⁴⁾. Existem ainda outras variantes dessas células neoplásicas como: 1) células de Hodgkin, variante mononuclear; 2) células mumificadas, contendo citoplasma condensado e núcleo avermelhado picnótico; e 3) células lacunares, que possuem citoplasma pálido e abundante, com artefato de retração pelo processamento histológico, e núcleo multilobado com nucléolo pequeno (Figura 2).

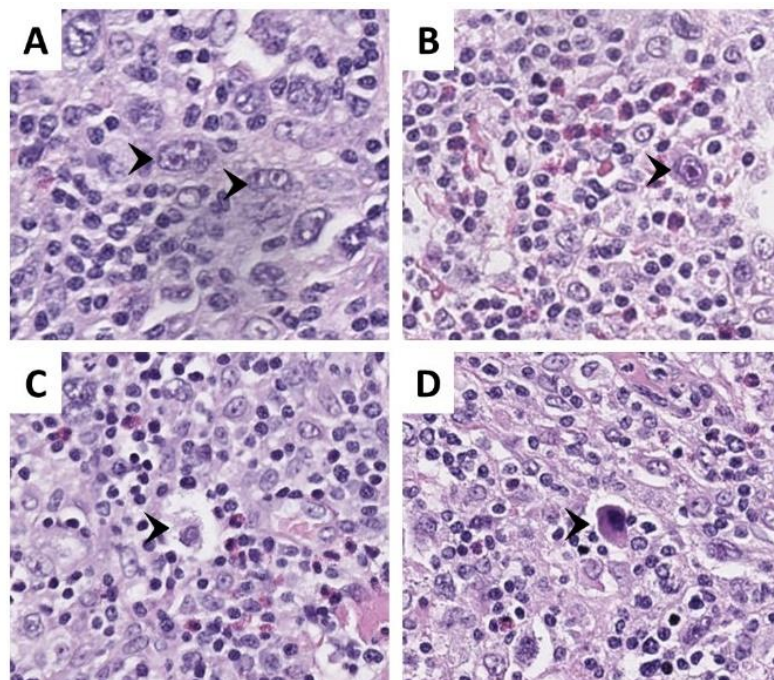


Figura 2. Células de Reed-Sternberg e suas variantes. A) Célula de Reed-Sternberg; B) Célula de Hodgkin; C) Células lacunares; e D) Célula mumificada. Fotos de arquivo pessoal do autor.

De acordo com o infiltrado inflamatório de fundo e a morfologia das células neoplásicas, o LHc é classificado em quatro subtipos (Figura 3), que também diferem entre si pelos locais de envolvimento, manifestações clínicas, padrão de crescimento,

presença de fibrose e frequência de infecção pelo EBV, mas não no imunofenótipo das células tumorais, que é o mesmo para as quatro variantes⁽¹⁴⁴⁾.

- Esclerose nodular: possui um padrão de crescimento nodular com septos fibrosos separando os nódulos. Áreas de necrose podem estar presentes e células RS podem ser raras. Tipicamente, a maioria das células neoplásicas são células lacunares que podem estar em agregados dentro do centro dos nódulos. O fundo inflamatório geralmente contém eosinófilos, histiócitos e neutrófilos.
- Celularidade mista: categoria heterogênea com padrão de crescimento difuso ou vagamente nodular sem septos fibrosos. Pode apresentar leve fibrose intersticial e as células RS são identificadas facilmente. O infiltrado de fundo é variável e é tipicamente constituído por eosinófilos, neutrófilos, histiócitos e plasmócitos.
- Rico em linfócitos: possui mais comumente padrão de crescimento nodular, mas pode ser difuso. As células RS estão presentes, mas podem ser observadas também células mononucleares de Hodgkin. O fundo é predominantemente de linfócitos, sem ou com raros neutrófilos e eosinófilos. Existem casos contendo remanescentes de centro germinativo, com presença de células RS clássicas e suas variantes na região interfolicular e na zona do manto, conhecidos como “LHc nodular rico em linfócitos” ou “LHc folicular”.
- Depleção linfocitária: este subtipo possui crescimento difuso com áreas de aparência hipocelular, devido à presença de fibrose, necrose e escassez de células inflamatórias. Células diagnósticas RS e variantes bizarras estão presentes em grande número. Ninhos confluentes de células RS podem estar presentes.

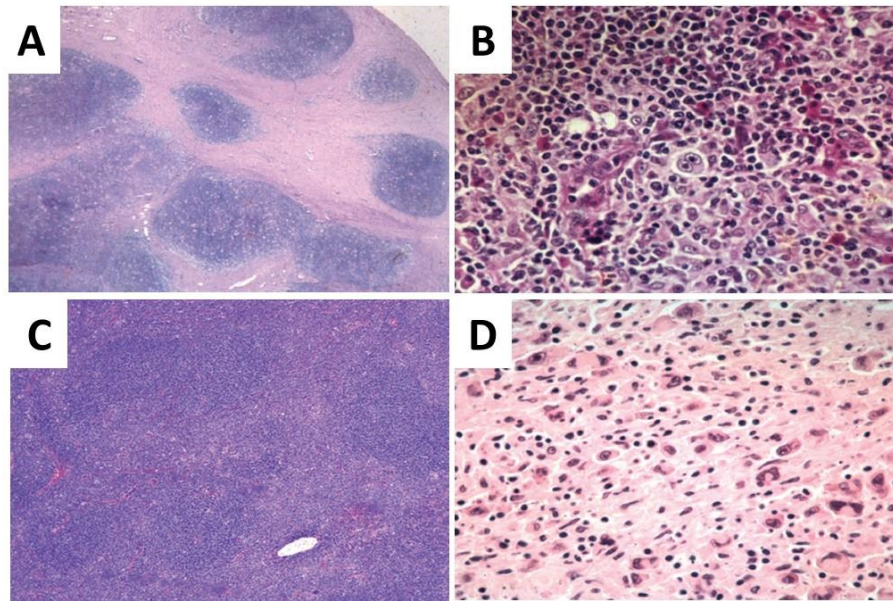


Figura 3. Subtipos histológicos do linfoma de Hodgkin clássico. A) Esclerose nodular; B) Celularidade mista; C) Rico em linfócitos; e D) Depleção linfocitária. Adaptado de Hsi (2012)⁽¹⁴⁵⁾.

Pacientes HIV+ exibem algumas diferenças morfológicas quando comparados com a população geral com LH. Observam-se grandes áreas de necrose⁽¹⁴⁶⁾ e um padrão sarcomatoide que, embora não específico, é mais frequente nestes pacientes⁽¹⁴¹⁾.

2.4. IMUNOFENÓTIPO

Tipicamente, as células HRS expressam CD30, CD15 e PAX5, com expressão variável de CD20 e negatividade para CD3 e CD45. Ausência de expressão de CD15 não impossibilita o diagnóstico de LHc, visto que 20-25% dos casos podem ser CD15 negativos⁽⁶⁴⁾, ao contrário da expressão de CD30, presente em 100% dos casos. Na grande maioria dos casos, a derivação das células tumorais da linhagem de células B são indicadas por uma positividade nuclear PAX5/BSAP, mas a coloração é geralmente mais fraca em comparação com a intensidade da coloração na população reativa de células B no fundo inflamatório. A expressão de CD20 é frequentemente restrita a um subconjunto da população de células tumorais, cerca de 20% das células, além de ser de intensidade variável em diferentes partes da membrana nuclear⁽⁶⁴⁾. Em comparação com a expressão do CD20, a expressão CD79a é observada com menos

frequência⁽⁶⁴⁾. A infecção por EBV nas células HRS pode ser facilmente demonstrada por estudo IHQ para LMP-1 ou hibridização in situ (EBER) (Figura 4).

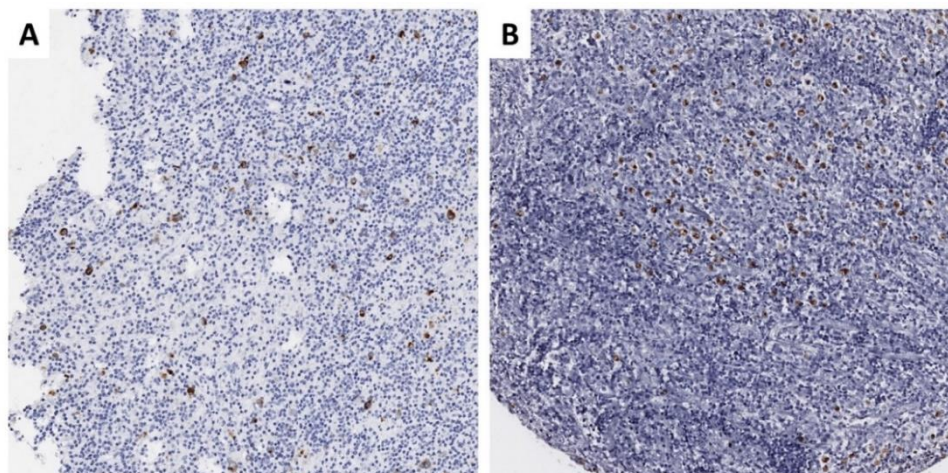


Figura 4. Detecção da infecção pelo EBV nas células HRS. A) Marcação de membrana pelo LMP-1. B) Marcação nuclear EBER/CISH. Fotos de arquivo pessoal do autor.

2.4.1. PAPEL DO CD20 NAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS

O CD20 é uma proteína transmembrana codificada pelo gene *MS4A1* (*membrane-spanning 4 domains, subfamily A, member 1*). Este gene codifica moléculas de superfície de linfócitos B que exercem papel no desenvolvimento e diferenciação das células B em plasmócitos⁽¹⁴⁷⁾. A expressão deste marcador no LHc varia entre 4,9 e 66,6% (Tabela 2), exibindo também variação na proporção das células HRS e na intensidade de marcação, essa, frequentemente, mais fraca do que na célula B reativa normal. Além disso, a expressão de CD20 é mais detectada no LHcCM e LHcEN⁽¹⁴⁷⁻¹⁶⁵⁾.

Benharroch et al. (2015)⁽¹⁴⁷⁾ utilizaram uma coorte com 192 casos e comparou aqueles com LHc CD20+ (marcação forte e/ou homogênea em 20 a 70% das células RS) e CD20- ou com marcação fraca (<20% das células tumorais). Neste estudo, a expressão de CD20 não foi um fator prognóstico para morte. Outros estudos como o de Enblad et al. (1993)⁽¹⁵⁰⁾, Molot et al. (1994)⁽¹⁵¹⁾, Vassallo et al. (2002)⁽¹⁶⁵⁾, Fu et al. (2008)⁽¹⁵⁹⁾ e Elsayed et al. (2014)⁽¹⁶³⁾, dentre outros (vide Tabela 2) também não mostraram associação entre a imunoexpressão de CD20 nas células neoplásicas e o desfecho no LHc. Rassidakis et al. (2002)⁽¹⁵⁴⁾, em uma população de 132 pacientes com LHc CD20+, estratificaram a expressão do CD20 em 5%, 10%, 20%, 30% e 50%, mas também não obtiveram diferença estatística na sobrevida livre de doença para

nenhum desses pontos de corte.

Outros autores, ao contrário, mostraram associação da expressão de CD20 com um pior prognóstico. Portlock et al. (2004)⁽¹⁵⁷⁾, em uma população de 248 pacientes, compararam pacientes CD20 positivos e negativos, sendo os positivos aqueles com expressão >50% das células tumorais. Estes autores concluíram que a presença de positividade para CD20 no LHc estava associada a pior sobrevida global e pior tempo até falha do tratamento (TTF). Aldred et al. (2008)⁽¹⁵⁸⁾ encontraram pior prognóstico nos pacientes com 21 a 40 anos com células HRS positivas para CD20. Giesta et al. (2009)⁽¹⁶¹⁾ e Mohammadi et al. (2018)⁽¹⁶⁶⁾ também encontraram um prognóstico desfavorável associado ao CD20+.

A expressão de CD20 teve associação com bom prognóstico no estudo de Tzankov et al. (2003a)⁽¹⁵⁶⁾, com 119 pacientes com LHc seguidos por 12 anos utilizando um ponto de corte de 10% de positividade para o CD20. Segundo esses autores, o imunofenótipo CD30+/CD15±/CD20+ está associado com um desfecho clínico favorável. Demonstraram, também, que o CD20 é um fator prognóstico positivo independente ($p=0,035$) e que a sobrevida livre de doença foi mais alta nos pacientes CD20+ (286 meses versus 202 meses; $p=0,022$). Canioni et al. (2009)⁽¹⁶²⁾ observou uma frequência menor de CD20+ nos casos refratários ou com recidiva precoce. O sumário dos dados da literatura sobre a imunoexpressão do CD20 nas células neoplásicas no LHc encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2 Sumário dos dados da literatura sobre a imunexpressão do CD20 no LHC.

Referência	País	Critério de positividade para o CD20 nas células HRS e <i>cutoffs</i>	Casos CD20+/total de casos (%)	Casos CD20+ por subtipo histológico (%)	Significado prognóstico dos casos CD20+	Correlação CD20/EBV	Outras correlações estatisticamente significantes
Schmid et al. (1991) ⁽¹⁴⁸⁾	Inglaterra	<10%, 10-50%, >50%	50/75 (66,6) ^a	EN: 37/59 (62,7) CM: 13/16 (81,2)	Dado não disponível	Dado não disponível	Dado não disponível
Zukerberg et al. (1991) ⁽¹⁴⁹⁾	EUA	1+ (<100 células/10CGA), 2+ (100-200 células/10CGA) e 3+ (>200 células/10CGA)	7/20 (35,0)	EN: 3/14 (21,4) CM: 3/5 (60,0) INC: 1/1 (100,0) EN: 19/77 (24,7)	Dado não disponível	Dado não disponível	CD20- e CD15+ associados a maior infiltrado inflamatório de polimorfonucleares.
Enblad et al. (1993) ⁽¹⁵⁰⁾	Suécia	≥20%	36/145 (24,8)	CM: 15/54 (27,8) DL: 2/14 (14,3) EN: 3/22 (13,6)	Ausente	Dado não disponível	Ausente
Molot et al. (1994) ⁽¹⁵¹⁾	EUA	Marcação na maioria das células HRS	6/46 (13,0)	CM: 1/15 (6,7) RL: 2/6 (33,3) EN: 5/55 (9,1)	Ausente ^f	Dado não disponível	CD20+ associado a linfonodomegalia periférica, sexo masculino e apresentação infradiafragmática.
Korkolopoulou et al. (1994) ⁽¹⁶⁴⁾	Grécia	<10%(negativo), 10-50% e >50%	12/94 (12,8)	CM: 7/32 (21,9) DL: 0/7 (0,0)	Dado não disponível	Dado não disponível	Dado não disponível
Isaacson et al. (1996) ⁽¹⁶⁷⁾	Inglaterra	Dado não disponível	31/63 (49,2)	Dado não disponível	Dado não disponível	Dado não disponível	Dado não disponível
Von Wasielewski et al. (1997) ⁽¹⁵²⁾	Alemanha	Marcação na maioria das células HRS ^b	63/1286 (4,9)	Dado não disponível	Ausente ^e	Dado não disponível	Ausente
Lauritzen et al. (1999) ⁽¹⁶⁸⁾	Dinamarca	Dado não disponível	11/50 (22,0)	Dado não disponível	Ausente	Ausente	Ausente
Watanabe et al. (2000) ⁽¹⁵³⁾	Japão	<10%, 10-50%, 51-75% e >75%	18/51 (35,3)	EN: 6/20 (30,0) CM: 11/30 (36,7) DL: 1/1 (100,0)	Ausente	Dado não disponível	Ausente
Rassidakis et al. (2002) ⁽¹⁵⁴⁾	EUA, Itália e Grécia	5%, 10%, 20%, 30% e 50% ^c Marcação fraca a moderada e forte ^d	132/598 (22,1)	EN: 106/472 (22,4) CM: 26/123 (21,1) DL: 0/3 (0,0)	Ausente	Dado não disponível	Envolvimento de linfonodos inguinais ou ilíacos e acometimento de medula óssea tiveram menor frequência de CD20+
Vassallo et al. (2002) ⁽¹⁶⁵⁾	Brasil	<10%, 10-50%, >50%	7/78 (9,0)	EN: 5/61 (8,2) CM: 2/15 (13,3)	Ausente	Ausente	Ausente
Tzankov et al. (2003a) ⁽¹⁵⁵⁾	Suíça, Itália e Áustria	>10% ou >50% em casos com menos de 10 células tumorais	84/253 (33,2)	EN: 41/145 (28,3) CM: 35/83 (42,2) RL: 3/10 (30,0) DL: 1/5 (20,0) INC: 4/10 (40,0)	Ausente	Ausente	CD20+ teve correlação inversa com CD15+
Tzankov et al. (2003b) ⁽¹⁵⁶⁾	Áustria	>10%	24/119 (20,2)	EN: 11/70 (15,7) CM: 9/29 (31,0) RL: 3/7 (42,8) DL: 1/3 (33,3)	Favorável	Ausente	CD20+ mais frequente em >45 anos
Portlock et al. (2004) ⁽¹⁵⁷⁾	EUA	Positividade de CD20 em áreas CD30+	28/248 (11,3)	EN: 24/202 (11,9) CM: 3/40 (7,5) Outros ^g : 1/6 (16,7)	Desfavorável	Dado não disponível	Tempo para falência do tratamento e sobrevida global pior nos pacientes CD20+ tratados com ABVD
Aldred et al. (2008) ⁽¹⁵⁸⁾	Brasil	Qualquer porcentagem	33/238 (13,9)	EN: 12/116 (10,3) CM: 19/86 (22,1) INC: 2/36 (5,6)	Desfavorável ^h	Presente	CD20+ mais frequente em >41 anos e menos frequente entre 21-40 anos.
Fu et al. (2008) ⁽¹⁵⁹⁾	China	Escore baseado na porcentagem (<10%, 11-25%, 26-50% e >50%) e na intensidade (marcação fraca a moderada e forte) ^d	12/51 (23,5)	EN: 7/27 (25,9) CM: 5/19 (26,3) DL: 0/5 (0,0)	Ausente	Dado não disponível	CD20+ mais frequente em >45 anos

Tabela 2 (continuação)

Referência	País	Critério de positividade para o CD20 nas células HRS e <i>cutoffs</i>	Casos CD20+/total de casos (%)	Casos CD20+ por subtipo histológico (%)	Significado prognóstico dos casos CD20+	Correlação CD20/EBV	Outras correlações estatisticamente significantes
Barakzai et al. (2009) ⁽¹⁶⁰⁾	Paquistão	Dado não disponível	18/91 (19,8)	EN: 8/40 (20,0) CM: 8/47 (17,0) RL: 2/4 (50,0)	Dado não disponível	Dado não disponível	Dado não disponível
Giesta et al. (2009) ⁽¹⁶¹⁾	Brasil	≥1 célula positiva	37/97 (38,1)	Dado não disponível	Desfavorável	Dado não disponível	Dado não disponível
Canioni et al. (2009) ⁽¹⁶²⁾	França	≥10% das células HRS positivas em 200 células HRS selecionadas aleatoriamente	19/59 (32,2)	Dado não disponível	Favorável	Dado não disponível	CD20+ menos frequente nos casos refratários ou com recidiva precoce
Elsayed et al. (2014) ⁽¹⁶³⁾	Japão	>5%	74/389 (19,0)	EN: 25/171 (14,6) CM: 45/190 (23,7) RL: 1/6 (16,7) DL: 3/22 (13,6)	Ausente	Presente	CD20+ mais frequente em pacientes mais velhos
Benharroch et al. (2015) ⁽¹⁴⁷⁾	Israel	Expressão forte e/ou homogênea entre 20 e 70%	14/192 (7,3)	Dado não disponível	Ausente	Ausente	CD20+ mais frequente em >45 anos
Mohammadi et al. (2018) ⁽¹⁶⁶⁾	Irã	>10%	13/62 (21,0)	Dado não disponível	Desfavorável	Dado não disponível	Ausente

^a18/20 cortes de congelação e 32/55 cortes de parafina.

^bNos casos questionáveis foi realizada a contagem de pelo menos 40 células HRS por lâmina e a positividade foi definida como ≥20% delas coradas pelo CD20.

^cNa maioria dos casos, considerou-se pelo menos 100 células HRS como representativo para determinar a porcentagem de células CD20+.

^dFraco a moderado (menos intenso que os linfócitos B do fundo) e forte (intensidade igual ou maior a dos linfócitos B do fundo).

^eHouve correlação significativa com pior prognóstico apenas nos pacientes com fenótipo CD30-/CD15-/CD20+.

^fValor de *p* não fornecido.

^gSubtipos não fornecidos.

^hEm pacientes entre 21 e 40 anos.

HRS (Hodgkin e Reed-Sternberg), CGA (campo de grande aumento), EM (esclerose nodular), CM (celularidade mista), RL (rico em linfócitos), DL (depleção linfocitária), INC (inclassificável).

2.5. ESTADIAMENTO E TRATAMENTO

O tratamento do LH é baseado no estadiamento clínico da doença através do sistema de Ann Arbor modificado por Cotswolds^(169,170) (Tabela 3) e pelo performance status (Tabela 4). Os exames utilizados para o estadiamento incluem radiografia de tórax, tomografia computadorizada de tórax, abdome e pelve e, finalmente, a avaliação da medula óssea. Cintilografia, PET scan e a própria biópsia são exames possíveis para estadiamento da medula óssea.

Segundo a OMS, mais de 60% dos pacientes com LHc possuem doença localizada (estádios I e II). Aproximadamente 60% desses pacientes, a maioria deles com o subtipo esclerose nodular, possuem envolvimento mediastinal. Envolvimento esplênico não é incomum (20%), sendo mais prevalente no subtipo celularidade mista e está associado ao aumento do risco de disseminação extranodal. Envolvimento da medula óssea é menos comum (5%) e indica disseminação vascular da doença (estádio IV)⁽¹⁾. Estádios III e IV indicam pior prognóstico.

Tabela 3. Estadiamento clínico dos linfomas de Hodgkin e não Hodgkin (Classificação de Ann Arbor modificada por Cotswolds) ^(169, 170)	
Estádio	Definição
I	Acometimento de uma única cadeia linfonodal ou estrutura linfoide (baço, timo, anel de Waldeyer).
II	Acometimento de duas ou mais cadeias linfonodais no mesmo lado do diafragma (o mediastino é um único local; linfonodos hilares são lateralizados); o número de locais anatômicos deve ser indicado por sufixo (ex.: II3).
III	Acometimento de cadeias linfonodais ou estruturas linfoides em ambos os lados do diafragma.
III1	Andar superior do abdome (celíacos, portais, hilo esplênico)
III2	Andar inferior do abdome (para-aórticos, ilíacos, mesentéricos)
IV	Acometimento extranodal (fígado, medula óssea) não decorrente de extensão direta de um sítio linfonodal conhecido. O baço não está incluído, por ser considerado uma estrutura linfoide.
Sufixos	A: Sem sintomas B (IA, IIA, IIIA, IVA) B: Com sintomas B (IB, IIB, IIIB, IVB) E: Acometimento de um único sítio extranodal, contíguo a uma cadeia linfonodal conhecida. S: Acometimento do baço. X: Doença volumosa (<i>bulky</i>) – presença de grande massa mediastinal (>10 cm de diâmetro ou um terço do diâmetro torácico).

Tabela 4. <i>Performance status</i>	
0	Paciente assintomático
1	Paciente sintomático em ambulatório
2	Sintomático até 50% do tempo acamado
3	Sintomático mais de 50% do tempo acamado
4	Acamado o tempo todo

Além disso, principalmente nos pacientes com doença localizada (estádios I e II), é importante subclassificar o paciente como “prognóstico favorável” ou

“prognóstico desfavorável” segundo a *European Organization for the Research and Treatment of Cancer* (EORTC), já que esta classificação influencia diretamente a escolha do tratamento⁽¹⁷¹⁾. Os pacientes que apresentam idade superior a 50 anos, doença mediastinal significativa, quatro ou mais cadeias linfonodais ou sítios envolvidos, presença de sintomas B com velocidade de hemossedimentação (VHS) maior que 30 ou VHS maior 50 (mesmo sem sintomas B), são considerados de prognóstico desfavorável.

Os pacientes são tratados com quimioterapia (QT) e/ou radioterapia (RT). O esquema quimioterápico clássico é o ABVD (doxorrubicina, bleomicina, vimblastina e dacarbazina). O transplante de medula óssea não é muito usado no tratamento do LH, ficando como opção para as recidivas⁽¹⁷²⁻¹⁷⁶⁾.

Devido a sua importância, o microambiente também tem se tornado um novo alvo na terapia oncológica. Atualmente, os inibidores de PD-1 nivolumabe e pembrolizumabe são aprovados para uso clínico pelo *Food and Drug Administration* (FDA) no tratamento do LHc recidivante e refratário nos Estados Unidos. As taxas de resposta variam entre 65 e 87%, enquanto resposta completa foi observada em apenas 9 a 22% dos pacientes com LH. Ademais, a sobrevida livre de doença teve uma mediana de 11-15 meses⁽¹⁷⁷⁾.

Em ensaios clínicos, o anticorpo monoclonal anti-CD20 (rituximabe) para depleção das células B inicialmente demonstrou resultados favoráveis⁽¹⁷⁸⁾. Porém, isto não foi confirmado em ensaios maiores⁽¹⁷⁹⁻¹⁸¹⁾. O rituximabe pode ser uma estratégia terapêutica por eliminar diretamente as células HRS e também por atuar no microambiente circundante. Como agente único ele tem atividade nos casos de LHc recidivados e pode ser utilizado em associação com o ABVD nos casos avançados⁽¹⁸²⁾. Estudo recente observou que pacientes com células HRS CD20+ tratados com rituximabe associado a ABVD tiveram um aumento de 3 anos de sobrevida livre de doença⁽¹⁸²⁾.

O desenvolvimento de terapias modernas melhorou significativamente a sobrevida dos pacientes com LH nas últimas décadas. Entretanto, esta melhora veio acompanhada de complicações a longo prazo como elevado risco de uma segunda neoplasia primária^(183,184), como câncer de mama⁽¹⁸⁵⁾, leucemia não-linfocítica aguda, linfomas não-Hodgkin, câncer de pulmão, câncer de estômago e melanoma⁽¹⁸⁶⁾. Também são descritos aumento da incidência e mortalidade por doenças cardiovasculares e por infecções e sepse^(187,188).

3. JUSTIFICATIVA

O significado prognóstico da expressão de CD20 no LHc é controverso na literatura^(147,150-159,161-163,165,166,168). As diferenças observadas nos estudos podem ser relativas a critérios interpretativos da IHQ, a amostragem tecidual, às terapêuticas empregadas nas casuísticas ou mesmo podem refletir particularidades geográficas.

Com relação ao ponto de corte de positividade da imunoexpressão de CD20 nos casos com diagnóstico de LHc, muitos autores⁽¹⁸⁹⁻¹⁹³⁾ excluem-no na presença de mais de 20% de positividade forte e homogênea do CD20, favorecendo, por exemplo, outros diagnósticos como LHPLN, linfoma de grandes células B rico em linfócitos T/histócitos, linfoma difuso de grandes células B, linfoma de grandes células B primário mediastinal e linfomas da zona cinzenta. Outros autores⁽¹⁴⁷⁾ acreditam que a ausência de expressão ou expressão fraca de CD20 nas células HRS pode ser devido a variação de fixação de laboratório para laboratório, gerando, portanto, resultados inconsistentes.

Apesar de controverso, os estudos apontam evidências que a imunoexpressão de CD20 poderia afetar o desfecho clínico. O melhor entendimento da imunoexpressão do CD20 nas células neoplásicas com o reconhecimento de pontos de corte de percentual de expressão e sua relação com o microambiente tumoral, variáveis socioeconômicas, clínica, terapia, desfecho e fatores etiológicos auxilia no entendimento da fisiopatologia do LHc e consequentemente vislumbra aprimoramento das estratégias de abordagem dos pacientes.

Ademais, muitos estudos têm focado no impacto das células não-neoplásicas na fisiopatologia do LHc, especialmente através da expressão imunoistoquímica das células do microambiente com o objetivo de identificar potenciais marcadores prognósticos e alvos terapêuticos. Necessita-se de uma compreensão mais precisa dos mecanismos de escape imunológico nos pacientes com LHc e isto requer uma caracterização mais detalhada das populações celulares no microambiente tumoral. Esta abordagem tem implicações científicas e translacionais importantes podendo permitir investigações moleculares futuras nos pacientes com LHc no que diz respeito a esta complexa rede de células inflamatórias do microambiente deste tumor, favorecendo a implementação de terapias personalizadas.

Nosso estudo, portanto, se justifica no cenário da literatura médica especializada por estudar o papel da IHQ para CD20 no diagnóstico e no prognóstico

do LHc, alcançando, também, suas interfaces com o microambiente tumoral, cada vez mais estudado em oncopatologia. A pesquisa aqui desenvolvida propõe-se a avaliar o assunto com metodologia bastante próxima à realidade do patologista e fazendo interface com a investigação do microambiente, conferindo certo ineditismo a proposta que foi trabalhada na modalidade de doutorado.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVOS GERAIS

- Caracterizar o LHc quanto ao padrão de imunoexpressão para CD20 nas células diagnósticas e estabelecer o seu significado clínico-patológico.
- Caracterizar, por métodos morfológicos e imunofenotípicos, o microambiente tumoral em amostras de LHc descrevendo a topobiologia de macrófagos, plasmócitos, linfócitos B, linfócitos T, células NK e eosinófilos.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a frequência de LHc CD20+ e sua associação com dados morfológicos, imunofenotípicos e clínico-evolutivos.
- Identificar a distribuição da imunomarcacão de CD20 entre os subtipos histológicos de LHc.
- Analisar as associações entre a detecção da infecção pelo EBV e variáveis geográficas, clínico-evolutivas, morfológicas e imunofenotípicas, incluindo a imunoexpressão positiva para CD20.
- Caracterizar os elementos celulares do microambiente do LHc e suas associações com as células diagnóstica e os desfechos clínicos.
- Analisar a imunoexpressão de PD-1 em amostras de LHc.

REFERÊNCIAS

1. Swerdlow S, Campo E, Harris NL, Jaffe E, Pileri S, Stein H, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (Revised 4th edition). IARC: Lyon. 2017;421.
2. Küppers R. Reed–Sternberg Cells. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*: Elsevier; 2013. p. 113-5.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *Ca Cancer J Clin* 2018. p. 394–424.
4. Estimated number of incident cases from 2018 to 2040, hodgkin lymphoma, both sexes, all ages: Global Cancer Observatory; 2018 [Available from: <https://gco.iarc.fr/>].
5. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; 2019. p. 48-9.
6. Levi F, Lucchini F, Negri E, Boyle P, La Vecchia C. Trends in mortality from Hodgkin's disease in western and eastern Europe. *British journal of cancer*. 2002;87(3):291-3.
7. Yeoh K-W, Mikhaeel NG. Role of radiotherapy in modern treatment of Hodgkin's lymphoma. *Advances in hematology*. 2011;2011.
8. Chatenoud L, Bertuccio P, Bosetti C, Rodriguez T, Levi F, Negri E, et al. Hodgkin's lymphoma mortality in the Americas, 1997–2008: achievements and persistent inadequacies. *International journal of cancer*. 2013;133(3):687-94.
9. Correa P, O'Connor GT. Epidemiologic patterns of Hodgkin's disease. *International journal of cancer*. 1971;8(2):192-201.
10. Hjalgrim H, Engels E. Infectious aetiology of Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiological evidence. *Journal of internal medicine*. 2008;264(6):537-48.
11. Cartwright R, Watkins G. Epidemiology of Hodgkin's disease: a review. *Hematological Oncology*. 2004;22(1):11-26.
12. Kusminsky G, Abriata G, Forman D, Sierra MS. Hodgkin lymphoma burden in Central and South America. *Cancer epidemiology*. 2016;44:S158-S67.
13. Campos AHJFM, Moreira A, Ribeiro KB, Paes RP, Zerbini MC, Aldred V, et al. Frequency of EBV associated classical Hodgkin lymphoma decreases over a 54-year period in a Brazilian population. *Scientific reports*. 2018;8(1):1-8.
14. Glaser SL, Gulley ML, Clarke CA, Keegan TH, Chang ET, Shema SJ, et al. Racial/ethnic variation in EBV-positive classical Hodgkin lymphoma in California populations. *International journal of cancer*. 2008;123(7):1499-507.
15. Clarke CA, Glaser SL, Keegan TH, Stroup A. Neighborhood socioeconomic status and Hodgkin's lymphoma incidence in California. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2005;14(6):1441-7.
16. Biasoli I, Castro N, Delamain M, Silveira T, Farley J, Pinto Simões B, et al. Lower socioeconomic status is independently associated with shorter survival in Hodgkin Lymphoma patients—An analysis from the Brazilian Hodgkin Lymphoma Registry. *International Journal of Cancer*. 2018;142(5):883-90.
17. Borchmann S, Müller H, Engert A. Hodgkin Lymphoma has a seasonal pattern of incidence and mortality that depends on latitude. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-8.
18. Macmahons B. Epidemiological evidence on the nature of Hodgkin's disease. *Cancer*. 1957;10(5):1045-54.

19. Karube K, Niino D, Kimura Y, Ohshima K. Classical Hodgkin lymphoma, lymphocyte depleted type: clinicopathological analysis and prognostic comparison with other types of classical Hodgkin lymphoma. *Pathology-Research and Practice*. 2013;209(4):201-7.
20. Gulley ML, Eagan P, Quintanilla-Martinez L, Picado A, Smir B, Childs C, et al. Epstein-Barr virus DNA is abundant and monoclonal in the Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease: association with mixed cellularity subtype and Hispanic American ethnicity. 1994.
21. Wang HW, Balakrishna JP, Pittaluga S, Jaffe ES. Diagnosis of Hodgkin lymphoma in the modern era. *British journal of haematology*. 2019;184(1):45-59.
22. Vassallo J, Metze K, Traina F, De Souza CA, Lorand-Metze I. Expression of Epstein-Barr virus in classical Hodgkin's lymphomas in Brazilian adult patients. *haematologica*. 2001.
23. Vassallo J, Paes RP, Soares FA, Menezes Y, Aldred V, Ribeiro KdCB, et al. Histological classification of 1,025 cases of Hodgkin's lymphoma from the State of São Paulo, Brazil. *Sao Paulo Medical Journal*. 2005;123(3):134-6.
24. de Oliveira DE, Bacchi MM, Abreu ES, Niero-Melo L, Bacchi CE. Hodgkin disease in adult and juvenile groups from two different geographic regions in Brazil: characterization of clinicopathologic aspects and relationship with Epstein-Barr virus infection. *American journal of clinical pathology*. 2002;118(1):25-30.
25. Young LS, Yap LF, Murray PG. Epstein–Barr virus: more than 50 years old and still providing surprises. *Nature Reviews Cancer*. 2016;16(12):789.
26. Farrell PJ. Epstein–Barr virus and cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2019.
27. Küppers R, Engert A, Hansmann M-L. Hodgkin lymphoma. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(10):3439-47.
28. Jarrett R. Viruses and Hodgkin's lymphoma. *Annals of Oncology*. 2002;13:23-9.
29. Roman E, Smith AG. Epidemiology of lymphomas. *Histopathology*. 2011;58(1):4-14.
30. De Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *The lancet oncology*. 2012;13(6):607-15.
31. Carbone A, Gloghini A. Epstein Barr virus-associated Hodgkin lymphoma. *Cancers*. 2018;10(6):163.
32. Swerdlow A. Epidemiology of Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2003;30(1):S3-S12.
33. Hjalgrim H, Askling J, Rostgaard K, Hamilton-Dutoit S, Frisch M, Zhang J-S, et al. Characteristics of Hodgkin's lymphoma after infectious mononucleosis. *New England Journal of Medicine*. 2003;349(14):1324-32.
34. Hjalgrim H, Askling J, Sørensen P, Madsen M, Rosdahl N, Storm HH, et al. Risk of Hodgkin's disease and other cancers after infectious mononucleosis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000;92(18):1522-8.
35. Mueller N, Evans A, Harris NL, Comstock GW, Jellum E, Magnus K, et al. Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus. *New England Journal of Medicine*. 1989;320(11):689-95.
36. Harris N. The many faces of Hodgkin's disease around the world: what have we

- learned from its pathology? *Annals of oncology*. 1998;9:s45-s56.
37. Clarke CA, Glaser SL. Epidemiologic trends in HIV-associated lymphomas. *Current Opinion in Oncology*. 2001;13(5):354-9.
 38. Coglianò VJ, Baan R, Straif K, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, et al. Preventable exposures associated with human cancers. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011;103(24):1827-39.
 39. Glaser SL, Clarke CA, Gulley ML, Craig FE, DiGiuseppe JA, Dorfman RF, et al. Population-based patterns of human immunodeficiency virus-related Hodgkin lymphoma in the Greater San Francisco Bay Area, 1988–1998. *Cancer*. 2003;98(2):300-9.
 40. Townsend W, Linch D. Hodgkin's lymphoma in adults. *The Lancet*. 2012;380(9844):836-47.
 41. Ambinder RF. Epstein-barr virus and hodgkin lymphoma. *ASH Education Program Book*. 2007;2007(1):204-9.
 42. Filipovich A, Mathur A, Kamat D, Shapiro R. Primary immunodeficiencies: genetic risk factors for lymphoma. *Cancer research*. 1992;52(19 Supplement):5465s-7s.
 43. Rowlings PA, Curtis RE, Passweg JR, Deeg HJ, Socié G, Travis LB, et al. Increased incidence of Hodgkin's disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Journal of clinical oncology*. 1999;17(10):3122-7.
 44. Penn I, editor *Neoplastic complications of transplantation*. *Seminars in respiratory infections*; 1993.
 45. Garnier J-L, Lebranchu Y, Dantal J, Bedrossian J, Cahen R, Assouline D, et al. Hodgkin's disease after transplantation. *Transplantation*. 1996;61(1):71-6.
 46. Landgren O, Engels EA, Pfeiffer RM, Gridley G, Møller H, Olsen JH, et al. Autoimmunity and susceptibility to Hodgkin lymphoma: a population-based case–control study in Scandinavia. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006;98(18):1321-30.
 47. Caporaso NE, Goldin LR, Anderson WF, Landgren O. Current insight on trends, causes, and mechanisms of Hodgkin's lymphoma. *The Cancer Journal*. 2009;15(2):117-23.
 48. Goldin LR, Björkholm M, Kristinsson SY, Turesson I, Landgren O. Highly increased familial risks for specific lymphoma subtypes. *British journal of haematology*. 2009;146(1):91-4.
 49. Cerhan JR, Slager SL. Familial predisposition and genetic risk factors for lymphoma. *Blood*. 2015;126(20):2265-73.
 50. Cozen W, Li D, Best T, Van Den Berg DJ, Gourraud P-A, Cortessis VK, et al. A genome-wide meta-analysis of nodular sclerosing Hodgkin lymphoma identifies risk loci at 6p21. 32. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2012;119(2):469-75.
 51. Evens A, Antillon M, Aschebrook-Kilfoy B, Chiu B-H. Racial disparities in Hodgkin's lymphoma: a comprehensive population-based analysis. *Annals of oncology*. 2012;23(8):2128-37.
 52. Au W, Gascoyne R, Gallagher R, Le N, Klasa R, Liang R, et al. Hodgkin's lymphoma in Chinese migrants to British Columbia: a 25-year survey. *Annals of oncology*. 2004;15(4):626-30.
 53. Sargentanis TN, Kanavidis P, Michelakos T, Petridou ET. Cigarette smoking and risk of lymphoma in adults: a comprehensive meta-analysis on Hodgkin and non-Hodgkin disease. *European journal of cancer prevention*. 2013;22(2):131-50.

54. Kamper-Jørgensen M, Rostgaard K, Glaser S, Zahm S, Cozen W, Smedby K, et al. Cigarette smoking and risk of Hodgkin lymphoma and its subtypes: a pooled analysis from the International Lymphoma Epidemiology Consortium (InterLymph). *Annals of oncology*. 2013;24(9):2245-55.
55. Hodgkin T. On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Med Chir Soc Tr*. 1832;17:68-114.
56. Hellman S. A brief consideration of Thomas Hodgkin and his times. *Hodgkin's Disease Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins*. 1999:3-7.
57. Stone MJ, editor *Thomas Hodgkin: medical immortal and uncompromising idealist*. Baylor University Medical Center Proceedings; 2005: Taylor & Francis.
58. Rosenfeld L. Thomas Hodgkin (1798-1866): morbid anatomist and social activist. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*. 1986;62(2):193.
59. Rosenfeld L. Hodgkin's disease: origin of an eponym--and one that got away. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*. 1989;65(5):618.
60. Küppers R. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nature Reviews Cancer*. 2009;9(1):15-27.
61. Weniger MA, Tiacci E, Schneider S, Arnolds J, Rüschenbaum S, Dupbach J, et al. Human CD30+ B cells represent a unique subset related to Hodgkin lymphoma cells. *The Journal of clinical investigation*. 2018;128(7):2996-3007.
62. Küppers R. Origin of Hodgkin Lymphoma. *Hematology: Elsevier*; 2018. p. 1204-11.
63. Liu, W. Robert; Shipp, Margaret A. Signaling pathways and immune evasion mechanisms in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2017;130(21), 2265–2270.
64. Engert A, Younes A. *Hodgkin lymphoma: a comprehensive overview: Springer Nature*; 2020.
65. Babcock GJ, Decker LL, Volk M, Thorley-Lawson DA. EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity*. 1998;9(3):395-404.
66. Chiu Y-F, Sugden B. Epstein-Barr virus: The path from latent to productive infection. *Annual Review of Virology*. 2016;3:359-72.
67. Kang M-S, Kieff E. Epstein–Barr virus latent genes. *Experimental & molecular medicine*. 2015;47(1):e131-e.
68. Ok CY, Li L, Young KH. EBV-driven B-cell lymphoproliferative disorders: from biology, classification and differential diagnosis to clinical management. *Experimental & Molecular Medicine*. 2015;47(1):e132-e.
69. Grywalska E, Rolinski J, editors. *Epstein-barr virus–associated lymphomas. Seminars in oncology*; 2015: Elsevier.
70. Baumforth KR, Birgersdotter A, Reynolds GM, Wei W, Kapatai G, Flavell JR, et al. Expression of the Epstein-Barr virus-encoded Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in Hodgkin's lymphoma cells mediates Up-regulation of CCL20 and the migration of regulatory T cells. *The American journal of pathology*. 2008;173(1):195-204.
71. Wu R, Sattarzadeh A, Rutgers B, Diepstra A, van den Berg A, Visser L. The microenvironment of classical Hodgkin lymphoma: Heterogeneity by Epstein–Barr virus presence and location within the tumor. *Blood cancer journal*. 2016;6(5):e417-e.
72. Carbone A, Gloghini A, Carlo-Stella C. Are EBV-related and EBV-unrelated Hodgkin lymphomas different with regard to susceptibility to checkpoint blockade? *blood*. 2018;132(1):17-22.
73. Portis T, Dyck P, Longnecker R. Epstein-Barr Virus (EBV) LMP2A induces alterations in gene transcription similar to those observed in Reed-Sternberg

- cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2003;102(12):4166-78.
74. Anderson LJ, Longnecker R. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A exploits Notch1 to alter B-cell identity in vivo. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2009;113(1):108-16.
 75. Eliopoulos AG, Stack M, Dawson CW, Kaye KM, Hodgkin L, Sihota S, et al. Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and CD40 mediate IL-6 production in epithelial cells via an NF- κ B pathway involving TNF receptor-associated factors. *Oncogene*. 1997;14(24):2899-916.
 76. Eliopoulos AG, Gallagher NJ, Blake SM, Dawson CW, Young LS. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(23):16085-96.
 77. Green MR, Rodig S, Juszczynski P, Ouyang J, Sinha P, O'Donnell E, et al. Constitutive AP-1 activity and EBV infection induce PD-L1 in Hodgkin lymphomas and posttransplant lymphoproliferative disorders: implications for targeted therapy. *Clinical cancer research*. 2012;18(6):1611-8.
 78. Chetaille B, Bertucci F, Finetti P, Esterni B, Stamatoullas A, Picquenot JM, et al. Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2009;113(12):2765-3775.
 79. Dukers DF, Meij P, Vervoort MB, Vos W, Scheper RJ, Meijer CJ, et al. Direct immunosuppressive effects of EBV-encoded latent membrane protein 1. *The Journal of Immunology*. 2000;165(2):663-70.
 80. Ahmed W, Philip PS, Attoub S, Khan G. Epstein-Barr virus-infected cells release Fas ligand in exosomal fractions and induce apoptosis in recipient cells via the extrinsic pathway. *Journal of General Virology*. 2015;96(12):3646-59.
 81. Johnson PC, McAulay KA, Montgomery D, Lake A, Shield L, Gallagher A, et al. Modeling HLA associations with EBV-positive and-negative Hodgkin lymphoma suggests distinct mechanisms in disease pathogenesis. *International journal of cancer*. 2015;137(5):1066-75.
 82. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*. 2011;144(5):646-74.
 83. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer cell*. 2012;21(3):309-22.
 84. Pileri S, Ascani S, Leoncini L, Sabattini E, Zinzani P, Piccaluga P, et al. Hodgkin's lymphoma: the pathologist's viewpoint. *Journal of clinical pathology*. 2002;55(3):162-76.
 85. Piccaluga PP, Agostinelli C, Gazzola A, Tripodo C, Bacci F, Sabattini E, et al. Pathobiology of Hodgkin lymphoma. *Advances in hematology*. 2011;2011.
 86. Wein F, Küppers R. The role of T cells in the microenvironment of Hodgkin lymphoma. *Journal of Leukocyte Biology*. 2016;99(1):45-50.
 87. Reichel J, Chadburn A, Rubinstein PG, Giulino-Roth L, Tam W, Liu Y, et al. Flow sorting and exome sequencing reveal the oncogenome of primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2015;125(7):1061-72.
 88. Roemer MG, Redd RA, Cader FZ, Pak CJ, Abdelrahman S, Ouyang J, et al. Major histocompatibility complex class II and programmed death ligand 1 expression predict outcome after programmed death 1 blockade in classic Hodgkin lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(10):942.

89. Kapatai G, Murray P. Contribution of the Epstein–Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. *Journal of clinical pathology*. 2007;60(12):1342-9.
90. Kilger E, Kieser A, Baumann M, Hammerschmidt W. Epstein–Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *The EMBO journal*. 1998;17(6):1700-9.
91. Alonso-Álvarez S, Vidriales MB, Caballero MD, Blanco O, Puig N, Martín A, et al. The number of tumor infiltrating T-cell subsets in lymph nodes from patients with Hodgkin lymphoma is associated with the outcome after first line ABVD therapy. *Leukemia & lymphoma*. 2017;58(5):1144-52.
92. Álvaro-naranjo T, Lejeune M, Salvadó-Usach MT, Bosch-Príncipe R, Reverter-Branchat G, Jaén-Martínez J, et al. Tumor-infiltrating cells as a prognostic factor in Hodgkin's lymphoma: a quantitative tissue microarray study in a large retrospective cohort of 267 patients. *Leukemia & lymphoma*. 2005;46(11):1581-91.
93. Álvaro T, Lejeune M, Salvadó MT, Bosch R, García JF, Jaén J, et al. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clinical Cancer Research*. 2005;11(4):1467-73.
94. Vari F, Arpon D, Keane C, Hertzberg MS, Talaulikar D, Jain S, et al. Immune evasion via PD-1/PD-L1 on NK cells and monocyte/macrophages is more prominent in Hodgkin lymphoma than DLBCL. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2018;131(16):1809-19.
95. Carbone A, Gloghini A, Pruneri G, Dolcetti R. Optimizing checkpoint inhibitors therapy for relapsed or progressive classic Hodgkin lymphoma by multiplex immunohistochemistry of the tumor microenvironment. *Cancer medicine*. 2019;8(6):3012-6.
96. Carey CD, Gusenleitner D, Lipschitz M, Roemer MG, Stack EC, Gjini E, et al. Topological analysis reveals a PD-L1-associated microenvironmental niche for Reed-Sternberg cells in Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2017;130(22):2420-30.
97. Hollander P, Kamper P, Smedby KE, Enblad G, Ludvigsen M, Mortensen J, et al. High proportions of PD-1+ and PD-L1+ leukocytes in classical Hodgkin lymphoma microenvironment are associated with inferior outcome. *Blood advances*. 2017;1(18):1427-39.
98. Muenst S, Hoeller S, Dirnhofer S, Tzankov A. Increased programmed death-1+ tumor-infiltrating lymphocytes in classical Hodgkin lymphoma substantiate reduced overall survival. *Human pathology*. 2009;40(12):1715-22.
99. Chiu J, Ernst DM, Keating A. Acquired natural killer cell dysfunction in the tumor microenvironment of classic Hodgkin lymphoma. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:267.
100. Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, Went P, Pileri SA, Dirnhofer S. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *haematologica*. 2008;93(2):193-200.
101. Menter T, Bodmer-Haecki A, Dirnhofer S, Tzankov A. Evaluation of the diagnostic and prognostic value of PDL1 expression in Hodgkin and B-cell lymphomas. *Human pathology*. 2016;54:17-24.
102. Greaves P, Clear A, Coutinho R, Wilson A, Matthews J, Owen A, et al. Expression of FOXP3, CD68, and CD20 at diagnosis in the microenvironment

- of classical Hodgkin lymphoma is predictive of outcome. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(2):256.
103. Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2010;362(10):875-85.
 104. Tudor CS, Distel LV, Eckhardt J, Hartmann A, Niedobitek G, Buettner M. B cells in classical Hodgkin lymphoma are important actors rather than bystanders in the local immune reaction. *Human Pathology*. 2013;44(11):2475-86.
 105. Panico L, Tenneriello V, Ronconi F, Lepore M, Cantore N, Dell'Angelo AC, et al. High CD20+ background cells predict a favorable outcome in classical Hodgkin lymphoma and antagonize CD68+ macrophages. *Leukemia & lymphoma*. 2015;56(6):1636-42.
 106. Jachimowicz RD, Pieper L, Reinke S, Gontarewicz A, Plütschow A, Haverkamp H, et al. Analysis of the tumor microenvironment by whole-slide image analysis identifies low B cell content as a predictor of adverse outcome in advanced-stage classical Hodgkin lymphoma treated with BEACOPP. *Haematologica*. 2020.
 107. Visser L. Plasma cells in classical Hodgkin lymphoma: a new player in the microenvironment? *British journal of haematology*. 2019;184(2):119.
 108. Gholiha AR, Hollander P, Hedstrom G, Sundstrom C, Molin D, Smedby KE, et al. High tumour plasma cell infiltration reflects an important microenvironmental component in classic Hodgkin lymphoma linked to presence of B-symptoms. *British journal of haematology*. 2019;184(2):192-201.
 109. Enblad G, Sundstrom C, Glimelius B. Infiltration of eosinophils in Hodgkin's disease involved lymph nodes predicts prognosis. *Hematological oncology*. 1993;11(4):187-93.
 110. Molin D, Edström A, Glimelius I, Glimelius B, Nilsson G, Sundström C, et al. Mast cell infiltration correlates with poor prognosis in Hodgkin's lymphoma. *British journal of haematology*. 2002;119(1):122-4.
 111. Ohshima K, Akaiwa M, Umeshita R, Suzumiya J, Izuhara K, Kikuchi M. Interleukin-13 and interleukin-13 receptor in Hodgkin's disease: possible autocrine mechanism and involvement in fibrosis. *Histopathology*. 2001;38(4):368-75.
 112. Pinto A, Aldinucci D, Gloghini A, Zagonel A, Degan M, Perin V, et al. The role of eosinophils in the pathobiology of Hodgkin's disease. *Annals of oncology*. 1997;8:S89-S96.
 113. Pinto A, Aldinucci D, Gloghini A, Zagonel V, Degan M, Improta S, et al. Human eosinophils express functional CD30 ligand and stimulate proliferation of a Hodgkin's disease cell line. 1996.
 114. Tudor CS, Bruns H, Daniel C, Distel LV, Hartmann A, Gerbitz A, et al. Macrophages and dendritic cells as actors in the immune reaction of classical Hodgkin lymphoma. *PloS one*. 2014;9(12):e114345.
 115. Mills CD. Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages. *Frontiers in immunology*. 2015;6:212.
 116. Hollander P, Rostgaard K, Smedby KE, Molin D, Loskog A, de Nully Brown P, et al. An anergic immune signature in the tumor microenvironment of classical Hodgkin lymphoma is associated with inferior outcome. *European journal of haematology*. 2018;100(1):88-97.
 117. Guo B, Cen H, Tan X, Ke Q. Meta-analysis of the prognostic and clinical value of tumor-associated macrophages in adult classical Hodgkin lymphoma. *BMC*

- medicine. 2016;14(1):159.
118. Jakovic LR, Mihaljevic BS, Perunicic Jovanovic MD, Bogdanovic AD, Andjelic BM, Bumbasirevic VZ. The prognostic relevance of tumor associated macrophages in advanced stage classical Hodgkin lymphoma. *Leukemia & lymphoma*. 2011;52(10):1913-9.
 119. Kamper P, Bendix K, Hamilton-Dutoit S, Honoré B, Nyengaard JR, d'Amore F. Tumor-infiltrating macrophages correlate with adverse prognosis and Epstein-Barr virus status in classical Hodgkin's lymphoma. *haematologica*. 2011;96(2):269-76.
 120. Zaki MA, Wada N, Ikeda J, Shibayama H, Hashimoto K, Yamagami T, et al. Prognostic implication of types of tumor-associated macrophages in Hodgkin lymphoma. *Virchows Archiv*. 2011;459(4):361.
 121. Tan KL, Scott DW, Hong F, Kahl BS, Fisher RI, Bartlett NL, et al. Tumor-associated macrophages predict inferior outcomes in classic Hodgkin lymphoma: a correlative study from the E2496 Intergroup trial. *Blood*. 2012;120(16):3280-7.
 122. Koh YW, Park C-S, Yoon DH, Suh C, Huh J. CD163 expression was associated with angiogenesis and shortened survival in patients with uniformly treated classical Hodgkin lymphoma. *PLoS One*. 2014;9(1):e87066.
 123. Jiang T, Cheng X, Jia Y. Prognostic value of tumor-associated macrophages in classic Hodgkin's lymphoma: systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2016;9(6):10784-92.
 124. Mohamed O, El Bastawisy A, Allahlobi N, Abdellateif MS, Zekri ARN, Shaarawy S, et al. The role of CD68+ macrophage in classical Hodgkin lymphoma patients from Egypt. *Diagnostic pathology*. 2020;15(1):10.
 125. Abd Allah MY, Fahmi MW, EL-Ashwah S. Clinico-pathological significance of immunohistochemically marked tumor-associated macrophage in classic Hodgkin lymphoma. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*. 2020;32:1-9.
 126. Touati M, Delage-Corre M, Monteil J, Abraham J, Moreau S, Remenieras L, et al. CD68-positive tumor-associated macrophages predict unfavorable treatment outcomes in classical Hodgkin lymphoma in correlation with interim fluorodeoxyglucose-positron emission tomography assessment. *Leukemia & lymphoma*. 2015;56(2):332-41.
 127. Gotti M, Nicola M, Lucioni M, Fiaccadori V, Ferretti V, Sciarra R, et al. Independent prognostic impact of tumour-infiltrating macrophages in early-stage Hodgkin's lymphoma. *Hematological oncology*. 2017;35(3):296-302.
 128. Procházka V, Papajík T, Dýšková T, Dihel M, Prouzová Z, Kriegová E. The lymphoma-associated macrophage to Hodgkin-Reed-Sterneberg cell ratio is a poor prognostic factor in classic Hodgkin lymphoma patients. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*. 2019:e573-e80.
 129. Yoon DH, Koh YW, Kang HJ, Kim S, Park CS, Lee Sw, et al. CD68 and CD163 as prognostic factors for Korean patients with Hodgkin lymphoma. *European journal of haematology*. 2012;88(4):292-305.
 130. Azambuja D, Natkunam Y, Biasoli I, Lossos I, Anderson M, Morais J, et al. Lack of association of tumor-associated macrophages with clinical outcome in patients with classical Hodgkin's lymphoma. *Annals of oncology*. 2012;23(3):736-42.
 131. Harris JA, Jain S, Ren Q, Zarineh A, Liu C, Ibrahim S. CD163 versus CD68 in tumor associated macrophages of classical Hodgkin lymphoma. *Diagnostic*

- pathology. 2012;7(1):12.
132. Kayal S, Mathur S, Karak AK, Kumar L, Sharma A, Bakhshi S, et al. CD68 tumor-associated macrophage marker is not prognostic of clinical outcome in classical Hodgkin lymphoma. *Leukemia & lymphoma*. 2014;55(5):1031-7.
 133. Glimelius I, Edström A, Amini RM, Fischer M, Nilsson G, Sundström C, et al. IL-9 expression contributes to the cellular composition in Hodgkin lymphoma. *European journal of haematology*. 2006;76(4):278-83.
 134. Aldinucci D, Gloghini A, Pinto A, De Filippi R, Carbone A. The classical Hodgkin's lymphoma microenvironment and its role in promoting tumour growth and immune escape. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*. 2010;221(3):248-63.
 135. Mizuno H, Nakayama T, Miyata Y, Saito S, Nishiwaki S, Nakao N, et al. Mast cells promote the growth of Hodgkin's lymphoma cell tumor by modifying the tumor microenvironment that can be perturbed by bortezomib. *Leukemia*. 2012;26(10):2269-76.
 136. Molin D, Fischer M, Xiang Z, Larsson U, Harvima I, Venge P, et al. Mast cells express functional CD30 ligand and are the predominant CD30L-positive cells in Hodgkin's disease. *British journal of haematology*. 2001;114(3):616-23.
 137. Keresztes K, Szollosi Z, Simon Z, Tarkanyi I, Nemes Z, Illes A. Retrospective analysis of the prognostic role of tissue eosinophil and mast cells in Hodgkin's lymphoma. *Pathology & Oncology Research*. 2007;13(3):237-42.
 138. Glimelius I, Rubin J, Rostgaard K, Amini RM, Simonsson M, Sorensen KM, et al. Predictors of histology, tissue eosinophilia and mast cell infiltration in Hodgkin's Lymphoma—a population-based study. *European journal of haematology*. 2011;87(3):208-16.
 139. Andersen MD, Kamper P, Nielsen PS, Bendix K, Riber-Hansen R, Steiniche T, et al. Tumour-associated mast cells in classical Hodgkin's lymphoma: correlation with histological subtype, other tumour-infiltrating inflammatory cell subsets and outcome. *European journal of haematology*. 2016;96(3):252-9.
 140. Vockerodt M, Yap LF, Shannon-Lowe C, Curley H, Wei W, Vrzalikova K, et al. The Epstein–Barr virus and the pathogenesis of lymphoma. *The Journal of pathology*. 2015;235(2):312-22.
 141. Cassol E, Cassetta L, Rizzi C, Alfano M, Poli G. M1 and M2a polarization of human monocyte-derived macrophages inhibits HIV-1 replication by distinct mechanisms. *The Journal of Immunology*. 2009;182(10):6237-46.
 142. Korkolopoulou P, Thymara I, Kavantzias N, Vassilakopoulos T, Angelopoulou M, Kokoris S, et al. Angiogenesis in Hodgkin's lymphoma: a morphometric approach in 286 patients with prognostic implications. *Leukemia*. 2005;19(6):894-900.
 143. Glimelius I, Edström A, Fischer M, Nilsson G, Sundström C, Molin D, et al. Angiogenesis and mast cells in Hodgkin lymphoma. *Leukemia*. 2005;19(12):2360-2.
 144. Schmitz R, Stanelle J, Hansmann M-L, Küppers R. Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2009;4:151-74.
 145. Hsi ED. *Hematopathology (Expert Consult)*: Elsevier Health Sciences; 2012.
 146. Hartmann S, Jakobus C, Rengstl B, Döring C, Newrzela S, Brodt H-R, et al. Spindle-shaped CD163+ rosetting macrophages replace CD4+ T-cells in HIV-related classical Hodgkin lymphoma. *Modern Pathology*. 2013;26(5):648-57.
 147. Benharroch D, Nalbandyan K, Lazarev I. CD20 over-expression in Hodgkin-

- Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma: the neglected quest. *Journal of Cancer*. 2015;6(11):1155.
148. Schmid C, Pan L, Diss T, Isaacson P. Expression of B-cell antigens by Hodgkin's and Reed-Sternberg cells. *The American journal of pathology*. 1991;139(4):701.
 149. Zukerberg LR, Collins AB, Ferry JA, Harris NL. Coexpression of CD15 and CD20 by Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *The American journal of pathology*. 1991;139(3):475.
 150. Enblad G, Sundstrom C, Glimelius B. Immunohistochemical characteristics of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in relation to age and clinical outcome. *Histopathology*. 1993;22(6):535-41.
 151. Molot RJ, Mendenhall NP, Barré DM, Braylan RC. The clinical relevance of L26, a B-cell-specific antibody, in Hodgkin's disease. *American journal of clinical oncology*. 1994;17(3):185-8.
 152. Von Wasielewski R, Mengel M, Fischer R, Hansmann M-L, Hübner K, Franklin J, et al. Classical Hodgkin's disease. Clinical impact of the immunophenotype. *The American journal of pathology*. 1997;151(4):1123.
 153. Watanabe K, Yamashita Y, Nakayama A, Hasegawa Y, Kojima H, Nagasawa T, et al. Varied B-cell immunophenotypes of Hodgkin/Reed-Sternberg cells in classic Hodgkin's disease. *Histopathology*. 2000;36(4):353-61.
 154. Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Viviani S, Bonfante V, Nadali G-P, Vassilakopoulos TP, et al. CD20 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease: associations with presenting features and clinical outcome. *Journal of Clinical Oncology*. 2002;20(5):1278-87.
 155. Tzankov A, Zimpfer A, Pehrs A-C, Lugli A, Went P, Maurer R, et al. Expression of B-cell markers in classical Hodgkin lymphoma: a tissue microarray analysis of 330 cases. *Modern Pathology*. 2003;16(11):1141-7.
 156. Tzankov A, Krugmann J, Fend F, Fischhofer M, Greil R, Dirnhofer S. Prognostic significance of CD20 expression in classical Hodgkin lymphoma: a clinicopathological study of 119 cases. *Clinical cancer research*. 2003;9(4):1381-6.
 157. Portlock CS, Donnelly GB, Qin J, Straus D, Yahalom J, Zelenetz A, et al. Adverse prognostic significance of CD20 positive Reed–Sternberg cells in classical Hodgkin's disease. *British journal of haematology*. 2004;125(6):701-8.
 158. Aldred V, Vassallo J, Froes M, Campos AHJ, Augusto Soares F. CD20 expression by Hodgkin–Reed–Sternberg cells in classical Hodgkin lymphoma is related to reduced overall survival in young adult patients. *Leukemia & lymphoma*. 2008;49(11):2198-202.
 159. Fu XH, Wang SS, Huang Y, Xiao J, Zhai LZ, Xia ZJ, et al. Prognostic significance of CD20 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's Lymphoma. *Ai zheng= Aizheng= Chinese journal of cancer*. 2008;27(11):1197-203.
 160. Barakzai MA, Ahmed S. CD20 positivity in classical hodgkin's lymphoma: diagnostic challenge or targeting opportunity. *Indian journal of pathology & microbiology*. 2009;52(1):6.
 161. Giesta RP, Rocha Filho FD, Ferreira FVdA, Quixadá ATdS, Heukelbach J, Giesta MdAG. Influence of CD 20 antigen expression in the refractoriness of classical Hodgkin lymphoma in the first line treatment with ABVD protocol in Ceará state, Brazil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2009;45(3):247-52.

162. Canioni D, Deau-Fischer B, Taupin P, Ribrag V, Delarue R, Bosq J, et al. Prognostic significance of new immunohistochemical markers in refractory classical Hodgkin lymphoma: a study of 59 cases. *PloS one*. 2009;4(7):e6341.
163. Elsayed AA, Asano N, Ohshima K, Izutsu K, Kinoshita T, Nakamura S. Prognostic significance of CD 20 expression and Epstein-Barr virus (EBV) association in classical Hodgkin lymphoma in Japan: A clinicopathologic study. *Pathology International*. 2014;64(7):336-45.
164. Korkolopoulou P, Cordell J, Jones M, Kaklamanis L, Tsenga A, Gatter K, et al. The expression of the B-cell marker mb-1 (CD79a) in Hodgkin's disease. *Histopathology*. 1994;24(6):511-5.
165. Vassallo J, Metze K, Traina F, de Souza CA, Lorand-Metze I. Further remarks on the expression of CD20 in classical Hodgkin's lymphomas. *Haematologica*. 2002;87(3):ELT17.
166. Mohammadi SA, Mehrjerdi AZ, Basi A. The value of B-cell lymphoma 2 and CD20 markers for predicting response to treatment and disease recurrence in patients suffering Hodgkin's disease. *Journal of Preventive Epidemiology*. 2018;3(2):e20-e.
167. Isaacson P, Ashton-Key M. Phenotype of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *The Lancet*. 1996;347(8999):481.
168. Lauritzen AF, Møller PH, Nedergaard T, Guldberg P, Hou-Jensen K, Ralfkiaer E. Apoptosis-related genes and proteins in Hodgkin's disease. *Apmis*. 1999;107(7-12):636-44.
169. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the committee on Hodgkin's disease staging classification. *Cancer research*. 1971;31(11):1860-1.
170. Lister T, Crowther D, Sutcliffe S, Glatstein E, Canellos G, Young R, et al. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *Journal of Clinical Oncology*. 1989;7(11):1630-6.
171. Klimm B, Goergen H, Fuchs M, von Tresckow B, Böll B, Meissner J, et al. Impact of risk factors on outcomes in early-stage Hodgkin's lymphoma: an analysis of international staging definitions. *Annals of oncology*. 2013;24(12):3070-6.
172. Canellos GP, Anderson JR, Propert KJ, Nissen N, Cooper MR, Henderson ES, et al. Chemotherapy of advanced Hodgkin's disease with MOPP, ABVD, or MOPP alternating with ABVD. *New England Journal of Medicine*. 1992;327(21):1478-84.
173. Connors JM, Jurczak W, Straus DJ, Ansell SM, Kim WS, Gallamini A, et al. Brentuximab vedotin with chemotherapy for stage III or IV Hodgkin's lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2018;378(4):331-44.
174. Dann EJ, Bar-Shalom R, Tamir A, Haim N, Ben-Shachar M, Avivi I, et al. Risk-adapted BEACOPP regimen can reduce the cumulative dose of chemotherapy for standard and high-risk Hodgkin lymphoma with no impairment of outcome. *Blood*. 2007;109(3):905-9.
175. Eich HT, Diehl V, Görgen H, Pabst T, Markova J, Debus J, et al. Intensified chemotherapy and dose-reduced involved-field radiotherapy in patients with early unfavorable Hodgkin's lymphoma: final analysis of the German Hodgkin Study Group HD11 trial. *Journal of clinical oncology*. 2010;28(27):4199-206.
176. Bartlett NL, Rosenberg SA, Hoppe RT, Hancock SL, Horning SJ. Brief chemotherapy, Stanford V, and adjuvant radiotherapy for bulky or advanced-stage Hodgkin's disease: A preliminary report. *Journal of clinical oncology*.

- 1995;13(5):1080-8.
177. Merryman RW, Armand P, Wright KT, Rodig SJ. Checkpoint blockade in Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma. *Blood advances*. 2017;1(26):2643-54.
 178. Younes A, Romaguera J, Hagemeister F, McLaughlin P, Rodriguez MA, Fiumara P, et al. A pilot study of rituximab in patients with recurrent, classic Hodgkin disease. *Cancer*. 2003;98(2):310-4.
 179. Borchmann P, Goergen H, Kobe C, Lohri A, Greil R, Eichenauer DA, et al. PET-guided treatment in patients with advanced-stage Hodgkin's lymphoma (HD18): final results of an open-label, international, randomised phase 3 trial by the German Hodgkin Study Group. *The Lancet*. 2017;390(10114):2790-802.
 180. Younes A, Oki Y, McLaughlin P, Copeland AR, Goy A, Pro B, et al. Phase 2 study of rituximab plus ABVD in patients with newly diagnosed classical Hodgkin lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2012;119(18):4123-8.
 181. Kasamon YL, Jacene HA, Gocke CD, Swinnen LJ, Gladstone DE, Perkins B, et al. Phase 2 study of rituximab-ABVD in classical Hodgkin lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2012;119(18):4129-32.
 182. Strati P, Fanale MA, Oki Y, Turturro F, Fayad LE, Bartlett NL, et al. ABVD plus rituximab versus ABVD alone for advanced stage, high-risk classical Hodgkin lymphoma: a randomized phase 2 study. *Haematologica*. 2019;104(2):e65.
 183. Ng AK, Bernardo MP, Weller E, Backstrand K, Silver B, Marcus KC, et al. Second malignancy after Hodgkin disease treated with radiation therapy with or without chemotherapy: long-term risks and risk factors. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2002;100(6):1989-96.
 184. Dores GM, Metayer C, Curtis RE, Lynch CF, Clarke EA, Glimelius B, et al. Second malignant neoplasms among long-term survivors of Hodgkin's disease: a population-based evaluation over 25 years. *Journal of clinical oncology*. 2002;20(16):3484-94.
 185. Travis LB, Hill DA, Dores GM, Gospodarowicz M, Van Leeuwen FE, Holowaty E, et al. Breast cancer following radiotherapy and chemotherapy among young women with Hodgkin disease. *Jama*. 2003;290(4):465-75.
 186. Foss Abrahamsen A, Andersen A, Nome O, Jacobsen A, Holte H, Foss Abrahamsen J, et al. Long-term risk of second malignancy after treatment of Hodgkin's disease: the influence of treatment, age and follow-up time. *Annals of Oncology*. 2002;13(11):1786-91.
 187. Ng AK, Bernardo MP, Weller E, Backstrand KH, Silver B, Marcus KC, et al. Long-term survival and competing causes of death in patients with early-stage Hodgkin's disease treated at age 50 or younger. *Journal of Clinical Oncology*. 2002;20(8):2101-8.
 188. Aleman BM, van den Belt-Dusebout AW, Klokman WJ, van't Veer MB, Bartelink H, van Leeuwen FE. Long-term cause-specific mortality of patients treated for Hodgkin's lymphoma. *Optimizing treatment of patients with Hodgkin's lymphoma*. 2007;21:95.
 189. Rüdiger T, Ott G, Ott MM, Müller-Deubert SM, Müller-Hermelink HK. Differential diagnosis between classic Hodgkin's lymphoma, T-cell-rich B-cell lymphoma, and paragranuloma by paraffin immunohistochemistry. *The American journal of surgical pathology*. 1998;22(10):1184-91.
 190. Boudová L, Torlakovic E, Delabie J, Reimer P, Pfistner B, Wiedenmann S, et al. Nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma with nodules resembling T-cell/histiocyte-rich B-cell lymphoma: differential diagnosis between nodular

- lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma and T-cell/histiocyte-rich B-cell lymphoma. *Blood*. 2003;102(10):3753-8.
191. Gazal D, Andre H, Mounier N. Pathologic and clinical features of 77 Hodgkin's lymphoma patients treated in a lymphoma protocol. 2001.
 192. Harris NL. Shades of gray between large B-cell lymphomas and Hodgkin lymphomas: differential diagnosis and biological implications. *Modern Pathology*. 2013;26(1):S57-S70.
 193. Yamamoto W, Nakamura N, Tomita N, Ishii Y, Takasaki H, Hashimoto C, et al. Clinicopathological analysis of mediastinal large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma of the mediastinum. *Leukemia & lymphoma*. 2013;54(5):967-72.

CAPÍTULO II

ARTIGO CIENTÍFICO

(Artigo escrito segundo recomendações para publicação no Diagnostic Pathology Journal - <https://diagnosticpathology.biomedcentral.com/submission-guidelines>)

**QUAIS OS SIGNIFICADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DA POSITIVIDADE
PARA CD20 E DO MICROAMBIENTE TUMORAL NO
LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO?**

Dominique Fonseca Rodrigues Lacet

MD. Médica patologista, aluna da pós-graduação do programa de Pós-graduação em Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Universidade Estadual Paulista (UNESP). Patologista do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Luxemburgo/Instituto Mário Penna e docente da faculdade de Medicina da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

E-mail: domilacet@gmail.com

Andrey G. Santos

Acadêmico do curso de medicina da FMB UNESP. Monitor da disciplina de Patologia Geral, no Departamento de Patologia, FMB UNESP.

Ligia Niero-Melo

MD. PhD. Médica hematologista. Disciplina de Hematologia, Departamento de Clínica Médica, FMB UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Cristiano Claudino Oliveira

MD. PhD. Médico patologista. Laboratório de Anatomia Patológica, Hospital São Luiz/D'Or, Núcleo Técnico-Operacional de São Paulo. Membro do corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Patologia, FMB UNESP. São Paulo, Brasil.

E-mail: cristiano_c_oliveira@hotmail.com

Endereço de correspondência:

Rua Engenheiro Albert Scharle, 157/301, Luxemburgo, Belo Horizonte, Minas Gerais.
CEP: 30380-370.

RESUMO

Introdução: A imunexpressão do antígeno CD20 no linfoma de Hodgkin (LH) é variável e alguns estudos sugerem que ela pode representar uma intersecção entre a fisiopatologia do LH e o prognóstico clínico dos pacientes. Além disso, as investigações sobre o seu microambiente têm tido especial destaque nas investigações científicas da hematopatologia, vislumbrando aplicações terapêuticas.

Objetivo: Investigar a imunexpressão de CD20 e de marcadores do microambiente tumoral no LHc, visando analisar as interfaces entre esses parâmetros e os aspectos clínico-morfológicos de interesse da onco-hematopatologia.

Métodos: Estudo retrospectivo com 184 pacientes com diagnóstico anatomopatológico de LHc. Dados clínicos foram revisados a partir dos prontuários médicos. Estudo morfológico e imunofenotípico com CD20, CD30, CD15, PAX-5, CD3, CD4, CD8, CD21, CD68, CD34, CD56, CD138, PD-1 e pesquisa de EBV por IHQ (LMP-1) e hibridização *in situ* cromogênica (CISH) foram realizados. Os dados foram tabulados e valor de p foi considerado significativo quando menor que 0,05.

Resultados: O fenótipo CD20-positivo foi encontrado em 45 (25,9%) do total de 174 pacientes com material disponível. Pacientes CD20-positivos nas células neoplásicas tendem a se curar antes, particularmente aqueles com menos de 10,5 células/CGA ($p=0,037$). À morfologia, a chance de um caso ser CD20-positivo é maior quando se tem granuloma ($p=0,034$, IC 95% 1,166-50,301). Em relação ao microambiente, o tempo até a cura foi menor nos pacientes CD20-positivos, sobretudo naqueles com mais de 25% de extensão de positividade ($p=0,0183$). O tempo até a cura ($p=0,0309$) e a taxa de óbitos ($p=0,016$) foram menores nos pacientes PD-1 negativos. Dentre os pacientes com presença de plasmócitos no microambiente, aqueles com menor número tendem a se curar antes ($p=0,0374$). Maior densidade vascular está associada a menor frequência de sintomas B ($p=0,036$) e à presença de recidiva da doença ($p=0,004$).

Conclusões: Há uma associação direta da positividade para CD20 nas células neoplásicas e no micromambiente do LHc a uma melhor evolução clínica. Há também melhor prognóstico naqueles pacientes com ausência de imunexpressão de PD-1, menor número de plasmócitos e menor densidade vascular. O microambiente é, certamente, cenário para estudos cada vez mais robustos sendo que os achados desse trabalho destacam os linfócitos B não neoplásicos, os plasmócitos, os linfócitos

expressores de PD-1 e a densidade vascular, estão relacionados a marcadores de agressividade.

Palavras-chaves: Doença de Hodgkin, imunoistoquímica, antígeno CD20, microambiente tumoral, hibridização *in situ*, desfecho clínico.

ABSTRACT

Introduction: The CD20 immunoexpression in classical Hodgkin lymphoma is variable and it may represent an intersection between the pathophysiology of LH and the clinical prognosis of patients. In addition, investigations into its microenvironment have been given special importance in the hematopathology scientific investigations, for the purpose of therapeutic applications.

Objective: To investigate the CD20 immunoexpression and the tumor microenvironment markers in LHc, in order to analyze the interfaces between these parameters and the clinical-morphological aspects of interest in onco-hematopathology.

Methods: Retrospective study with 184 patients with pathological diagnosis of cHL. Clinical data were reviewed from medical records. Morphological and immunophenotypic study with CD20, CD30, CD15, PAX-5, CD3, CD4, CD8, CD21, CD68, CD34, CD56, CD138 and PD-1 were performed. EBV infection was tested by IHC (LMP-1) and in situ chromogenic hybridization (CISH). The data were tabulated and the p value less than 0.05 was considered significant.

Results: The CD20-positive phenotype was found in 45 (25,9%) of the total of 174 patients with available material. Patients with CD20 positivity on neoplastic cells tend to heal earlier, particularly those with less than 10.5 cells/CGA ($p=0.037$). On morphology, there was a greater chance of having CD20 positivity when there was granuloma ($p=0.034$, 95% CI 1.166-50.301). Regarding the microenvironment, the time to cure was shorter in CD20-positive patients, especially in those with more than 25% of positivity ($p=0.0183$). The time to cure ($p=0.0309$) and the death rate ($p=0.016$) were shorter in PD-1 negative patients. Among patients with the presence of plasma cells in the microenvironment, those with fewer numbers tend to heal earlier ($p=0.0374$). Higher vascular density is associated with lower frequency of B symptoms ($p=0.036$) and presence of disease recurrence ($p=0.004$).

Conclusions: There is a direct association of CD20 positivity in neoplastic cells and in microenvironment with a better clinical outcome. There is also a better prognosis in those patients with absence of PD-1 immunoexpression, fewer plasma cells and less vascular density. The microenvironment is certainly the setting for increasingly robust

studies and the findings of this work highlight non-neoplastic B lymphocytes, plasma cells, PD-1 lymphocytes and vascular density, related to aggressive behavior.

Keywords: *Hodgkin disease; immunohistochemistry; antigens, CD20; tumor microenvironment; in situ hybridization; patient outcome assessment.*

INTRODUÇÃO

Linfoma de Hodgkin (LH) é neoplasia linfoide maligna originada em linfócitos B do centro germinativo⁽¹⁾ e que se caracteriza por células neoplásicas denominadas células de Hodgkin-Reed-Sternberg (HRS) dispostas em exuberante fundo inflamatório. LH clássico (LHc) corresponde à 90% dos LH e apresenta os subtipos esclerose nodular (EN), celularidade mista (CM), rico em linfócitos (RL) e depleção linfocitária (DL)⁽²⁾. O diagnóstico imunofenotípico do LH é definido pela positividade principalmente para CD30, além das imunomarcações para CD15 e PAX-5.

A positividade de CD20 no LHc é relatada na literatura com percentuais que variam de 4,9 e 66,6%⁽³⁻²⁴⁾. Embora controversa, tanto quanto à presença como à extensão da imunocoloração, essa positividade pode representar uma intersecção entre a fisiopatologia do LH e o prognóstico clínico dos pacientes.

Considerando o fundo inflamatório exuberante do LH, nas últimas décadas, as investigações sobre o seu microambiente têm tido especial destaque nas investigações científicas da hematopatologia, vislumbrando aplicações terapêuticas⁽²⁵⁾.

O presente estudo investigou a imunoexpressão de CD20 e de marcadores do microambiente tumoral no LHc, visando analisar as interfaces entre esses parâmetros e os aspectos clínico-morfológicos de interesse da onco-hematopatologia.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Casuística e delineamento do estudo

Estudo analítico descritivo com 184 pacientes com diagnóstico anatomopatológico de LHc de três instituições médicas brasileiras: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB UNESP), Hospital Luxemburgo (HL-Belo Horizonte/Minas Gerais) e Hospital São Luiz/D'Or (HSL-São Paulo/São Paulo). Foram estudados os pacientes com LHc diagnosticados entre janeiro de 1998 até dezembro de 2017 no FMB UNESP, de janeiro de 2008 a dezembro de 2017 do HL e de 2018 a 2019 no HSL. Os pacientes incluídos no estudo foram selecionados a partir dos laudos anatomopatológicos e tinham blocos de parafina disponíveis para reavaliação, com condições de uso, sem que a amostra fosse comprometida. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da

FMB-UNESP (número do parecer 2.931.940), também com as devidas anuências das outras Instituições. Os 184 pacientes estavam assim subdivididos: 70 do Hospital das Clínicas-FMB UNESP, 75 do Hospital Luxemburgo e 39 do Hospital São Luiz/D'Or.

Revisão clínica

Os aspectos demográficos e clínicos foram coletados do prontuário dos pacientes, sejam físicos ou eletrônicos, sendo constituídos por: idade ao diagnóstico, sexo e etnia, presença de sintomas B, localização da cadeia linfonodal acometida ao diagnóstico, envolvimento extranodal, estadiamento Ann Arbor, tratamento com ABVD (doxorubicina, bleomicina, vimblastina e dacarbazina) e/ou radioterapia e/ou transplante de medula óssea, e dados laboratoriais como desidrogenase láctica (LDH) e velocidade de hemossedimentação (VHS) da primeira consulta do paciente. Envolvimento ou não da medula óssea, resposta ao tratamento (completa ou doença progressiva), recidiva e desfecho clínico foram coletados nas consultas posteriores. Considerou-se como desfecho desfavorável aqueles pacientes com doença progressiva, recidiva ou óbito pela doença no último registro médico.

Avaliação morfológica e imunoistoquímica

As amostras teciduais do momento do diagnóstico dos pacientes com LHC selecionados, sejam excisionais ou incisionais, foram reavaliadas pelos patologistas do estudo, na sua coloração de Hematoxilina & Eosina (H&E). A avaliação histológica incluiu classificação quanto ao subtipo histológico e análises da presença de padrão nodular, manutenção da arquitetura linfonodal, esclerose, espessamento de cápsula, granuloma, eosinofilia, plasmocitose, macrófagos de corpos tingíveis, reatividade endotelial, células de HRS e suas variantes (células mumificadas e células lacunares). As células de Reed-Sternberg foram quantificadas em sequências de 10 campos de grande aumento (CGA).

O estudo imunoistoquímico foi realizado utilizando o sistema de detecção de polímeros, em sistema automatizado, com a revelação pelo cromógeno diaminobenzidina e contra-coloração com hematoxilina. Os marcadores utilizados foram: CD20 (L26, pronto para uso, Dako), CD30 (Ber-H2, pronto para uso, Dako), CD15 (Carb-3, pronto para uso, Dako), PAX-5 (SP34, pronto para uso, Ventana), CD3 (policlonal, pronto para uso, Dako), CD4 (SP35, pronto para uso, Ventana), CD8 (SP57, pronto para uso, Ventana), CD21 (EP3093, pronto para uso, Ventana), CD68

(KP1, pronto para uso, Dako), CD34 (QBEnd/10, pronto para uso, Dako), CD56 (123C3, pronto para uso, Dako), CD138 (MI15/Sindecin, pronto para uso, Dako), PD-1 (NAT-105/CD279, pronto para uso, Ventana) e LMP-1/EBV (LMP1, pronto para uso, Dako). A pesquisa de Epstein-Barr vírus (EBV), além do recurso da imunistoquímica pelo LMP-1/EBV, também foi realizada através de hibridização *in situ* cromogênica (CISH).

A imunoexpressão do CD30 e do CD20 foram avaliadas em cortes totais dos blocos originais. Os demais marcadores foram avaliados em blocos de *tissue microarrays* (TMA), confeccionados a partir de setores representativos e selecionados das amostras totais.

Em relação ao CD20, foram realizadas as seguintes avaliações: qualitativa quanto à positividade ou negatividade, contagem das células neoplásicas positivas para CD20 no *hotspot*, contagem de células neoplásicas positivas para CD20 em 10 campos de grande aumento (10/CGA), sendo considerada positiva a presença de pelo menos uma célula neoplásica apresentando imunoexpressão do CD20. Avaliação de intensidade não foi realizada, visto que se observou que a marcação deste anticorpo foi fraca, irregular e heterogênea em todos os LHC desta casuística. Além disso, avaliou-se a positividade para CD20 nos linfócitos B do microambiente tumoral, sob graduação relativa à extensão variando de 1+ até 4+. Positividades até 24,9% foram definidas como 1+, positividades entre 25% e 49,9% foram definidas como 2+, positividades entre 50% e 74,9% foram definidas como 3+ e positividades acima de 75% foram definidas como 4+.

O CD30 foi avaliado quanto à sua positividade e quanto à presença do característico padrão *dot*. Os marcadores CD15, PAX-5, LMP-1 e EBER foram avaliados quanto a positividade e negatividade. CD3, CD4, CD8, PD-1, CD56, CD21, CD138 e CD68 foram graduados em cruzes em relação à extensão da coloração, similar à descrição para a análise do CD20 no microambiente.

Os vasos sanguíneos foram avaliados pela imunocoloração para CD34 nas células endoteliais, permitindo a determinação da densidade vascular, ou seja, contagem dos vasos sanguíneos em CGA.

Análise estatística

Todas as análises foram elaboradas usando-se o programa estatístico SPSS para Windows, versão 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), exceto as curvas de

sobrevida que foram realizadas no software estatístico R. Realizou-se análise descritiva dos dados morfológicos, imunoistoquímicos e clínicos, seguida por testes de Qui-Quadrado e Exato de Fisher para a comparação entre proporções. As concordâncias entre o teste imunoistoquímico e molecular, para os marcadores LMP-1 e EBER, foram avaliadas com os cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, além de acurácia e coeficiente Kappa, apresentados com os seus respectivos intervalos de 95% de confiança. A força da concordância determinada pelo coeficiente Kappa foi assim analisada: pobre ($<0,20$), leve (0,21 a 0,40), moderada (0,41 a 0,60), substancial (0,61 a 0,80), quase perfeita (0,81 a 1,00). O coeficiente de correlação de Pearson (r) foi utilizado na avaliação do grau de correlação entre as células neoplásicas CD20-positivas e os elementos do microambiente, considerando-se $r=1,0$ (correlação perfeita), 0,8-1,0 (correlação muito alta), 0,6-0,8 (correlação alta), 0,4-0,6 (correlação moderada), 0,2-0,4 (correlação baixa), 0-0,2 (correlação muito baixa) e $r=0$ (correlação nula). O método de Kaplan-Meier foi utilizado para estimar sobrevida dos pacientes e o teste de *log-rank* utilizado na comparação de curvas de sobrevida entre os grupos. O nível de significância (valor de p) testado foi de 0,05.

RESULTADOS

Dos 184 pacientes, 107 (58,2%) foram homens e 77 (41,8%) foram mulheres com mediana de idade de 30,3 anos (variação: 13-79 anos). A localização cervical foi a mais comum ao diagnóstico ($n=88$; 49,2%), seguida de linfonodos supraclaviculares ($n=30$; 16,3%) e axilares ($n=20$; 11,2%). Os subtipos histológicos foram: 72,7% ($n=133$) esclerose nodular, 15,3% ($n=28$) celularidade mista, 1,6% ($n=3$) rico em linfócitos, 1,6% ($n=3$) depleção linfocitária e 8,7% ($n=16$) inclassificável. Sessenta e sete por cento dos pacientes ($n=76$) apresentava sintomas B, 14,3% ($n=16$) tiveram doença *bulky* e 41,2% ($n=47$) apresentaram comprometimento extranodal (medula óssea, baço, fígado, canal medular, pulmão, intestino delgado, osso, mama, parede abdominal ou pele). A infiltração de medula óssea estava presente em 19,9% ($n=29$) dos pacientes analisados. As características demográficas, clínicas e histológicas de todos os pacientes com LHc encontram-se na Tabela Suplementar 1 (Tabela S1).

A maioria dos pacientes apresentava estadio III e IV ($n=61$; 54,5%), ao

diagnóstico. A primeira linha de tratamento foi ABVD em 92,7% (n=102) e 57 (51,8%) pacientes também receberam radioterapia e 8 pacientes transplante de medula óssea (7,3%). Desfecho desfavorável (doença progressiva ou recidiva ou óbito) foi detectado, ao final do segmento, em 33/101 (32,7%) dos casos.

Com relação à avaliação histológica, a mediana da contagem de células RS foi de 2,0 células/10CGA (0,0-22,0). O valor mediano, ainda que baixo, mostra a importância desse achado clássico com relação à evolução dos pacientes. As associações entre as amostras com células RS superior a mediana e desfecho desfavorável ($p=0,001$) e doença progressiva ($p=0,07$) tiveram destaque nas análises estatísticas.

A Tabela 1 sumariza as características clínicas e subtipos histológicos dos pacientes CD20-negativos e CD20-positivos. O fenótipo CD20-positivo foi encontrado em 45 (25,9%) e o CD20-negativo em 129 (74,1%) do total de 174 pacientes com material disponível. A tabela suplementar 2 (Tabela S2) mostra as características gerais desses pacientes. Entre os pacientes que tiveram células neoplásicas com positividade para CD20, 81,8% (n=18) tiveram resposta completa, 18,2% (n=4) doença progressiva, recidiva ocorreu em 1 paciente (4,5%) e óbito pela doença em 3 pacientes (12%) do total de casos com dados evolutivos disponíveis. As diferenças de desfecho observadas entre os pacientes com células neoplásicas positivas para CD20 e aqueles com células neoplásicas negativas para CD20 não foram estatisticamente significantes (22,7% e 37,3%, $p=0,155$, respectivamente), conforme a Tabela 1. Situação similar foi observada em relação à sobrevida global e sobrevida livre de doença entre os pacientes CD20-positivos e negativos. Até por volta de 50 meses, os pacientes CD20-positivos tendem a se curar antes. Além disso, estes pacientes tendem a ter menos óbitos do que os pacientes CD20-negativos, mas por volta de 160 meses a porcentagem de óbitos se iguala. Entretanto, essas diferenças do tempo de cura e de morte entre os dois grupos não foram estatisticamente significativas ($p=0,2722$ e $p=0,3601$) (Figura Suplementar 1).

Tabela 1. Características clínico-patológicas dos pacientes com linfoma de Hodgkin clássico CD20-positivos e CD20-negativos.

	CD20-	CD20+	Valor de $p^{\dagger}$
Sexo (n=174)			
Masculino	77/129 (59,7%)	24/45 (53,3%)	0,284
Feminino	52/129 (40,3%)	21/45 (46,7%)	
Idade (n=170)	30,5 (13-79,4)	28,6 (15-73,2)	0,613 ⁺
Localização ao diagnóstico (n=171)			
Cervical	55/128 (43%)	29/43 (67,4%)	
Supraclavicular	23/128 (18,0%)	4/43 (9,3%)	
Axilar	16/128 (12,5%)	4/43 (9,3%)	
Inguinal	9/128 (7,0%)	2/43 (4,7%)	-
Mediastinal	16/128 (12,5%)	3/43 (7,0%)	
Mediastinal (<i>bulky</i>)	7/128 (5,5%)	1/43 (2,3%)	
Retroperitoneal	1/128 (0,8%)	0/43 (0,0%)	
Canal medular	1/128 (0,8%)	0/43 (0,0%)	
Doença <i>bulky</i> (n=108)	13/83 (15,7%)	2/25 (8,0%)	0,271
Acometimento extranodal (n=110)^o	35/83 (42,2%)	10/27 (37,0%)	0,406
Acometimento de medula óssea (n=141)	21/105 (20,0%)	5/36 (13,9%)	0,292
Sintomas B (n=109)	57/84 (67,9%)	16/25 (64,0%)	0,447
Estadiamento Ann Arbour (n=108)			
I - II	35/83 (42,2%)	14/25 (56,0%)	0,273
III - IV	48/83 (57,8%)	11/25 (44,0%)	
HIV (n=110)	3/85 (3,5%)	1/25 (4,0%)	0,649
Tratamento 1ª linha (n=106)			
Sem tratamento	3/82 (3,7%)	0/24 (0,0%)	-
ABVD	74/82 (90,2%)	24/24 (100%)	
Não ABVD [*]	5/82 (6,1%)	0/24 (0,0%)	
Radioterapia (n=106)	43/82 (52,4%)	11/24 (45,8%)	0,368
Transplante de medula óssea (n=106)	8/82 (9,8%)	0/24 (0,0%)	0,118
Desfecho desfavorável (n=97)[*]	28/75 (37,3%)	5/22 (22,7%)	0,155
Subtipo histológico (n=174)			
Esclerose nodular	93 (72,1%)	34 (75,6%)	
Celularidade mista	22 (17,1%)	5 (11,1%)	0,042
Rico em linfócitos	2 (1,6%)	1 (2,2%)	
Depleção linfocitária	2 (1,6%)	0 (0,0%)	
Inclassificável	10 (7,8%)	5 (11,1%)	

[†]Teste qui-quadrado/Teste exato de Fisher (valor de $p < 0,05$).

⁺ Teste Mann-Whitney

^oMedula óssea, baço, fígado, canal medular, pulmão, intestino delgado, osso, mama, parede abdominal e pele.

^{*}BEACOPP (bleomicina, etoposídeo, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, procarbazona e prednisona), DHAP (dexametasona, cisplatina e citarabina), ICE (ifosfamida, carboplatina e etoposídeo) e GDP (gencitabina, dexametasona e cisplatina).

^{*}Doença progressiva, recidiva e óbito.

ABVD (doxorubicina, bleomicina, vimblastina e dacarbazina)

Com relação à imunomarcagem para CD20, procedemos a avaliação de três formas, duas delas em relação às células neoplásicas e uma delas relacionada ao microambiente da neoplasia, conforme Figura Suplementar 2 (Figura S2).

A avaliação das células neoplásicas conforme a marcação para CD20 foi realizada de duas formas: no seu *hotspot* e numa sequência de 10CGA. A mediana de células neoplásicas positivas para CD20 em 10CGA foi 10,5 (variação: 1-57). A distribuição do tempo de cura não é a mesma entre os pacientes com número inferior e superior à mediana ($p=0,0037$) (Figura 1A). Pacientes CD20-positivos tendem a se curar antes, particularmente aqueles com menos de 10,5 células/10CGA. Não houve diferença estatística em relação à sobrevida até o óbito entre os pacientes CD20-positivos e CD20-negativos ($p=0,231$) (Figura 1B).

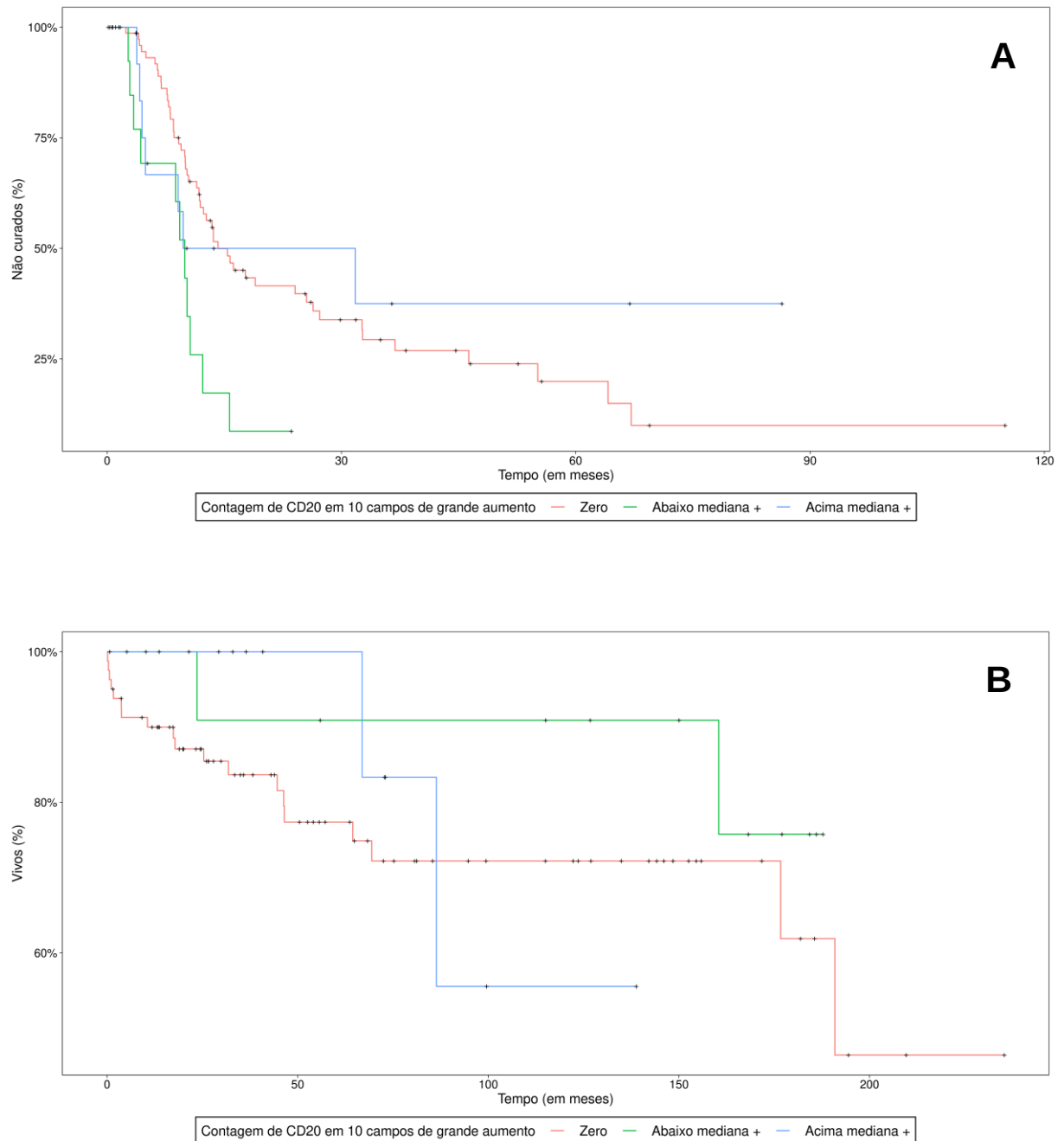


Figura 1. A, Estimador de Kaplan-Meier do tempo até a cura pela variável Contagem de células neoplásicas CD20 positivas em 10 campos de grande aumento ($p=0,0037$). **B,** Estimador de Kaplan-Meier do tempo até o óbito pela variável Contagem de células neoplásicas CD20 positivas em 10 campos de grande aumento ($p=0,231$).

Com relação ao CD20 contado no *hotspot*, pacientes CD20-positivos apresentaram melhor sobrevida global e livre de doença em relação aos pacientes CD20-negativos, porém, não houve significância estatística entre eles ($p=0,2539$ e $p=0,0903$, respectivamente) (Figura Suplementar 3).

Acerca do microambiente, 3 pacientes (1,6%) foram negativos para o CD20 nos linfócitos do fundo inflamatório e 171 (98,4) tiveram CD20 positivo dentre os pacientes com material disponível. Conforme mostrado na Figura 2, o tempo até a cura foi menor

nos casos CD20-positivos em relação aos negativos e, dentre os casos positivos, pacientes com mais de 25% de células positivas apresentam uma taxa de cura mais rápida do que os pacientes com menos de 25% de expressão ($p=0,0183$). O mesmo não foi observado em relação ao tempo até o óbito ($p=0,5281$). Além disso, pacientes positivos para CD20 no microambiente tenderam a ter menor frequência de envolvimento extranodal (59,09%, $p=0,057$), maior frequência de desidrogenase láctica maior que 475,5 (50,96%, $p=0,062$) e menos de 6 células RS/10CGA (54,02%, $p=0,06$).

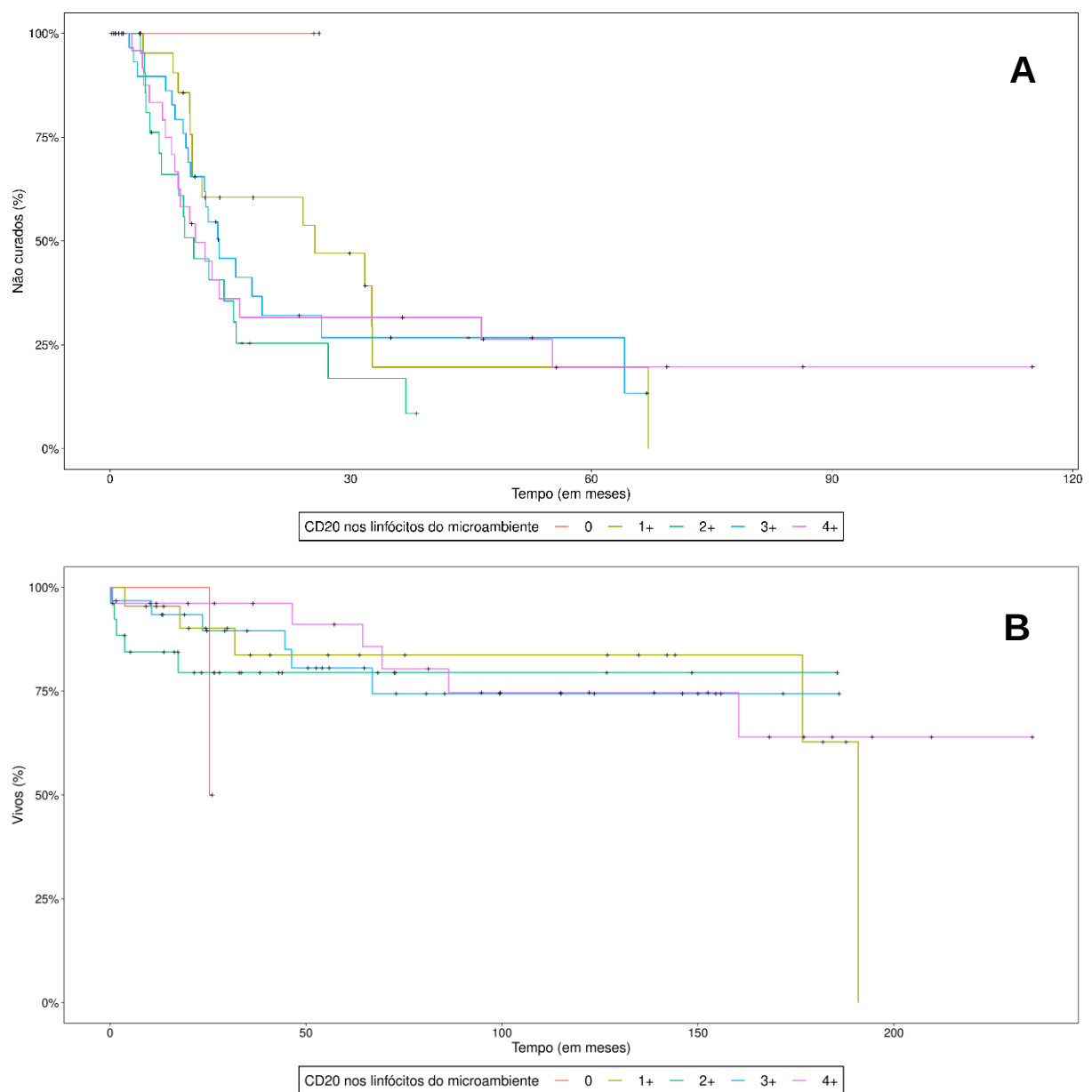


Figura 2. A, Estimador de Kaplan-Meier do tempo até a cura pela variável CD20 nos linfócitos do microambiente ($p=0,0183$). **B,** Estimador de Kaplan-Meier do tempo o óbito pela variável CD20 nos linfócitos do microambiente ($p=0,5281$).

A Tabela 2 apresenta as associações entre as características morfológicas e imunofenotípicas e os grupos definidos pela positividade para CD20, evidenciando que as diferenças não foram estatisticamente significativas. Contudo, salienta-se que, em avaliação por regressão logística binária, observou-se que a chance de um caso ser CD20-positivo é maior quando se tem granuloma à morfologia ($p=0,034$, Razão de chances=7,657, IC 95% 1,166-50,301). As demais características clínicas e patológicas não foram estatisticamente significativas por essa metodologia estatística.

Tabela 2. Características morfológicas e imunofenotípicas entre os grupos CD20-positivos e CD20-negativos.				
	CD20-	CD20+	Total	Valor de $p^{\dagger}$
Morfologia				
Manutenção da arquitetura linfonodal	16 (16,2%)	3 (8,8%)	19 (14,3%)	0,225
Padrão nodular	57 (54,8%)	21 (61,8%)	78 (56,5%)	0,306
Esclerose	75 (72,1%)	27 (79,4%)	102 (73,9%)	0,273
Espessamento capsular	71 (68,3%)	22 (64,7%)	93 (67,4%)	0,426
Granuloma	11 (10,4%)	7 (20,6%)	18 (12,9%)	0,108
Eosinofilia	83 (78,3%)	24 (70,6%)	107 (76,4%)	0,242
Plasmocitose	60 (56,6%)	20 (58,8%)	80 (57,1%)	0,491
Macrófagos de corpos tingíveis	29 (27,4%)	13 (38,2%)	42 (30,0%)	0,161
Reatividade endotelial	76 (71,7%)	26 (76,5%)	102 (72,9%)	0,380
Ectasia vascular	22 (24,2%)	8 (23,5%)	30 (24,0%)	0,571
Células neoplásicas (IHQ e CISH)				
CD30 padrão em dot	80 (75,5%)	28 (82,4%)	108 (77,1%)	0,281
CD15	50 (47,2%)	18 (52,9%)	68 (48,6%)	0,349
PAX5	70 (71,4%)	27 (79,4%)	97 (73,5%)	0,251
LMP1	28 (28,0%)	7 (20,6%)	35 (26,1%)	0,270
EBER	20 (21,1%)	6 (17,6%)	26 (20,2%)	0,440

[†]Teste qui-quadrado/Teste exato de Fisher (valor de $p < 0,05$).

Com relação aos demais marcadores do microambiente tumoral analisados, observou-se, por meio do teste de Pearson, que há correlação moderada entre o número de células neoplásicas CD20-positivas e o número de células CD3-positivas ($r=0,43$, $p < 0,001$) e CD21-positivas ($r=0,537$, $p < 0,001$), e correlação baixa em relação às células CD4, CD8 e PD1-positivas ($r=0,243$, $p=0,004$; $r=0,222$, $p=0,007$; e $r=0,280$, $p=0,001$, respectivamente). Estes dados encontram-se na Tabela 3.

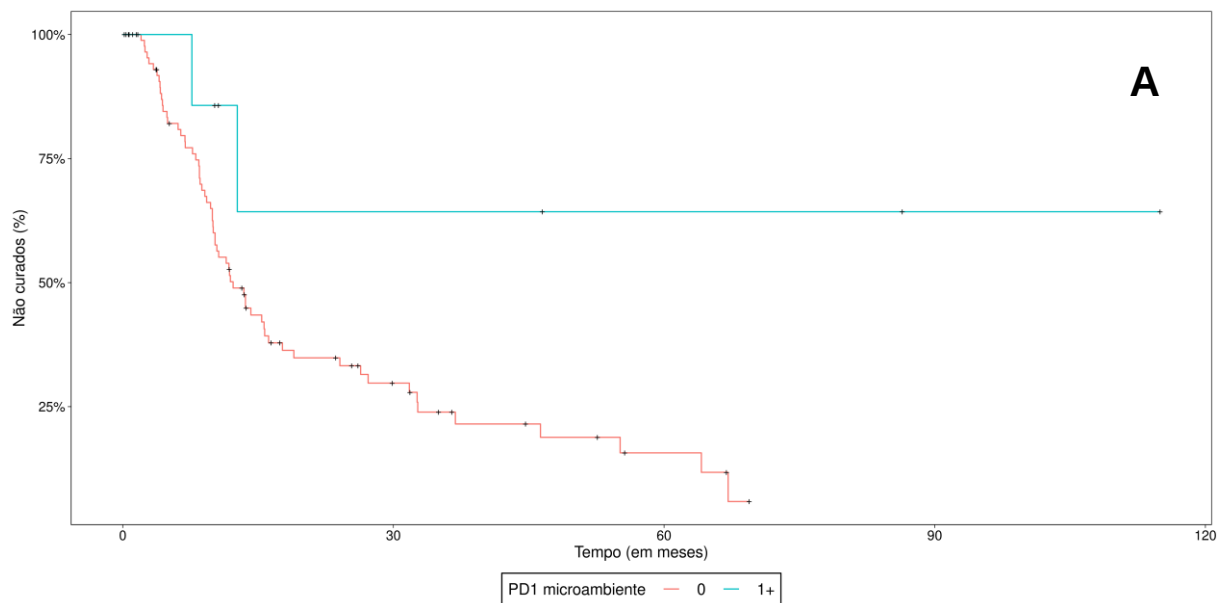
Tabela 3. Correlação entre o número de células neoplásicas CD20+ e os elementos do microambiente.		
	Coefficiente de Pearson (r)*	Valor de $p^{\dagger}$
CD3	0,430	<0,001
CD4	0,243	0,004
CD8	0,222	0,007
PD1	0,280	0,001
CD138	0,106	0,193
CD56	0,109	0,179
CD21	0,537	<0,001
CD34	0,095	0,248
CD68	0,025	0,754

* $r=1,0$ (correlação perfeita), 0,8-1,0 (correlação muito alta), 0,6-0,8 (correlação alta), 0,4-0,6 (correlação moderada), 0,2-0,4 (correlação baixa), 0-0,2 (correlação muito baixa) e $r=0$ (correlação nula).

[†]O valor de significância foi de 5% ($p < 0,05$).

Pelo teste de Mann-Whitney, observou-se que as diferenças entre as extensões de coloração de determinados marcadores eram estatisticamente significativas com relação a alguns marcadores clínico-evolutivos. Isso foi verificado com relação aos: linfócitos B e desfecho desfavorável ($p=0,045$), plasmócitos CD138-positivos e doença progressiva ($p=0,047$), plasmócitos CD138-positivos e ectasia vascular ($p=0,026$), células PD1-positivas e resposta completa ao tratamento ($p=0,021$), células PD1-positivas e óbito ($p=0,015$). Demais fatores não tiveram associações significativas.

De 154 pacientes com material disponível, 143 (92,9%) apresentaram PD-1 negativo e 11 (7,1%) PD-1 positivo, todos estes exibindo apenas 1+ ($\leq 24,9\%$). A distribuição do tempo de cura e de óbito entre esses dois grupos foi diferente ($p=0,0309$ e $p=0,0016$, respectivamente), evidenciando melhor sobrevida nos pacientes sem imunoeexpressão para o PD-1 (Figura 3).



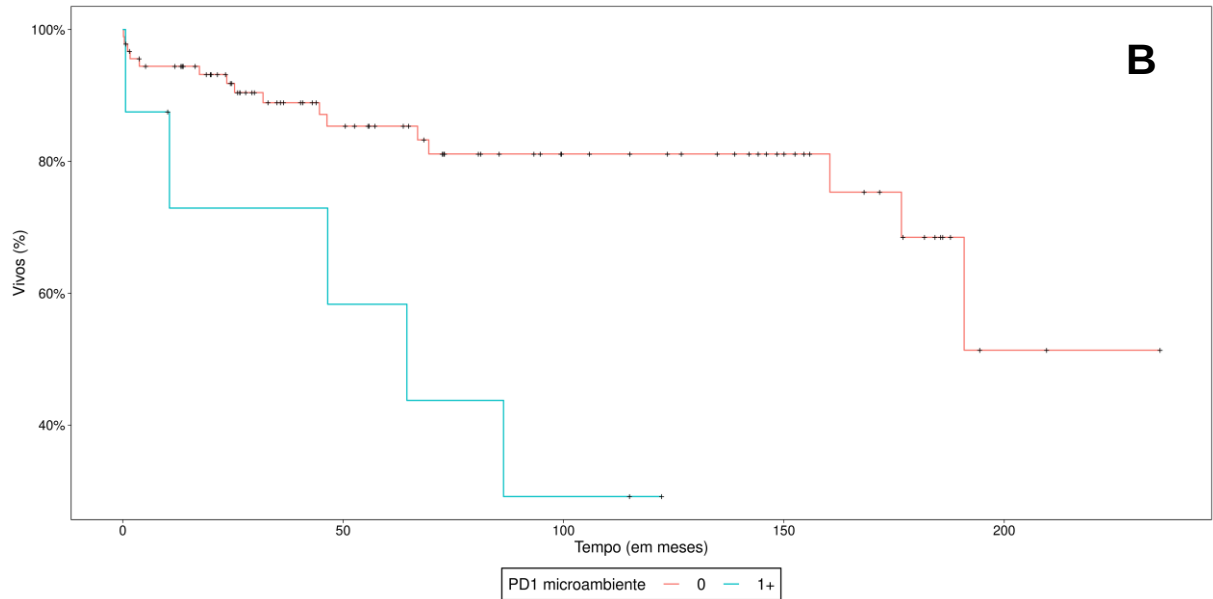
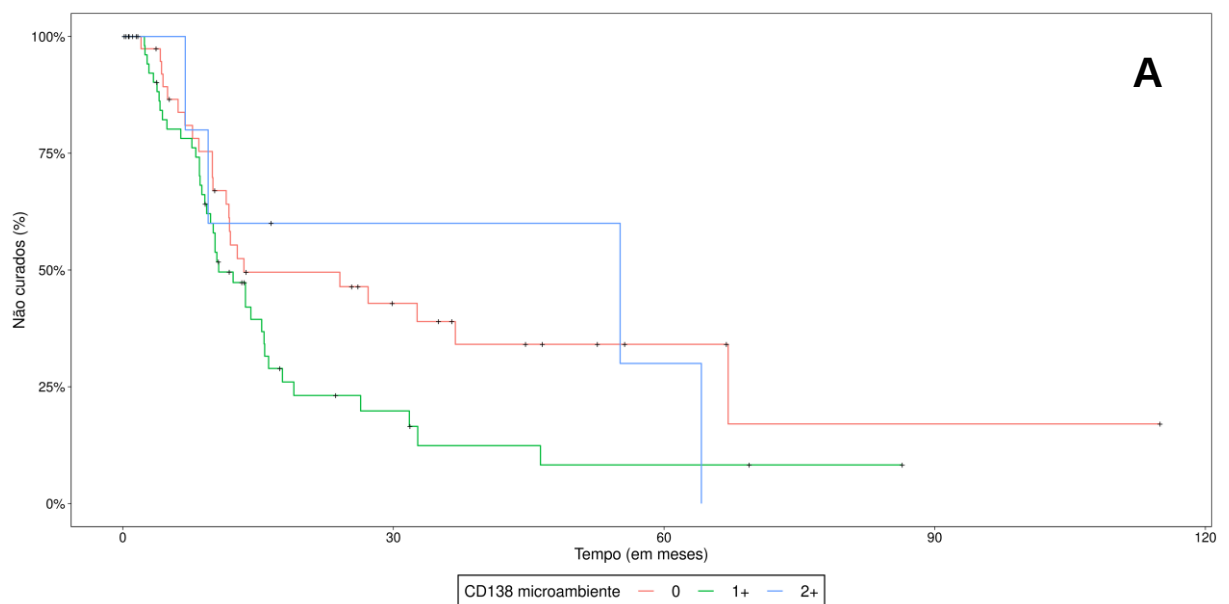


Figura 3. A, Estimador de Kaplan-Meier do tempo até a cura pela variável PD-1 ($p=0,0309$). **B,** Estimador de Kaplan-Meier do tempo o óbito pela variável PD-1($p=0,0016$).

De 157 pacientes, 70 (44,6%) foram negativos para CD138, 78 (49,7%) pacientes exibiram 1+ e 9 (5,7%) apresentaram 2+ para este marcador. Os pacientes com menor número de plasmócitos (1+) tendem a se curar antes dos pacientes com 2+ ou negativos ($p=0,0374$) (Figura 4). O mesmo não se observa em relação ao tempo de óbito ($p=0,2224$). A frequência de sintomas B foi maior nos pacientes CD138 positivos (65,7%, $p=0,046$).



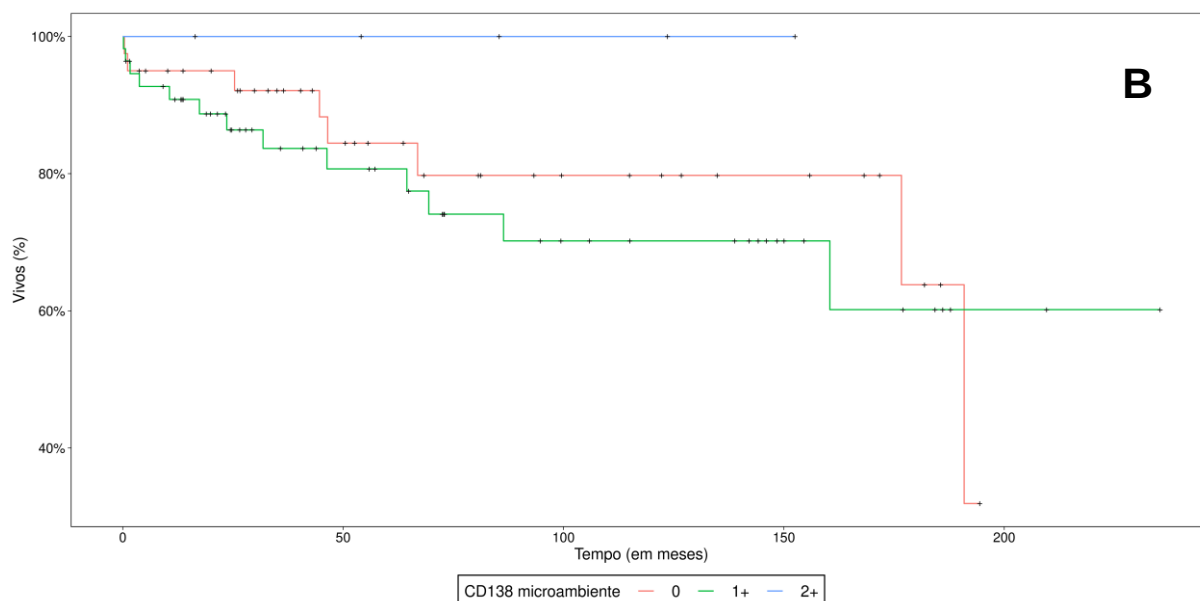


Figura 4. A, Estimador de Kaplan-Meier do tempo até a cura pela variável CD138 ($p=0,0374$). B, Estimador de Kaplan-Meier do tempo o óbito pela variável CD138 ($p=0,2224$).

A frequência de distribuição do CD4 foi a seguinte: 29 (20,3%) pacientes apresentaram 1+, 49 (34,3%) 2+, 46 (32,2%) 3+ e 19 (13,3%) 4+ de um total de 143 pacientes com material disponível. Para o CD8 a frequência foi: 55 pacientes (36,2%) com 1+, 47 (30,9%) com 2+, 37 (24,3%) com 3+ e 13 (8,6%) com 4+ de um total de 152 pacientes. Para estes dois marcadores observou-se que, até 50 meses, pacientes com maior número de linfócitos CD4-positivos tiveram melhor sobrevida ($p=0,015$), enquanto para o CD8, pacientes com 4+ tiveram uma sobrevida melhor do que pacientes com 3+ de imunoexpressão ($p=0,0385$) (Figura Suplementar 4).

Em relação ao CD68, do total de 157 pacientes, 15 (9,6%) foram negativos para este marcador, 85 (54,1%) tiveram 1+, 39 (24,8%) exibiram 2+, 15 (9,6%) 3+ e 3 (1,9%) 4+. Pacientes com maior expressão de CD68 (>50%) tiveram uma menor sobrevida ($p=0,0288$), conforme Figura Suplementar 5.

A mediana do número de vasos pela avaliação do CD34 foi de 8,0 vasos/CGA (1,0-43,0). Amostras com valores acima de 8,0 vasos/CGA estão relacionadas com recidiva da doença ($p=0,090$, teste de Mann-Whitney). Maior densidade vascular também se mostrou associada pelo teste qui-quadrado/teste exato de Fisher à menor frequência de sintomas B ($p=0,036$) e à presença de recidiva ($p=0,004$) (Tabela 4, Figura Suplementar 6).

Tabela 4. Características clínicas em relação à densidade vascular*.

	Densidade vascular		Valor de $p^{\dagger}$
	< 8 vasos/CGA	> 8 vasos/CGA	
Sintomas B	42 (63,6%)	24 (36,4%)	0,036
Recidiva	1 (11,1%)	8 (88,9%)	0,004
Doença <i>bulky</i>	11 (68,75%)	5 (31,25%)	0,41
Acometimento extranodal	21 (53,85%)	18 (46,15%)	0,837
Acometimento de medula óssea	12 (57,1%)	9 (42,9%)	1,000
Ann Arbor III e IV	29 (54,7%)	24 (45,3%)	0,839
Desfecho desfavorável*	15 (50,0%)	15 (50,0%)	0,369

*Mediana da densidade vascular.

 $\dagger$ Teste qui-quadrado/Teste exato de Fisher (valor de $p < 0,05$).

*Doença progressiva, recidiva e óbito.

A associação entre as amostras positivas para LMP-1 na imunoistoquímica com os resultados positivos para a avaliação molecular pelo CISH foi representada por 30 pacientes (93,8%), sendo estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). A avaliação da infecção pelo EBV exibe variação conforme a origem da população estudada. Os casos de LH oriundos do interior tiveram maior positividade para EBV na técnica de CISH ($n=18/28$, 64,3%) do que a população oriunda das regiões metropolitanas de Belo Horizonte e São Paulo ($n=10$; 35,7%), sendo que há uma discreta tendência a ser significativa essa diferença ($p=0,063$). Considerando-se os estados como um todo, as diferenças não foram estatisticamente significativas na nossa amostra ($p=0,217$). Em 30 casos (93,8%) observou-se concordância substancial entre os métodos ($\kappa=0,77$). Comparando-se o LMP-1 com EBER, tendo este como padrão-ouro, a sensibilidade foi de 93,8%, a especificidade de 91,3%, o valor preditivo positivo de 20,3%, o valor preditivo negativo de 98,3% e uma acurácia de 91,8% (Tabela 5).

Tabela 5. Poder diagnóstico do LMP1 na detecção da infecção pelo EBV, utilizando o EBER (CISH) como padrão-ouro.

Sensibilidade (%)	93,8%
Especificidade (%)	91,3%
Valor preditivo positivo (%)	20,3%
Valor preditivo negativo (%)	98,3%
Acurácia (%)	91,8%
Índice kappa (%)*	0,77
Valor de $p^{\dagger}$	<0,001

*Coeficiente de concordância Kappa (κ): <0,00 (ausência de concordância), 0,00-0,20 (concordância pobre), 0,21-0,40 (concordância leve), 0,41-0,60 (concordância moderada), 0,61-0,80 (concordância substancial) e 0,80-1,00 (concordância quase perfeita). $\dagger$ O nível de significância foi de 5% (valor de $p < 0,05$).

DISCUSSÃO

A predição do prognóstico dos pacientes é algo importante na prática clínica e cada vez mais cobrado no laudo anatomopatológico. A utilização de imunomarcadores, como o CD20, sua frequência e relação com o desfecho clínico

têm sido alvo de pesquisa nas últimas décadas. Embora controverso, a maioria dos estudos sobre a imunoexpressão do CD20 mostraram que este marcador não afeta o prognóstico dos pacientes^(5, 6, 9-14, 18, 22, 23). Apenas dois estudos tiveram associação com bom prognóstico. Um deles foi de Tzankov et al. (2003)⁽¹⁵⁾, com 119 pacientes com LHC seguidos por 12 anos utilizando um ponto de corte de 10% de positividade para o CD20. Segundo esses autores, o imunofenótipo CD30+/CD15±/CD20+ está associado com um desfecho clínico favorável. Demonstraram, também, que o CD20 é um fator prognóstico positivo independente ($p=0,035$) e que a sobrevida livre de doença foi mais alta nos pacientes CD20+ (286 meses versus 202 meses; $p=0,022$). Canioni et al. (2009)⁽²¹⁾ observou uma frequência menor de CD20+ nos casos refratários ou com recidiva precoce. O presente estudo demonstrou que pacientes CD20-positivos tem um melhor prognóstico sendo aqueles com menos de 10,5 células HRS/10CGA ($p=0,00037$) os mais favorecidos. O presente estudo, contudo, focou em uma avaliação numérica e quantitativa em número absoluto, método mais aplicável na prática do patologista, diferentemente de outros autores que buscaram comparações percentuais estimadas.

Em relação à morfologia, a chance de um caso ser CD20-positivo é sete vezes maior quando se tem granuloma. O granuloma pode refletir uma resposta tecidual local do hospedeiro ao tumor, e sua presença em relação ao prognóstico é contraditória na literatura, demonstrando ora prognóstico desfavorável⁽³⁰⁾ ora favorável⁽³¹⁻³³⁾. Estudo prévio do grupo⁽³⁴⁾ evidenciou que histiocitose aliada formação de granulomas está associada a infiltração por células HRS na medula óssea e reforçou que sua presença pode ser um complicador diagnóstico devido ao seu diferencial com processos infecciosos e sarcoidose. Ao contrário do presente estudo, casos descritos na literatura^(35,36) de LHC associado a granulomas exibiam negatividade para CD20. Mais estudos demonstrando esta relação e sua implicação prognóstica são necessários.

Quando se correlacionou o CD20 nas células neoplásicas com o microambiente pelo teste de Pearson observou-se uma correlação positiva entre ele e os marcadores CD3, CD4, CD8, CD21 e PD-1, evidenciando que quanto maior a positividade do CD20 maior a chance destes marcadores estarem positivos também.

Há poucos estudos⁽³⁷⁻⁴²⁾ sobre o papel das células B não-neoplásicas na patogênese do LHC e na resposta à terapia. Todos evidenciam através da IHQ ou de expressão gênica que as células CD20-positivas têm um papel prognóstico favorável

no LHc. Para Greaves et al. (2013)⁽³⁷⁾ e Tudor et al. (2013)⁽⁴¹⁾, há correlação significativa entre alto número de células CD20-positivas e uma melhor sobrevida, assim como para Jachimowicz et al. (2020)⁽⁴²⁾ que evidenciaram que baixa contagem de células B está associada a significativa redução da sobrevida livre de progressão e da sobrevida global. O presente estudo mostrou que uma menor positividade de células CD20 no microambiente (1+) está relacionada a um maior tempo até a cura. Uma explicação para o melhor prognóstico dos pacientes com maior quantidade de células B no fundo inflamatório seria o fato de estas células competirem com as células HRS por sinais de sobrevivência como o ligante CD40 (CD40L) derivados das células T⁽³⁷⁾.

No presente estudo, também foi evidenciado que a presença de plasmócitos CD138-positivos está relacionado a maior taxa de cura quando comparada a ausência de plasmócitos ou a um número maior deles no microambiente. No LHc, os plasmócitos podem ser atraídos pela CCL28 e as citocinas IL-6 e IL-21 podem ter um papel na diferenciação destas células. Tanto o CCL28 quanto as citocinas são produzidas pelas células HRS⁽⁴³⁾. Ao contrário da presente casuística, o único estudo na literatura evidenciou que um elevado número de plasmócitos está associado a estadiamento avançado e sobrevida inferior nos pacientes com LHc⁽⁴⁴⁾. Associação com sintomas B foi demonstrada em ambos os estudos.

O número aumentado de macrófagos CD68+ e/ou CD163+ já é bem estabelecido na literatura como um preditor de desfecho adverso em pacientes^(45,46), e o presente estudo corrobora estes achados.

A expressão de PD-L1 é observada em grande parte das células HRS em aproximadamente quase todos os casos de LHc⁽⁴⁷⁾. Um mecanismo de evasão imune envolve a sinalização entre o PD-L1 expresso em altos níveis nas células HRS e seu receptor (PD-1) expresso nos linfócitos T CD4+ e CD8+, suprimindo a função efetora das células T e, conseqüentemente, desativando a função antitumoral destas células. As células HRS também induzem a expressão de PD-L1 nos macrófagos, fomentando ainda mais o ambiente imunossupressor⁽⁴⁸⁾. Hollander et al. (2017)⁽⁴⁹⁾ evidenciaram que altas proporções tanto de PD-1 quanto de PD-L1 pela imunoistoquímica (IHQ) nos leucócitos do microambiente estão associadas a menor sobrevida livre de doença e sobrevida global. Muenst et al. (2009)⁽⁵⁰⁾ também mostraram que maior número de linfócitos PD-1-positivos é um marcador prognóstico negativo para sobrevida global nos pacientes com LHc. A presença de linfócitos PD-1-positivos no presente estudo

também se associa menor taxa de curados e a menor sobrevida.

A extensão de marcação do CD4 e CD8 também influenciou a sobrevida dos pacientes. Porém, houve uma discrepância entre pacientes com 3+ e 4+, o que pode ser explicado pela amostragem, por interferência dos casos censurados ou por provável valor crítico desses marcadores serem baixos e o sistema de cruzes não efetivo para avaliação.

Angiogênese é a marca do crescimento e progressão tumoral em neoplasias sólidas e hematológicas e pode fornecer informação prognóstica no LHc. Na casuística aqui apresentada, observou-se que uma maior densidade vascular (>8 vasos/CGA) está relacionada à menor frequência de sintomas B e à presença de recidiva. Korkolopoulou et al. (2005)⁽⁵¹⁾ investigou a angiogênese em pacientes com LH também utilizando a imunoexpressão pelo CD34 e observou que a sobrevida global foi adversamente afetada pela densidade vascular e que esta diminuiu com o estadiamento. Glimelius et al. (2005)⁽⁵²⁾, através da imunoexpressão pelo CD31, também evidenciou os mesmos resultados, mostrando que pacientes com maior contagem de vasos exibiam uma pior sobrevida livre de doença.

A presente casuística foi estudada quanto à imunoexpressão de CD20 em células neoplásicas e quanto às imunoexpressões de marcadores do microambiente tumoral, em pacientes portadores de LHc. Há uma associação direta da positividade para CD20 nas células neoplásicas de LHc a uma melhor evolução clínica desses pacientes, contrariamente ao que relata a maior parte da literatura especializada. O estudo apresentado aqui também encontrou melhor prognóstico naqueles pacientes com maior quantidade de linfócitos B no fundo inflamatório, ausência de imunoexpressão de PD-1, menor número de plasmócitos e menor densidade vascular. O microambiente é, certamente, cenário para estudos cada vez mais robustos sendo que os achados desse trabalho destacam os linfócitos B não neoplásicos, os plasmócitos, os linfócitos expressores de PD-1 e a densidade vascular, estão relacionados a marcadores de agressividade.

Aprovação pelo comitê de ética

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética sob número 2.931.940 em 02 de outubro de 2018.

Agradecimentos

Ao departamento de Patologia da FMB-UNESP, ao Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Luxemburgo e do Hospital São Luiz/D'Or e ao Andrey, acadêmico de Medicina da FMB-UNESP.

Financiamento

O presente trabalho não teve como fonte de financiamento.

Disponibilidade dos materiais de suporte

Os dados presentes no atual estudo estão dispostos no artigo. Na eventual necessidade de dados brutos, deve-se proceder ao contato direto com os autores.

Conflito de interesses

Os autores declaram ausência de conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Küppers R. Reed–Sternberg Cells. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*: Elsevier; 2013. p. 113-5.
2. Swerdlow S, Campo E, Harris NL, Jaffe E, Pileri S, Stein H, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (Revised 4th edition). IARC: Lyon. 2017;421.
3. Schmid C, Pan L, Diss T, Isaacson P. Expression of B-cell antigens by Hodgkin's and Reed-Sternberg cells. *The American journal of pathology*. 1991;139(4):701.
4. Zukerberg LR, Collins AB, Ferry JA, Harris NL. Coexpression of CD15 and CD20 by Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *The American journal of pathology*. 1991;139(3):475.
5. Enblad G, Sundstrom C, Glimelius B. Immunohistochemical characteristics of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in relation to age and clinical outcome. *Histopathology*. 1993;22(6):535-41.
6. Molot RJ, Mendenhall NP, Barré DM, Braylan RC. The clinical relevance of L26, a B-cell-specific antibody, in Hodgkin's disease. *American journal of clinical oncology*. 1994;17(3):185-8.
7. Korkolopoulou P, Cordell J, Jones M, Kaklamanis L, Tsenga A, Gatter K, et al. The expression of the B-cell marker mb-1 (CD79a) in Hodgkin's disease. *Histopathology*. 1994;24(6):511-5.
8. Isaacson P, Ashton-Key M. Phenotype of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *The Lancet*. 1996;347(8999):481.
9. Von Wasielewski R, Mengel M, Fischer R, Hansmann M-L, Hübner K, Franklin J, et al. Classical Hodgkin's disease. Clinical impact of the immunophenotype. *The American journal of pathology*. 1997;151(4):1123.
10. Lauritzen AF, Møller PH, Nedergaard T, Guldberg P, Hou-Jensen K, Ralfkiaer E. Apoptosis-related genes and proteins in Hodgkin's disease. *Apmis*. 1999;107(7-12):636-44.
11. Watanabe K, Yamashita Y, Nakayama A, Hasegawa Y, Kojima H, Nagasawa T, et al. Varied B-cell immunophenotypes of Hodgkin/Reed-Sternberg cells in classic Hodgkin's disease. *Histopathology*. 2000;36(4):353-61.
12. Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Viviani S, Bonfante V, Nadali G-P, Vassilakopoulos TP, et al. CD20 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease: associations with presenting features and clinical outcome. *Journal of Clinical Oncology*. 2002;20(5):1278-87.
13. Vassallo J, Metze K, Traina F, de Souza CA, Lorand-Metze I. Further remarks on the expression of CD20 in classical Hodgkin's lymphomas. *Haematologica*. 2002;87(3):ELT17.
14. Tzankov A, Zimpfer A, Pehrs A-C, Lugli A, Went P, Maurer R, et al. Expression of B-cell markers in classical Hodgkin lymphoma: a tissue microarray analysis of 330 cases. *Modern Pathology*. 2003;16(11):1141-7.
15. Tzankov A, Krugmann J, Fend F, Fischhofer M, Greil R, Dirnhofer S. Prognostic significance of CD20 expression in classical Hodgkin lymphoma: a clinicopathological study of 119 cases. *Clinical cancer research*. 2003;9(4):1381-6.
16. Portlock CS, Donnelly GB, Qin J, Straus D, Yahalom J, Zelenetz A, et al. Adverse prognostic significance of CD20 positive Reed–Sternberg cells in classical Hodgkin's disease. *British journal of haematology*. 2004;125(6):701-8.

17. Aldred V, Vassallo J, Froes M. Campos AHJ, Augusto Soares F. CD20 expression by Hodgkin–Reed–Sternberg cells in classical Hodgkin lymphoma is related to reduced overall survival in young adult patients. *Leukemia & lymphoma*. 2008;49(11):2198-202.
18. Fu XH, Wang SS, Huang Y, Xiao J, Zhai LZ, Xia ZJ, et al. Prognostic significance of CD20 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's Lymphoma. *Ai zheng= Aizheng= Chinese journal of cancer*. 2008;27(11):1197-203.
19. Barakzai MA, Ahmed S. CD20 positivity in classical hodgkin's lymphoma: diagnostic challenge or targeting opportunity. *Indian journal of pathology & microbiology*. 2009;52(1):6.
20. Giesta RP, Rocha Filho FD, Ferreira FVdA, Quixadá ATdS, Heukelbach J, Giesta MdAG. Influence of CD 20 antigen expression in the refractoriness of classical Hodgkin lymphoma in the first line treatment with ABVD protocol in Ceará state, Brazil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2009;45(3):247-52.
21. Canioni D, Deau-Fischer B, Taupin P, Ribrag V, Delarue R, Bosq J, et al. Prognostic significance of new immunohistochemical markers in refractory classical Hodgkin lymphoma: a study of 59 cases. *PloS one*. 2009;4(7):e6341.
22. Elsayed AA, Asano N, Ohshima K, Izutsu K, Kinoshita T, Nakamura S. Prognostic significance of CD 20 expression and E pstein-B arr virus (EBV) association in classical H odgkin lymphoma in J apan: A clinicopathologic study. *Pathology International*. 2014;64(7):336-45.
23. Benharroch D, Nalbandyan K, Lazarev I. CD20 over-expression in Hodgkin-Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma: the neglected quest. *Journal of Cancer*. 2015;6(11):1155.
24. Mohammadi SA, Mehrjerdi AZ, Basi A. The value of B-cell lymphoma 2 and CD20 markers for predicting response to treatment and disease recurrence in patients suffering Hodgkin's disease. *Journal of Preventive Epidemiology*. 2018;3(2):e20-e.
25. Kumar D, Xu ML. Microenvironment cell contribution to lymphoma immunity. *Frontiers in Oncology*. 2018;8:288.
26. Cirillo M, Reinke S, Klapper W, Borchmann S. The translational science of hodgkin lymphoma. *British journal of haematology*. 2019;184(1):30-44.
27. Liu WR, Shipp MA. Signaling pathways and immune evasion mechanisms in classical Hodgkin lymphoma. *Hematology 2014, the American Society of Hematology Education Program Book*. 2017;2017(1):310-6.
28. Schnitter A, Kohler CW, Reddemann K, Reinke S, Thorns C, Fend F, et al. Therapeutic targets and microenvironment in sequential biopsies of classical Hodgkin lymphoma at diagnosis and relapse. *Journal of Hematopathology*. 2019;12(1):11-7.
29. Venkataraman G, Mirza MK, Eichenauer DA, Diehl V. Current status of prognostication in classical Hodgkin lymphoma. *British journal of haematology*. 2014;165(3):287-99.
30. Hou W, Wei P, Xie J, Zheng Y, Zhou X. Classical Hodgkin lymphoma with necrotic granuloma-like morphological features. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2018;11(9):9593-602.
31. Pak HY, Friedman NB. Pseudosarcoid granulomas in Hodgkin's disease. *Human pathology*. 1981;12(9):832-7.
32. O'Connell MJ, Schimpff SC, Kirschner RH, Abt AB, Wiernik PH. Epithelioid

- granulomas in Hodgkin disease: A favorable prognostic sign? *Jama*. 1975;233(8):886-9.
33. Sacks EL, Donaldson SS, Gordon J, Dorfman RF. Epithelioid granulomas associated with Hodgkin's disease. Clinical correlations in 55 previously untreated patients. *Cancer*. 1978;41(2):562-7.
 34. Macedo RT. Medula óssea no linfoma de Hodgkin: a imunoistoquímica amplia o diagnóstico de infiltração neoplásica? Botucatu: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"; 2019.
 35. Al-Maghrabi JA, Sawan AS, Kanaan HD. Hodgkin's lymphoma with exuberant granulomatous reaction. *Saudi medical journal*. 2006;27(12):1905.
 36. Du J, Zhang Y, Liu D, Zhu G, Zhang Q. Hodgkin's lymphoma with marked granulomatous reaction: a diagnostic pitfall. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2019;12(7):2772.
 37. Greaves P, Clear A, Coutinho R, Wilson A, Matthews J, Owen A, et al. Expression of FOXP3, CD68, and CD20 at diagnosis in the microenvironment of classical Hodgkin lymphoma is predictive of outcome. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(2):256.
 38. Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2010;362(10):875-85.
 39. Chetaille B, Bertucci F, Finetti P, Esterni B, Stamatoullas A, Picquenot JM, et al. Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2009;113(12):2765-3775.
 40. Panico L, Tenneriello V, Ronconi F, Lepore M, Cantore N, Dell'Angelo AC, et al. High CD20+ background cells predict a favorable outcome in classical Hodgkin lymphoma and antagonize CD68+ macrophages. *Leukemia & lymphoma*. 2015;56(6):1636-42.
 41. Tudor CS, Distel LV, Eckhardt J, Hartmann A, Niedobitek G, Buettner M. B cells in classical Hodgkin lymphoma are important actors rather than bystanders in the local immune reaction. *Human Pathology*. 2013;44(11):2475-86.
 42. Jachimowicz RD, Pieper L, Reinke S, Gontarewicz A, Plütschow A, Haverkamp H, et al. Analysis of the tumor microenvironment by whole-slide image analysis identifies low B cell content as a predictor of adverse outcome in advanced-stage classical Hodgkin lymphoma treated with BEACOPP. *Haematologica*. 2020.
 43. Visser L. Plasma cells in classical Hodgkin lymphoma: a new player in the microenvironment? *British journal of haematology*. 2019;184(2):119.
 44. Gholiha AR, Hollander P, Hedstrom G, Sundstrom C, Molin D, Smedby KE, et al. High tumour plasma cell infiltration reflects an important microenvironmental component in classic Hodgkin lymphoma linked to presence of B-symptoms. *British journal of haematology*. 2019;184(2):192-201.
 45. Guo B, Cen H, Tan X, Ke Q. Meta-analysis of the prognostic and clinical value of tumor-associated macrophages in adult classical Hodgkin lymphoma. *BMC medicine*. 2016;14(1):159.
 46. Jiang T, Cheng X, Jia Y. Prognostic value of tumor-associated macrophages in classic Hodgkin's lymphoma: systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2016;9(6):10784-92.
 47. Carbone A, Gloghini A, Pruneri G, Dolcetti R. Optimizing checkpoint inhibitors

- therapy for relapsed or progressive classic Hodgkin lymphoma by multiplex immunohistochemistry of the tumor microenvironment. *Cancer medicine*. 2019;8(6):3012-6.
48. Carey CD, Gusenleitner D, Lipschitz M, Roemer MG, Stack EC, Gjini E, et al. Topological analysis reveals a PD-L1-associated microenvironmental niche for Reed-Sternberg cells in Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2017;130(22):2420-30.
 49. Hollander P, Kamper P, Smedby KE, Enblad G, Ludvigsen M, Mortensen J, et al. High proportions of PD-1+ and PD-L1+ leukocytes in classical Hodgkin lymphoma microenvironment are associated with inferior outcome. *Blood advances*. 2017;1(18):1427-39.
 50. Muenst S, Hoeller S, Dirnhofer S, Tzankov A. Increased programmed death-1+ tumor-infiltrating lymphocytes in classical Hodgkin lymphoma substantiate reduced overall survival. *Human pathology*. 2009;40(12):1715-22.
 51. Korkolopoulou P, Thymara I, Kavantzias N, Vassilakopoulos T, Angelopoulou M, Kokoris S, et al. Angiogenesis in Hodgkin's lymphoma: a morphometric approach in 286 patients with prognostic implications. *Leukemia*. 2005;19(6):894-900.
 52. Glimelius I, Edström A, Fischer M, Nilsson G, Sundström C, Molin D, et al. Angiogenesis and mast cells in Hodgkin lymphoma. *Leukemia*. 2005;19(12):2360-2.

TABELAS SUPLEMENTARES

Tabela S1. Características gerais dos pacientes com LHc.	
	Total
Sexo	184
Feminino	77 (41,8%)
Masculino	107 (58,2%)
Idade	30,3 (13-79,4)
Localização ao diagnóstico	179
Cervical	88 (49,2%)
Supraclavicular	30 (16,3%)
Axilar	20 (11,2%)
Inguinal	12 (6,7%)
Mediastinal	19 (10,3%)
Mediastinal (<i>bulky</i>)	8 (4,3%)
Retroperitoneal	1 (0,5%)
Canal medular	1 (0,5%)
Doença bulky	112
Não	96 (85,7%)
Sim	16 (14,3%)
Acometimento extranodal^o	114
Não	67 (58,8%)
Sim	47 (41,2%)
Acometimento de medula óssea	146
Não	117 (80,1%)
Sim	29 (19,9%)
Sintomas B	113
Não	37 (32,7%)
Sim	76 (67,3%)
Estadiamento Ann Arbour	112
I	10 (8,9%)
II	41 (36,6%)
III	22 (19,6%)
IV	39 (34,8%)
HIV	114
Não	109 (95,6%)
Sim	5 (4,4%)
Tratamento 1ª linha	110
Sem tratamento	3 (2,7%)
ABVD	102 (92,7%)
Não ABVD [†]	5 (2,7%)
Radioterapia	110
Não	53 (48,2%)
Sim	57 (51,8%)
Transplante de medula óssea	110
Não	102 (92,7%)
Sim	8 (7,3%)
Resposta ao tratamento	102
Resposta completa	80 (78,4%)
Doença progressiva	22 (21,6%)
Desfecho desfavorável*	101
Não	68 (67,3%)
Sim	33 (32,7%)
Subtipo histológico	183
Esclerose nodular	133 (72,7%)
Celularidade mista	28 (15,3%)
Rico em linfócitos	3 (1,6%)
Depleção linfocitária	3 (1,6%)
Inclassificável	16 (8,7%)

[†]Teste qui-quadrado/Teste exato de Fisher (valor de $p < 0,05$).

^oMedula óssea, baço, fígado, canal medular, pulmão, intestino delgado, osso, mama, parede abdominal e pele.

[†]BEACOPP (bleomicina, etoposídeo, doxorrubicina, ciclofosfamida, vincristina, procarbazona e prednisona), DHAP (dexametazona, cisplatina e citarabina), ICE (ifosfamida, carboplatina e etoposídeo) e GDP (gencitabina, dexametazona e cisplatina).

*Doença progressiva, recidiva e óbito.

ABVD (doxorrubicina, bleomicina, vinblastina e dacarbazona)

Tabela S2. Características gerais dos pacientes com LHc CD20- e CD20+.

	Total
Sexo	174
Feminino	73 (42,0%)
Masculino	101 (58,0%)
Idade	30,3 (13-79,4)
Localização ao diagnóstico (n=171)	171
Cervical	84 (49,1%)
Supraclavicular	27 (15,8%)
Axilar	20 (11,7%)
Inguinal	11 (6,4%)
Mediastinal	19 (11,1%)
Mediastinal (<i>bulky</i>)	8 (4,7%)
Retroperitoneal	1 (0,6%)
Canal medular	1 (0,6%)
Doença bulky	108
Não	93 (86,1%)
Sim	15 (13,9%)
Acometimento extranodal^o	110
Não	65 (59,1%)
Sim	45 (40,9%)
Acometimento de medula óssea	141
Não	115 (81,6%)
Sim	26 (18,4%)
Sintomas B (n=109)	109
Não	36 (33,0%)
Sim	73 (67,0%)
Estadiamento Ann Arbour	108
I	10 (9,3%)
II	39 (36,1%)
III	22 (20,4%)
IV	37 (34,3%)
HIV	110
Não	106 (96,4%)
Sim	4 (3,6%)
Tratamento 1ª linha	106
Sem tratamento	3 (2,8%)
ABVD	98 (92,5%)
Não ABVD [♦]	5 (4,7%)
Radioterapia	106
Não	52 (49,1%)
Sim	54 (50,9%)
Transplante de medula óssea	106
Não	98 (92,5%)
Sim	8 (7,5%)
Resposta ao tratamento	98
Resposta completa	76 (77,6%)
Doença progressiva	22 (22,4%)
Desfecho desfavorável*	97
Não	64 (66,0%)
Sim	33 (34,0%)
Subtipo histológico	174
Esclerose nodular	127 (73,0%)
Celularidade mista	27 (15,5%)
Rico em linfócitos	3 (1,7%)
Depleção linfocitária	2 (1,1%)
Inclassificável	15 (8,6%)

[†]Teste qui-quadrado/Teste exato de Fisher (valor de $p < 0,05$).

^oMedula óssea, baço, fígado, canal medular, pulmão, intestino delgado, osso, mama, parede abdominal e pele.

[♦]BEACOPP (bleomicina, etoposídeo, doxorrubicina, ciclofosfamida, vincristina, procarbazona e prednisona), DHAP (dexametasona, cisplatina e citarabina), ICE (ifosfamida, carboplatina e etoposídeo) e GDP (gencitabina, dexametasona e cisplatina).

*Doença progressiva, recidiva e óbito.

ABVD (doxorrubicina, bleomicina, vimblastina e dacarbazona)

FIGURAS SUPLEMENTARES

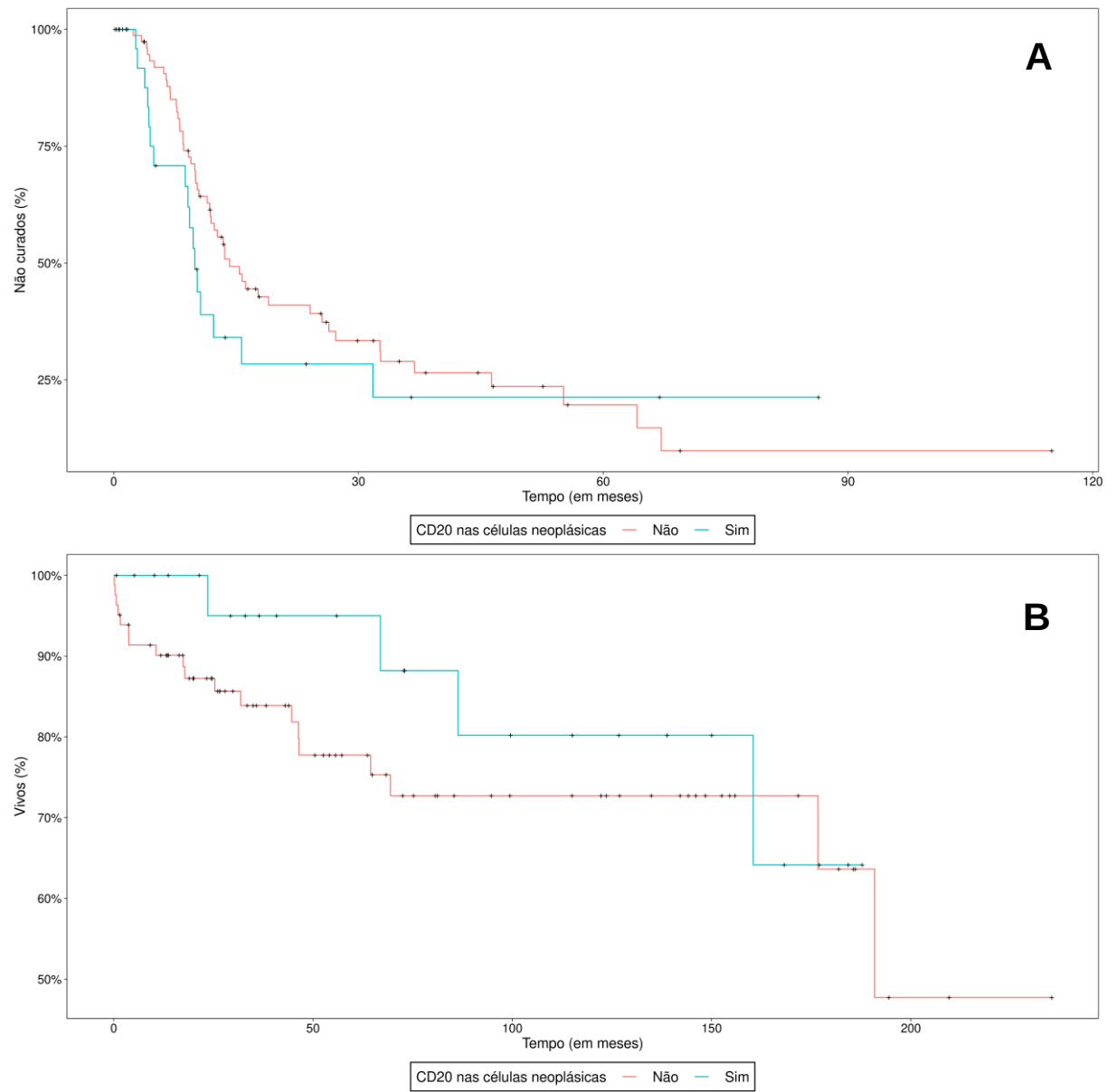


Figura S1. A, Estimador de Kaplan-Meier do tempo até a cura pela variável CD20 nas células neoplásicas ($p=0.2722$). **B,** Estimador de Kaplan-Meier do tempo até o óbito pela variável CD20 nas células neoplásicas ($p=0.3601$).

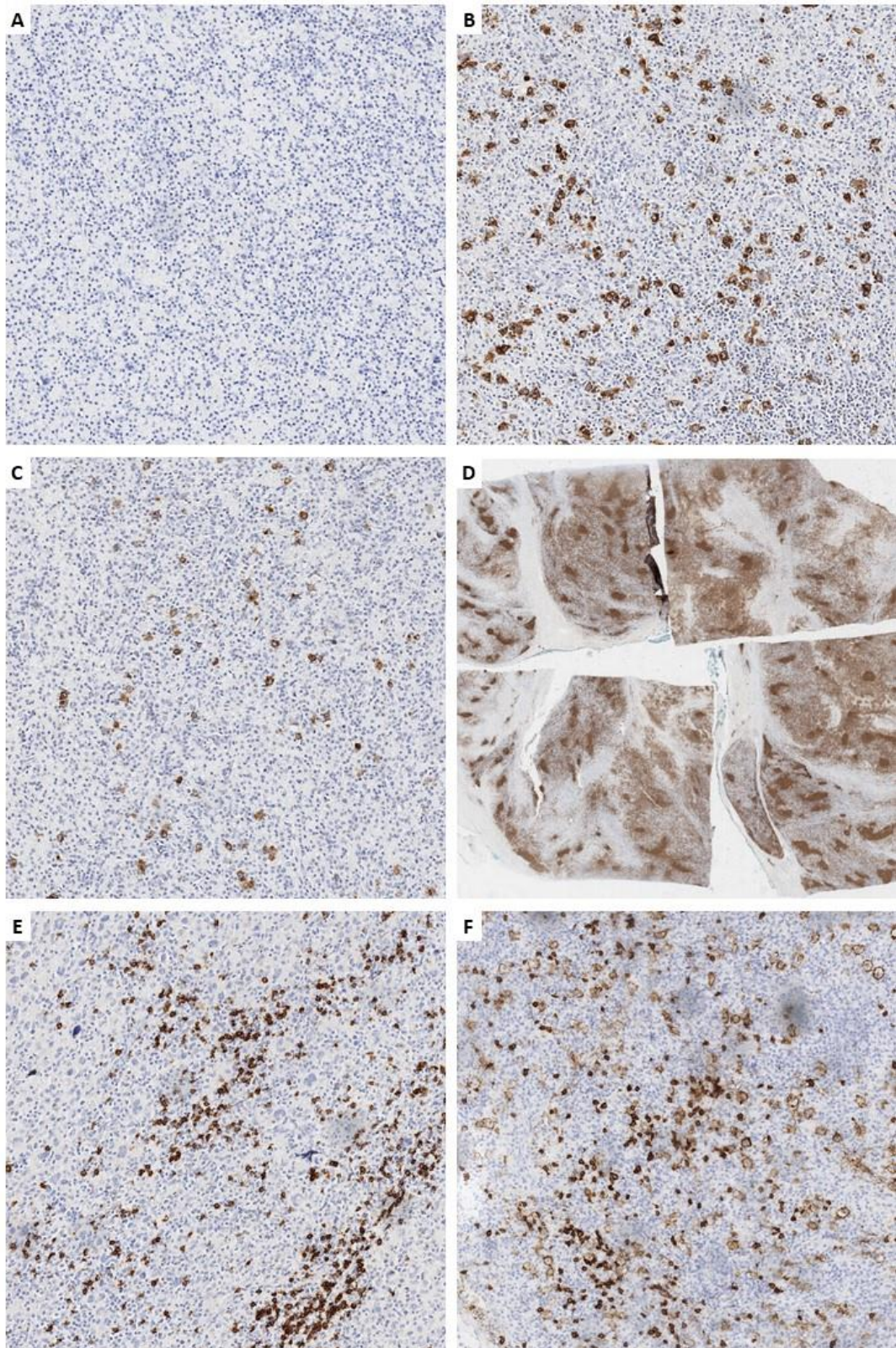


Figura S2. Imunoexpressão do CD20 nas células neoplásicas e no microambiente. A) CD20-negativo nas células neoplásicas e no microambiente (200x); B) CD20-positivo nas células neoplásicas (200x); C) CD20-positivo (1+) no microambiente. D) CD-20-positivo (4+) no microambiente (20x); E) CD20-positivo no microambiente e negativo nas células neoplásicas (200x); F) CD20-positivo no microambiente e nas células neoplásicas (200x).

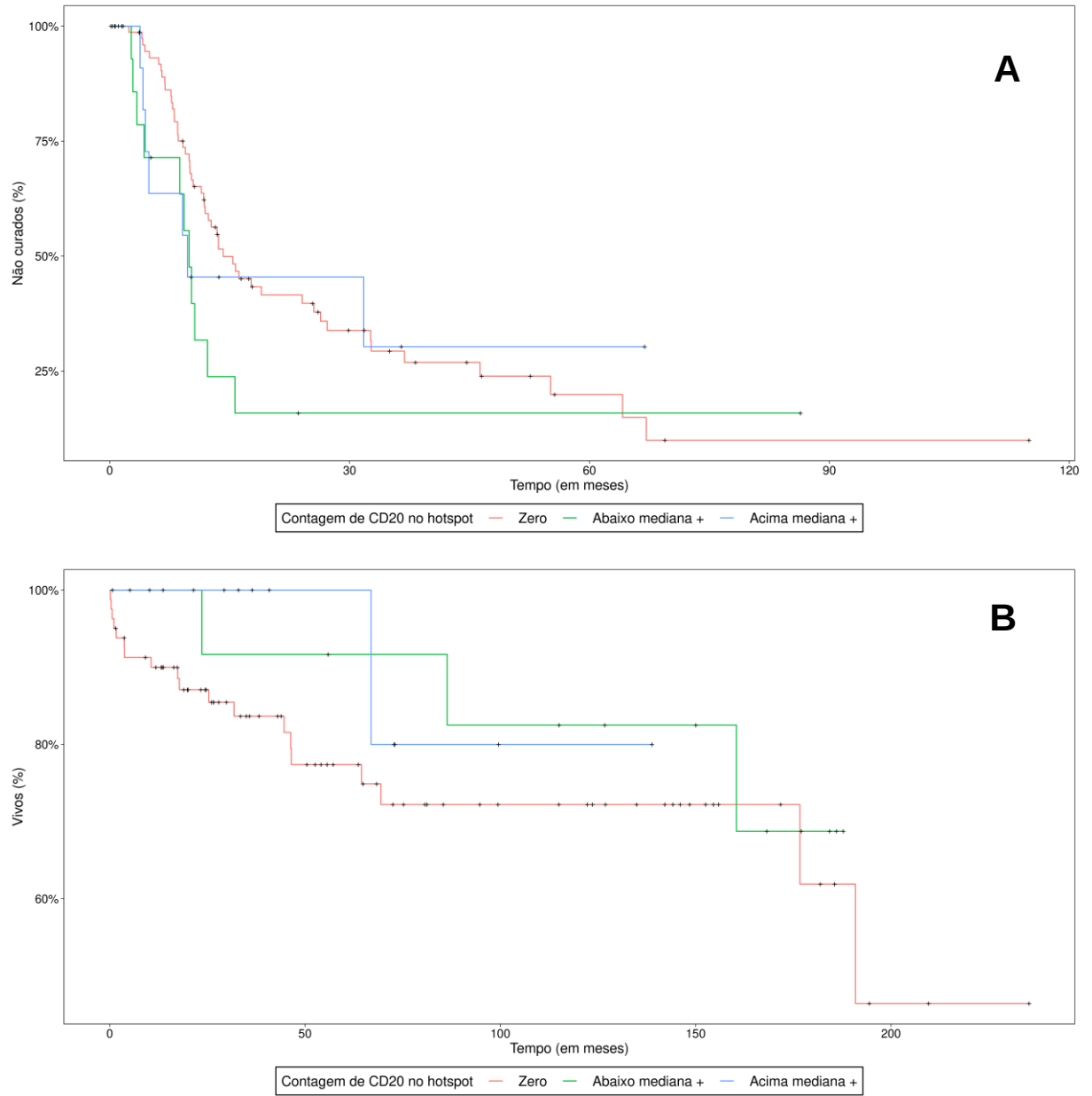


Figura S3. **A**, Estimador de Kaplan-Meier do tempo até a cura pela variável Contagem de CD20 no hotspot ($p=0.0903$). **B**, Estimador de Kaplan-Meier do tempo até o óbito pela variável Contagem de CD20 no hotspot ($p=0.2539$). Mediana da contagem de células CD20 no *hotspot* = 6 células (1-25).

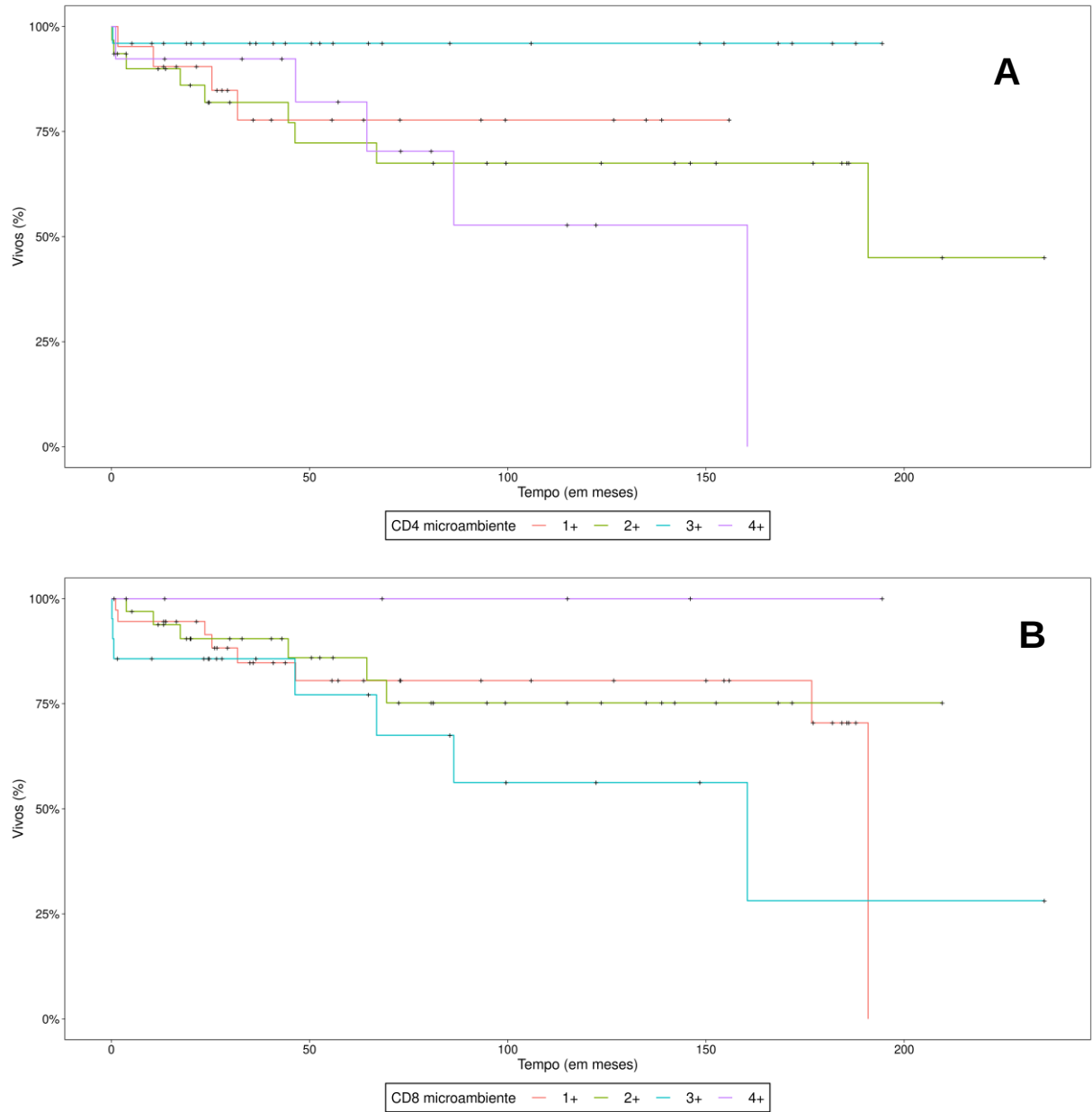


Figura S4. **A**, Estimador de Kaplan-Meier do tempo até o óbito pela variável CD4 no micromambiente ($p=0.015$). **B**, Estimador de Kaplan-Meier do tempo até o óbito pela variável CD8 no micromambiente ($p=0.0385$).

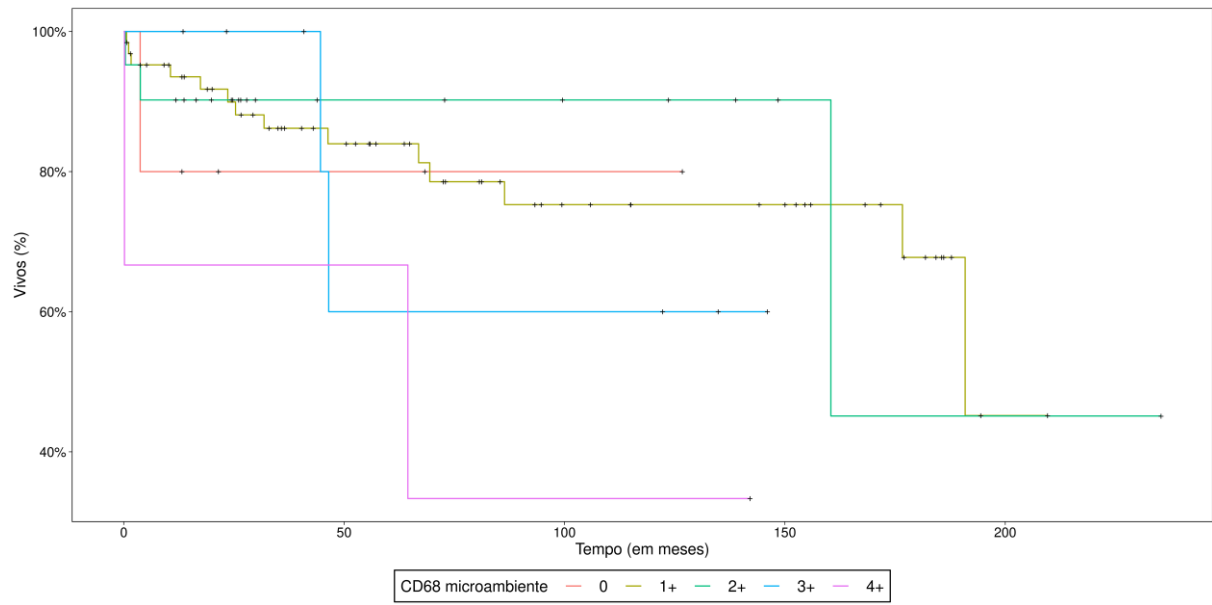


Figura S5. Estimador de Kaplan-Meier do tempo até o óbito pela variável CD68 ($p=0.0288$).

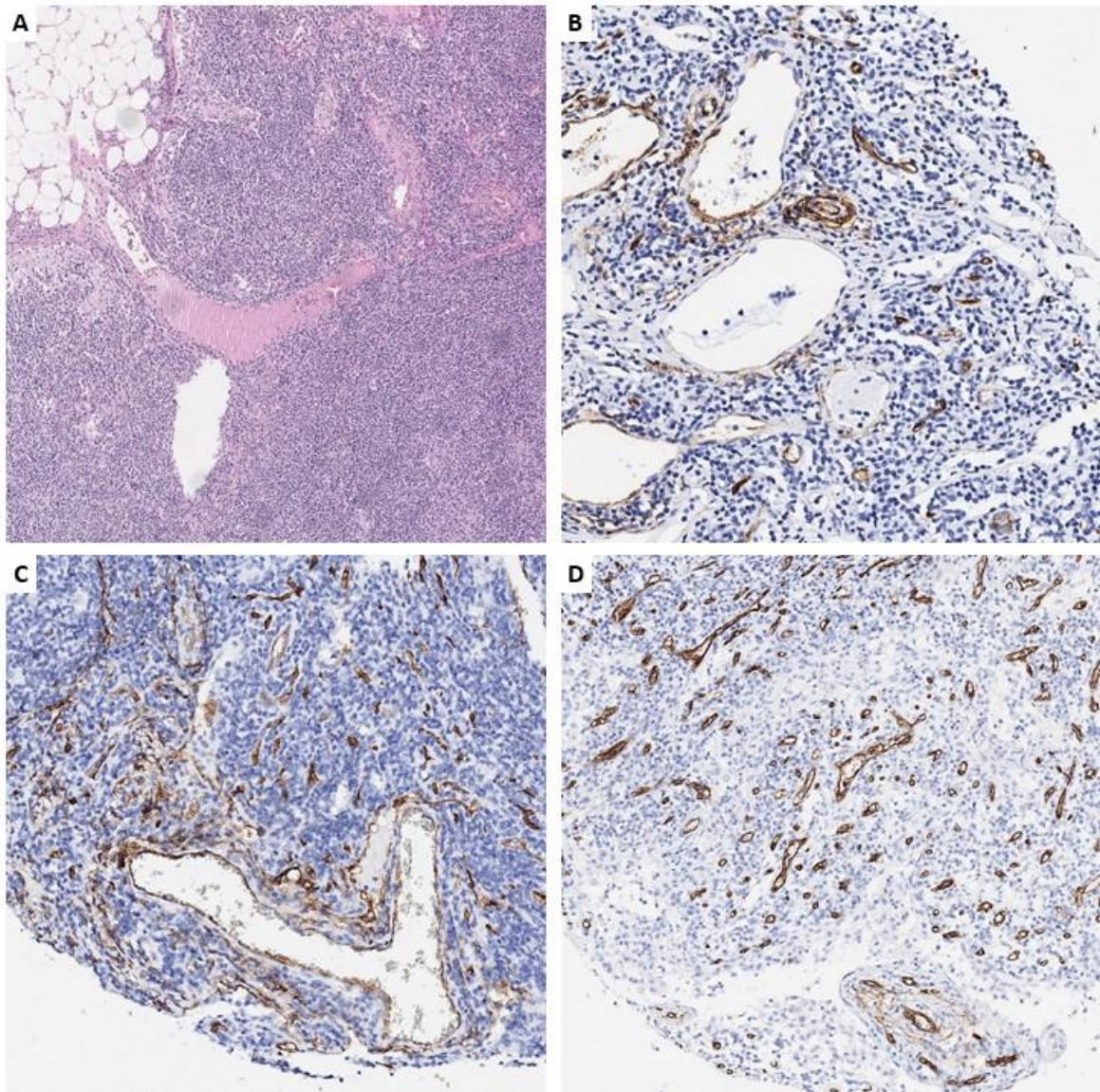


Figura S6. Densidade e ectasia vascular. A) Ectasia vascular à morfologia (H&E, 50x); B) Ectasia vascular evidenciada pelo CD34 (200x); C) Ectasia e densidade vascular pelo CD34 (200x); e D) Ectasia e densidade vascular pelo CD34 (100x). H&E: Hematoxilina e eosina.

CONCLUSÕES FINAIS

A presente casuística foi estudada quanto à imunoexpressão de CD20 em células neoplásicas e quanto às imunoexpressões de marcadores do microambiente tumoral, em pacientes portadores de LHc.

Dentre os achados estatisticamente significativos estão:

- Dentre os pacientes CD20-positivos, aqueles com menos de 10,5 células/10CGA alcançam a cura mais rápido do que aqueles com mais de 10,5 células/10CGA ($p=0,0037$).
- A chance de um caso ser CD-20 positivo nas células neoplásicas é sete vezes maior quando se tem granuloma à morfologia ($p=0,034$).
- Pacientes com positividade para CD20 nos linfócitos do fundo inflamatório curam mais rápido do que os negativos, particularmente aqueles com mais de 25% de células positivas ($p=0,0183$).
- Pacientes PD-1 negativos possuem maior taxa de cura e maior sobrevida do que os pacientes PD-1 positivos ($p=0,0309$ e $p=0,0016$, respectivamente).
- Pacientes com menos de 25% de plasmócitos CD138-positivos no microambiente tendem a se curar antes de pacientes com mais de 25% de positividade e do que pacientes negativos para este marcador ($p=0,0374$).
- A densidade vascular está relacionada a menor frequência de sintomas B ($p=0,036$) e à presença de recidiva ($p=0,004$).
- Pacientes com maior número de linfócitos CD4-positivos tiveram melhor sobrevida ($p=0,015$).
- Pacientes com maior expressão de CD68 (>50%) tiveram uma menor sobrevida ($p=0,0288$).

O presente estudo, ao contrário dos estudos prévios, trabalhou com metodologia de quantificação absoluta de células neoplásicas CD20 positivas e metodologia em cruzes para o microambiente, métodos de maior reprodutibilidade na prática assistencial. Entretanto, maior compreensão das interações celulares pode ser realizada com imunoistoquímica *multiplex* e contagem computacional de células visando aprimoramento dos resultados obtidos.

Além disso, o estudo foi retrospectivo, limitação importante em relação a obtenção de dados clínico-evolutivos dos pacientes. Estudos prospectivos são necessários para melhor caracterização do LHc.