



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

Rodrigo Tavares Macedo

**Medula óssea no linfoma de Hodgkin: a
imunoistoquímica amplia o diagnóstico de
infiltração neoplásica?**

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

Orientador(a): Prof. Dr. Cristiano Claudino Oliveira
Coorientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues

**Botucatu
2019**

Rodrigo Tavares Macedo

Medula óssea no linfoma de Hodgkin: a
imunoistoquímica amplia o diagnóstico de
infiltração neoplásica?

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

Orientador: Prof.Dr. Cristiano Claudino Oliveira
Coorientadora: Profa.Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues

Botucatu
2019

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

Macedo, Rodrigo Tavares.

Medula óssea no linfoma de Hodgkin : a
imunoistoquímica amplia o diagnóstico de infiltração
neoplásica? / Rodrigo Tavares Macedo. - Botucatu, 2019

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

Orientador: Cristiano Claudino Oliveira
Coorientador: Maria Aparecida Custódio Domingues
Capes: 40105008

1. Hodgkin, Doença de. 2. Linfoma. 3. Medula óssea. 4.
Estadiamento de neoplasias.

Palavras-chave: Estadiamento de Neoplasias; Hodgkin;
Linfoma; Medula Óssea.

Dedicatória

À minha mãe Edneide

Por me prover com o dom da existência, por pavimentar meu caminho ao esclarecimento, por me amar incondicionalmente. Por oferecer, em todos os momentos, um ombro para meus pensamentos cansados, uma mão ao vacilar dos meus passos e um teto ao meu corpo efêmero. Obrigado por oferecer seus braços quando meus primeiros passos eram cambaleantes; obrigado por oferecer teu conhecimento, quando minhas palavras eram confusas; obrigado por me oferecer luz, quando na sombra jazia minha razão. Em tudo que fui, sou e serei, ecoa tua presença. És luz!

Agradecimentos

À minha mãe, **Edneide Tavares Macedo**, por estar presente em todos os ciclos da minha vida. Por me acolher em meus primeiros passos, por me alfabetizar, ensinar-me a contar, ler, escrever, pensar e refletir. Obrigado por me oferecer o amor mais puro, os conselhos mais sábios e os ensinamentos mais profundos.

À minha esposa, **Mariana Franco Fragoso**, por acreditar em mim; por nunca me deixar desistir; por me mostrar que posso ser mais; por exigir que eu seja mais; por todo o carinho e afeto que a mim destinou; por me acolher em seus braços em todos os momentos; por me oferecer um colo para que possa descansar. Por me amar! Somos um só e assim seremos, ontem, hoje e sempre. Tu um pedaço de mim, eu um pedaço de tu. Indissociáveis.

Ao meu tio **Edivan Tavares Macedo**, por ser um braço forte para mim e minha mãe; por estar presente em nossas vidas em todos os momentos; por nunca deixar de acreditar em mim. Obrigado meu tio querido, você é a minha figura paterna!

Ao meu irmão querido Pedro Ivo Soares, por me acolher como família. Por me amar desde o momento que me conheceu. Por me agradecer com uma sobrinha tão bela e carinhosa: minha linda **Maria Clara**!

Aos meus tios e tias, **Hedley Tavares Macedo**, **Ednatelma Tavares Macedo**, **Ednajar Tavares Macedo**, **Edialeida Tavares Macedo**, **Edeltrudes Tavares Macedo**, **Edson Tavares Macedo** (*In memoriam*) e **Edinolea Tavares Macedo**, por comporem, cada um à sua maneira, o todo que me faz ser o que sou. Por me acolherem e me chamarem de "meu" sobrinho.

Ao **Instituto Pessoaense de Educação Integrada - IPEI** - por fazer parte da minha trajetória de esclarecimento. Por pavimentar o alicerce da minha formação acadêmica, cívica e pessoal. Aos seres humanos e não-humanos que compõem esse instituto pautado no sócio-construtivismo, meu muito obrigado por me fazer ciente do meu papel no mundo.

Aos meus amigos da tenra infância, **Afonso, Enver e Max**, muito obrigado por me aceitarem em suas vidas. Por todos os momentos que passamos juntos, por todas as lembranças boas que envolvem vocês! Por fazerem da minha trajetória, algo prazeroso, leve e inesquecível!

Ao meu amigo, que de tão amigo é um irmão: **Silvio de Azevedo Júnior**. Muito obrigado por tudo! Pelas ceias de natal, pelos momentos juntos, por fazer da minha trajetória no ensino médio um momento mais ameno.

Ao meu querido professor **Marco Lliarena**. Muito obrigado por ser uma inspiração em minha vida. Por tornar o ato de ensinar uma experiência de engrandecimento, esclarecimento, reflexão e empoderamento. Que muitos outros jovens possam desfrutar da experiência gratificante e iluminadora que é conviver contigo.

À **Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Médicas e Hospital Universitário Lauro Wanderley**, por me proporcionarem uma formação acadêmica completa e de excelência.

Ao professor **Severino Ramos de Lima** (*In memoriam*), coordenador por muitos anos do curso de Medicina da Universidade Federal da Paraíba. Por conduzir com honra e dedicação nosso curso de graduação para uma rota de excelência e contribuir para a formação de médicos tecnicamente e emocionalmente capazes de exercer a profissão que escolheram.

Ao professor **Alexandre Rolim da Paz**, por me abrir as portas responsáveis por minha primeira experiência de fato no universo da Patologia. Por se dispor a orientar meu trabalho de conclusão de curso e continuar a me orientar quando do meu estágio no Hospital Napoleão Laureano.

Ao **Hospital Napoleão Laureano**, por se dispor como esperança na vida de muitos que dela precisam. Por me abrir as portas para que eu pudesse crescer como médico, homem e cidadão.

À **Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP** - por me acolher, tornar-me maior, proporcionar-me a experiência de ser médico-residente e de poder continuar minha formação como mestre em Patologia.

Ao **Departamento de Patologia** do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - HCFMB - por me acolher e possibilitar a produção dessa dissertação de mestrado.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Cristiano Claudino Oliveira**, também meu preceptor durante meus anos de médico-residente no Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - HCFMB. Muito obrigado por acreditar em mim, mesmo diante das adversidades que se instalaram em minha trajetória. Obrigado por me acompanhar nesse processo e fazer parte dele como agente atuante e modificador.

À **Michele Lawlor** por gentilmente me ceder o espaço físico responsável pelo processo de confecção da escrita desse projeto.

À **banca**, por dispor tempo e esforços físicos e mentais nesta minha empreitada.

Epígrafe

“A Terra é um palco muito pequeno em uma imensa arena cósmica. Pense nas infindáveis crueldades infringidas pelos habitantes de um canto desse pixel, nos quase imperceptíveis habitantes de um outro canto, o quão freqüentemente seus mal-entendidos, o quanto sua ânsia por se matarem, e o quão fervorosamente eles se odeiam. Pense nos rios de sangue derramados por todos aqueles generais e imperadores, para que, em sua glória e triunfo, eles pudessem se tornar os mestres momentâneos de uma fração de um ponto. Nossas atitudes, nossa imaginaria auto-importância, a ilusão de que temos uma posição privilegiada no Universo, é desafiada por esse pálido ponto de luz.”

(Carl Edward Sagan)

Resumo

Background: O estadiamento de pacientes com linfoma de Hodgkin inclui avaliação da medula óssea (MO). No caso da análise da MO por meio de material obtido na biópsia, buscam-se células de padrão Hodgkin-Reed-Sternberg em meio a fundo reacional. O presente estudo avaliou a utilização da imunoistoquímica como ferramenta para ampliar o poder de detecção da infiltração nas amostragens de MO. **Material e métodos:** Foram selecionados 68 pacientes com diagnóstico de linfoma de Hodgkin entre 1998 e 2017, que tiveram seus prontuários médicos revisados e suas de biópsias e/ou aspirados de medula óssea revistos morfológicamente. Estudo de imunoistoquímica com CD30 e CD15 foram realizados. Os dados tabulados. O valor de p considerado significativo foi quando menor que 0,05. **Resultados.** Hiperplasia (n=33, $p=0,019$), plasmocitose (n=23, $p=0,009$), aumento de reticulina (n=14, $p=0,002$), granulomas (n=5, $p=0,000$) e histiocitose (n=31, $p=0,001$) foram os parâmetros que tiveram melhor associação com a detecção de infiltração neoplásica pela imunoistoquímica. O marcador CD30 foi mais útil para utilização do que o CD15. **Conclusão:** A utilização do CD30 amplia a precisão do diagnóstico de infiltração e o aumento da reticulina, a plasmocitose, a histiocitose e a presença de granulomas na medula óssea representam fatores indicativos da necessidade de complementação da avaliação morfológica com a técnica imunoistoquímica.

Palavras-chave

1. Hodgkin, Doença de. 2. Linfoma. 3. Medula óssea. 4. Estadiamento de neoplasias.

Abstract

The process of staging in patients with Hodgkin's lymphoma includes evaluation of bone marrow (BM) where the presence of Hodgkin-Reed-Sternberg (HRS) cells are looked for in the background. The present study evaluated the use of immunohistochemistry as a tool to increase the detection power of the infiltration in the BM samples. Material and methods: 68 patients with a diagnosis of Hodgkin lymphoma were selected, between 1998 and 2017. Their medical records were reviewed as well as the bone marrow aspirates and / or biopsy samples. Immunohistochemical study with CD30 and CD15 were performed. The tabulated data The value of p considered significant was when less than 0,05. Results: hypercellularity ($N = 33$, $p = 0.019$), plasmacytosis ($n = 23$, $p = 0.009$), reticulin increase ($n = 14$, $p = 0.002$), granulomas ($n = 5$, $p = 0.000$) and histiocytosis ($n = 31$, $p = 0.001$) were the parameters that had the best association with the neoplastic infiltration of the BM confirmed by immunohistochemistry. The CD30 marker was more useful for use than the CD15. Conclusion: The use of CD30 amplifies the accuracy of the diagnosis of infiltration and the increase of reticulin, plasmacytosis, histiocytosis and the presence of granulomas in the bone marrow represent indicatives of the need to complement the morphological evaluation with the immunohistochemical technique.

Key-words (MeSH): Hodgkin Disease, Lymphoma, Bone Marrow, Neoplasm Staging

*Based on submission guidelines of Diagnostic Pathology Journal, available online: <https://diagnosticpathology.biomedcentral.com/submission-guidelines> (accessed on May 13th of 2019)

Sumário

1. Introdução.....	15
1.1. Linfomas: conceito, imunofenótipo e <i>clusters of differentiation</i>	15
1.2. Ontogênese dos linfócitos B.....	16
1.3 O centro germinativo e seus componentes.....	19
2. O linfoma de Hodgkin.....	22
2.1. A célula de Hodgkin-Reed-Sternberg.....	24
2.1.1. O imunofenótipo das células HRS e LP.....	28
2.2. O substrato genético dos linfomas de Hodgkin.....	30
2.3. Via de sinalização NFkB e a patogênese dos linfomas de Hodgkin.....	30
2.4. Via de sinalização JAK2-STAT e a patogênese dos linfomas de Hodgkin.....	33
2.5 O vírus Epstein-Barr e a patogênese dos linfomas de Hodgkin.....	36
2.6. O microambiente do linfoma de Hodgkin clássico.....	40
2.6.1. O papel dos linfócitos T CD4+ no microambiente dos linfomas de Hodgkin Clássicos.....	43
2.6.2 <i>Checkpoint</i> imunológico e patogênese dos linfomas de Hodgkin clássicos.....	44
2.7. O microambiente nos linfomas de Hodgkin do tipo predomínio linfocítico-nodular.....	47
3. O sistema de estadiamento dos linfomas de Hodgkin.....	47
3.1 O papel da biópsia da medula óssea no estadiamento dos linfomas de Hodgkin.....	51
3.2 O papel do PET-CT com 18F-Fluorodesoxiglicose no estadiamento dos linfomas de Hodgkin:.....	51
3.3 O padrão histopatológico de acometimento da medula óssea pelo linfoma de Hodgkin.....	53
4. Justificativa.....	53
5. Objetivos.....	54
5.1 Objetivo geral:.....	54
5.2 Objetivos específicos:.....	54
Referências.....	56
Medula óssea no linfoma de Hodgkin: a imunoistoquímica amplia o diagnóstico de infiltração neoplásica?	63
Resumo.....	65
<i>Background</i>	68
Metodologia.....	69
Resultados.....	71

Discussão.....	74
Conclusão.....	78
Referências.....	80

Capítulo I

Revisão da Literatura

1. Introdução

1.1. Linfomas: conceito, imunofenótipo e *clusters of differentiation*:

Linfomas compõem um grupo heterogêneo de doenças linfoproliferativas clonais cuja fisiopatologia está centrada na proliferação desregulada de linfócitos⁷. As neoplasias de linhagem linfoide são classificadas de acordo com o padrão morfológico, imunofenotípico e genético, conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou em suas revisões temáticas, a última delas no ano de 2017¹. Há dois grandes grupos: linfomas não-Hodgkin e linfoma de Hodgkin. Os linfomas não-Hodgkin incluem as neoplasias de precursores linfoides, as neoplasias de células B maduras, as neoplasias de células T e as neoplasias de células NK¹.

Neoplasias linfoides têm como característica básica a clonalidade, ou seja, uma célula linfóide escapa aos mecanismos imunológicos e fisiológicos diferenciativos e dá origem a células-irmãs de fenótipo similar. Dessa forma tanto a célula-mãe quanto as células-filhas compartilham, por exemplo, da expressão de proteínas receptoras de antígeno similares^{2,3,4}. A identificação do clone neoplásico é possível por meio da identificação de rearranjos antigênicos ou proteínas imunoexpressas, configurando a imunofenotipagem diagnóstica. Portanto, de acordo com o imunofenótipo presente em um linfoma em questão, pode-se inferir em que etapa do processo de maturação o linfócito-mãe estava antes de ser desviado de seu curso fisiológico e culminar em uma neoplasia^{2,3,4}.

O estudo imunofenotípico de uma população linfoide está fundamentado, basicamente, na expressão dos receptores de superfície^{2,3,4}. Dentre esses, os *clusters of differentiation* (CD) são os mais comumente utilizados. Essas glicoproteínas de superfície desempenham múltiplas funções, constituindo-se na interface entre a célula e seu ambiente extracelular e, também, na interface célula-célula⁵. O repertório de antígenos tipo CD existente na superfície celular de um linfócito reflete os programas genéticos que ali operam. e, baseado no padrão de expressão de CD, pode-se inferir sua classe e estágio de maturação^{3,4}. Por conseguinte, deduz-se que classe de linfócito escapou do controle fisiológico de diferenciação e deu origem a um linfoma baseado no padrão de CD expresso na superfície celular.^{2,4}

A medida que uma célula linfoide amadurece, há mudança no padrão de expressão de CD^{1,4}. Assim, por exemplo, em linfócitos B virgens há expressão de CD5 em suas membranas, além de imunoglobulina de superfície de padrão IgM^{1,3}. Após a ativação pela reação antígeno-receptor, uma linhagem de células B virgem se diferenciará em plasmócitos capazes de secretar imunoglobulinas do tipo IgM, enquanto outra linhagem, agora disposta nos centros germinativos linfonodais, passará a expressar CD10 em sua membrana¹. O padrão de expressão de CD está associado a mutações específicas e, juntamente com caracteres citológicos e arquiteturais, permite ao patologista distinguir as múltiplas linhagens de neoplasias linfoides com precisão^{1,2}.

1.2. Ontogênese dos linfócitos B

Os sítios de hematopoiese no decorrer da vida são variáveis, sendo a medula óssea o palco mais perene de diferenciação das células-tronco hematopoiéticas^{3,5}. Os eventos que levam uma célula-tronco hematopoiética a direcionar sua diferenciação para a linhagem linfoide são alvos de debates, contudo, sabe-se que parte das células-tronco hematopoiéticas se diferenciam em células progenitoras multipotentes capazes de originar tanto precursores linfoides quando mieloides, num processo contínuo e organizado, sob influências de citocinas e fatores de crescimento em parte liberados pelo microambiente medular, isto é, por fibroblastos, células endoteliais, osteoblastos, macrófagos e até mesmo linfócitos⁵.

A diferenciação natural dos linfócitos B em adultos se inicia na medula óssea³. Células pró-B, oriundas da diferenciação de células progenitoras multipotentes, promovem a recombinação dos *loci* D e J do gene de imunoglobulina^{1,5}. Posteriormente, nas células pré-B, há adição do *loci* V ao *loci* recombinante DJ, originando o segmento recombinante VDJ da cadeia pesada de imunoglobulina^{1,6}. Essa sequência gênica é responsável pela síntese de RNA mensageiro (RNAm) capaz de produzir a cadeia pesada de imunoglobulina M (IgM)^{1,5}. A transição de uma fase pré-B para linfócito imaturo é marcada pelo rearranjo dos *loci* responsáveis pela produção de cadeia leve de imunoglobulina, permitindo ao linfócito B imaturo a expressão completa da molécula de IgM na superfície celular⁵.

Linfócitos B imaturos deixam a medula óssea e se diferenciam em células B transicionais, marcadas pela expressão de CD24 e CD38. Tais células amadurecem no baço⁵ e passam a habitar o sangue periférico, folículos linfoides primários ou zonas do manto de folículos ativados¹, passando a se chamar linfócitos B maduros virgens^{1,3}. Ao encontrar um antígeno que se acople à imunoglobulina de superfície, esses linfócitos B virgens maturam, parte se diferenciando em plasmócitos capazes de secretar imunoglobulinas do tipo IgM e parte em células que percorrerão folículos linfoides e centros germinativos, junto às células dendríticas em resposta a estímulo mediado por linfócitos T *helper* (LTh)^{1,5}.

Tabela I: Estágio de maturação linfocitária e topografia preferencial

Marcador	Medula Óssea				Tecidos Linfóides Periféricos		
	Linfócito Pró-B	Linfócito Pré-B	Linfócito B Imaturo	Linfócito B Naïve	Centroblastos	Linfócitos B de memória	Plasmócitos
<u>CD34</u>	<u>Positivo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>
<u>TdT</u>	<u>Positivo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>
<u>CD10</u>	<u>Positivo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>
<u>LMO2</u>	<u>Positivo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>
<u>CD19</u>	<u>Positivo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Positivo</u>
<u>CD79a</u>	<u>Positivo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Positivo</u>
<u>PAX5</u>	<u>Positivo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Negativo</u>
<u>CD20</u>	<u>Negativo</u>	<u>Positivo*</u>	<u>Positivo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Negativo</u>
<u>CD23</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>
<u>CD38</u>	<u>Positivo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Positivo</u>
<u>BCL6</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>
<u>HGAL</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Positivo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>
<u>MUM1</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Positivo*</u>	<u>Positivo</u>	<u>Positivo</u>
<u>BLIMP1</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Positivo</u>
<u>XPB1</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Positivo</u>
<u>CD138</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>	<u>Positivo</u>

1.3 O centro germinativo e seus componentes

Centros germinativos surgem a partir do influxo de linfócitos B que foram ativados via reação antígeno-anticorpo, passando a ocupar o espaço junto à trama de células dendríticas². À microscopia óptica, populações distintas podem ser identificadas em um centro germinativo: células dendríticas foliculares, macrófagos de corpos-tingíveis, centroblastos e centrócitos⁷.

Centroblastos são linfócitos de núcleo grande, vesiculoso e com múltiplos nucléolos visíveis, com elevada capacidade replicativa⁷. Do ponto de vista molecular, expressam BCL6 e de baixos níveis de imunoglobulinas de superfície e não expressam BCL2¹. Estimulados pela reação antígeno-anticorpo e por LTh, são submetidos ao processo de hipermutação somática, que corresponde a mutações pontuais no gene responsável por codificar a fração variável (V) da cadeia de imunoglobulina, dando origem a linfócitos expressando cadeias de imunoglobulina com conformações distintas^{3,4,5}.

O fenômeno da hipermutação somática é responsável por gerar populações linfocitárias com níveis variáveis de afinidade pelo antígeno⁴. Durante essa etapa podem ocorrer mutações deletérias à célula como a síntese de có-dons de parada prematuros, assim como perda de afinidade pelo antígeno⁴. Centroblastos que apresentam mutações deletérias são induzidos a apoptose, após controle celular rígido. Já os que exibem ganho de afinidade antigênica, sem outros fatores deletérios, recebem sinais de sobrevivência via imunoglobulina de superfície^{3,8}.

Além da hipermutação somática, centroblastos podem alterar a conformação da cadeia pesada de imunoglobulina que expressam, fenômeno descrito como troca de cadeia pesada ou *switch* de classes^{1,7}. Com isso, passam a expressar imunoglobulinas do tipo IgG ou IgA, dependendo da influência, dentre outros fatores, das citocinas as quais estão expostos^{1,7}.

Um centroblasto que foi positivamente selecionado após as etapas de hipermutação somática e troca de cadeia pesada passa a ser chamado de centrócito, que ao estudo histológico convencional com hematoxilina-eosina (HE) é caracterizado por tamanho reduzido com núcleo irregular e cromatina densa⁷. Do ponto de vista molecular, centrócitos passam a expressar BCL2¹ e IRF4/

MUM1 e deixam de expressar BCL6 em virtude de interações com moléculas de superfície presentes nas células dendríticas foliculares e em LTh¹. Os desfechos finais de maturação de linfócitos B são a formação de plasmócitos, células terminais e especializadas na secreção de imunoglobulinas cujo imunofenótipo é caracterizado pela expressão de CD38, CD138, IRF4/MUM1 e CD79a, ou produção de linfócitos B maduros de memória^{1,3,7}. Os plasmócitos integram à medula óssea, já os linfócitos B de memória permanecem circulantes sendo capazes de produzir resposta imunológica específica a partir do contato com antígeno previamente selecionado³.

O fundamento imunológico do centro germinativo tem um contraponto importante: os mesmos mecanismos capazes de desenvolver linfócitos com receptores do tipo cadeia de imunoglobina de alta afinidade por antígenos também está presente na fisiopatologia das neoplasias de linhagem B⁸. É importante entender que diversas vias de sinalização são ligadas e desligadas durante as reações formativas do centro germinativo e que a falha de supressão de uma ou mais dessas vias pode ser o gatilho inicial para um escape clonal e desenvolvimento de neoplasia linfóide⁸.

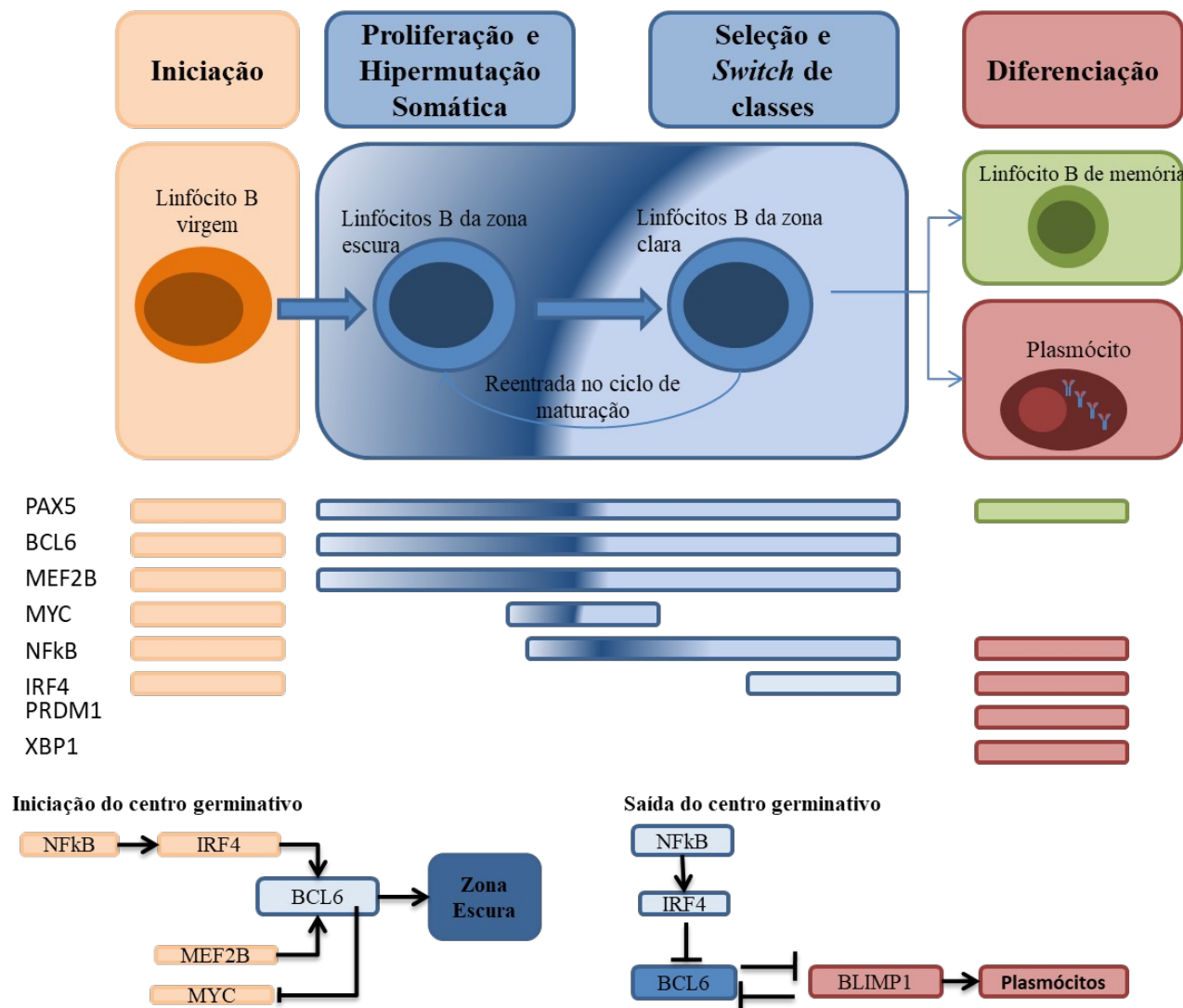


Figura 1, adaptada de BASSO e DALLAFAVERA, 2015: *Paired box 5 (PAX5)* é expresso durante toda a vida de um linfócito B, exceto nos comprometidos com a diferenciação plasmocitária. *B cell lymphoma 6 (BCL6)* está expressa durante toda a reação tipo centro germinativo (CG). As vias de sinalização NFkB/IRF4 estão ausentes nos linfócitos que ocupam a zona escura, entretanto fazem parte do processo de iniciação da reação de centro germinativo por meio da expressão de BCL6. O contrário também é verdadeiro: essa via de sinalização é capaz de suprimir a expressão de BCL6 em linfócitos comprometidos com a diferenciação em plasmócitos. Por fim, há um período ainda não bem compreendido em que há reexpressão de MYC em linfócitos B que ocupam a zona clara do CG, o que os faz voltar à zona escura. A expressão de *BLIMP1* e *XBP1* é característica dos linfócitos B comprometidos com a diferenciação plasmocitária. Enquanto que linfócitos B maduros de memória permanecem expressando *PAX5*.

2. O linfoma de Hodgkin

Thomas Hodgkin, em 1832, publicou o artigo *On some morbid apperances of the absorbent glands and spleen* no qual descrevia o aspecto aumentado de linfonodos e do baço em sete estudos de autópsia⁹. É, pois, atribuído a este autor a descrição macroscópica do que hoje se entende por linfoma de Hodgkin, que foi pormenorizada por Dorothy Reed e Carl Sternberg⁹. em artigo publicado em 1902 no qual relatam oito casos de linfoma de Hodgkin, à época chamada doença de Hodgkin⁹. Foi descrito o que hoje é entendido como o aspecto microscópico principal dessa patologia: a célula gigante, binucleada e binucleolada conhecida como célula de Reed-Sternberg^{9,10}.

São estimados 8.110 novos casos de linfoma de Hodgkin para o ano de 2019 com aproximadamente 1.000 óbitos por essa neoplasia nos Estados Unidos¹¹, com distribuição bimodal havendo um pico de incidência máximo dos 15 aos 34 anos e outro, de menor amplitude, após os 60 anos¹². A sobrevida em cinco anos é estimada em 86,6%, sendo que 73,5% dos pacientes em estágio IV sobrevivem mais que 5 anos¹¹. No Brasil, a incidência de linfomas de Hodgkin foi de 2.530 novos casos, sendo 1.480 em homens e 1.050 em mulheres para o biênio 2018/2019¹³.

Manifestações clínicas do linfoma de Hodgkin clássico se caracterizam por presença de aumento ou massa linfonodal em geral nas topografias supra-diafragmáticas - cerca de 60 a 70% dos casos de linfoma de Hodgkin clássico se manifestam com aumento das cadeias nodais cervicais ou supraclaviculares - perda de peso acima de 10% do peso basal ao longo de seis meses, sudorese noturna e febre acima de 38°C que costumam ser irregulares¹². Em pacientes com massa mediastinal de grande volume é descrita a ocorrência de sintomas como tosse, dor torácica, dispnéia e hemoptise¹². Linfomas de Hodgkin podem ser de tipo clássico ou predominância linfocítico-nodular de acordo com as características histopatológicas¹⁵. Linfomas de Hodgkin clássicos são subclassificados em quatro variantes distintas: esclerose nodular, depleção linfocitária, celularidade mista e rico em linfócitos. Cada variante possui características peculiares que concede perfis prognósticos diferentes¹⁵.

Tabela II: prevalência, estadiamento ao diagnóstico, topografia mais comum e faixa etária de acordo com os subtipos dos linfomas de Hodgkin

<u>Subtipo</u>	<u>Prevalência</u>	<u>Estadiamento ao diagnóstico</u>	<u>Topografia mais comum</u>	<u>Faixa etária</u>
<u>Esclerose nodular</u>	40 a 70%	Estágio II*; sintomas B frequentes	Cadeias supraclaviculares, cervicais inferiores e mediastino	15 a 34 anos
<u>Celularidade mista**</u>	30 a 50%	Estágios avançados; sintomas B frequentes	Cadeias periféricas e envolvimento esplênico (30%)	30 a 50 anos
<u>Depleção linfocitária***</u>	menor que 1%	Estágios avançados; sintomas B frequentes	Cadeias retroperitoneais	30 a 70 anos
<u>Rico em linfócitosϕ</u>	5%	Estágios I ou II; sintomas B são raros	Cadeias periféricas	30 a 50 anos
<u>Predominância linfocítico-nodular</u>	5 a 10%	Estágio I (60%) ou II	Cadeias periféricas (axilares)	30 a 50 anos

*Massa volumosa (*Bulky disease*) está presente em cerca de 54% dos casos; **Associado a infecções por HIV e EBV; comum a faixas etárias pediátricas; *** Associado a infecção por HIV; ϕ Pode ocorrer em associação a linfoma difuso de grandes células B

Adaptada de: Swerdlow SH *et al* (2017) e Press OW In: Kaushansky *et al* (2016)

Do ponto de vista morfológico, o linfoma de Hodgkin é uma neoplasia paradoxal: o constituinte majoritário da massa neoplásica são células inflamatórias. Apenas uma minoria das células que ocupam um órgão acometido é propriamente neoplásica. Estima-se que entre 1% e 2% sejam células neoplásicas denominadas de células de Hodgkin e Reed-Sternberg (células HRS)^{10,14,15}. Reflexo disso é a dificuldade em se estabelecer a natureza da célula neoplásica dessa doença: apenas em 1994, 162 anos após os estudos de Thomas Hodgkin e 92 anos após as descrições de Dorothy Reed, é que a célula HRS teve sua natureza esclarecida como sendo derivada de linfócito B do centro germinativo^{9,10,16}.

2.1. A célula de Hodgkin-Reed-Sternberg

A identificação de genes recombinantes da cadeia de imunoglobulina permitiu o esclarecimento da natureza da célula HRS e alterou a nomenclatura dessa condição clínica de doença de Hodgkin para linfoma de Hodgkin^{16,17}. Além disso, há evidência de que uma célula de Hodgkin é a entidade proliferativa e que as variantes binucleadas e binucleoladas, também conhecidas por célula de Reed-Sternberg nada mais são do que células de Hodgkin que procederam a divisão incompleta, permanecendo unidas^{18,19,20}. A expressão de p21^{CIP21} e de p16^{INK4a} pelas células binucleadas indica fenótipo senescente e reforça a tese de que o componente proliferativo é formado pelas células de Hodgkin²⁰. Por essa razão, costuma-se referir a essas células pelo termo genérico célula de Hodgkin-Reed-Sternberg ou célula HRS.

Células de Reed-Sternberg clássicas são caracterizadas, à microscopia óptica e coloração histológica convencional por HE, por citoplasma grande, levemente basofílico com pelo menos dois núcleos grandes e, em geral, com lobulações¹⁵. Os núcleos são arredondados, com membranas irregulares e proeminentes, a cromatina é pálida e há, em geral, dois nucléolos eosinofílicos com halo branco perinucleolar, semelhante a uma inclusão viral¹⁵. Variantes mononucleares são chamadas de células de Hodgkin¹⁵. Variantes morfológicas das células RS incluem células com núcleos picnóticos e eosinofílicos associado a citoplasma condensado - células múmias¹⁵ que são células de citoplasma eosinofílico denso com núcleos hipercromáticos e picnóticos.

O subtipo linfoma de Hodgkin predominância linfocítico-nodular tem um aspecto morfológico distinto, caracterizado pela presença das células linfócito-predominantes (células LP), menores, com nucleolo basofílico e halo claro perinuclear²⁰. O padrão de crescimento é nodular ou difuso, com as células LP circundadas por linfócitos T PD1/CD279 positivos e dispostas em uma trama de células dendríticas associadas a linfócitos B e histiócitos²¹. As células LP, também conhecidas por células *popcorn*, podem conter mais de um nucléolo e, em alguns casos, ser multinucleadas, com citologia muito próxima das células HRS, dificultando a distinção entre essas duas entidades nosológicas²¹.

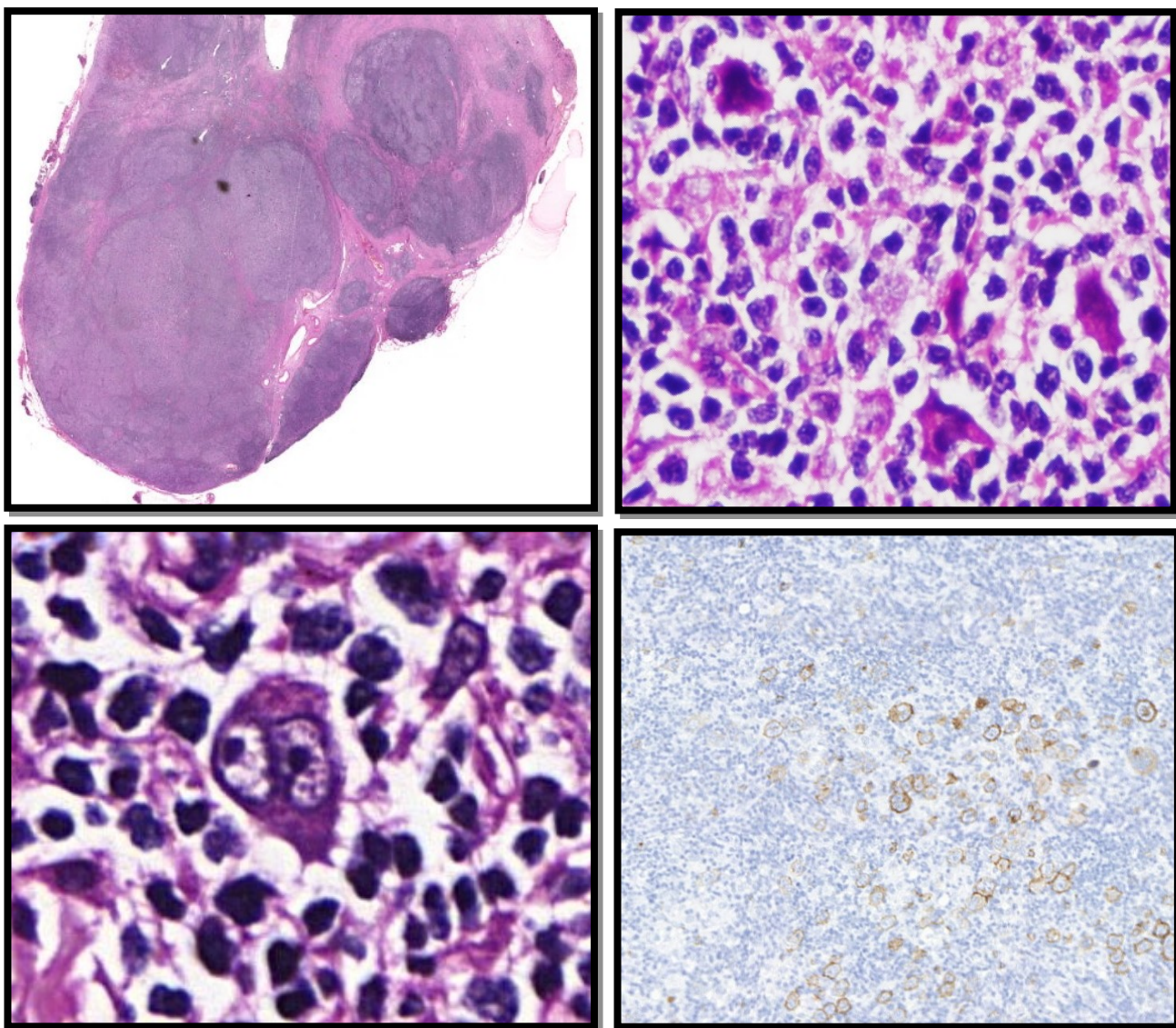


Figura II: linfoma de Hodgkin clássico mostrando a) linfonodo com arquitetura completamente distorcida a custa de agrupamentos celulares nodulares compostos por b) uma maioria de linfócitos e células com citoplasma eosinofílico denso e multinucleada, multinucleolada. Variantes de linfomas de Hodgkin podem exibir c) células de citoplasma eosinofílico denso e núcleos picnóticos (células múmia). O estudo imunoistoquímico com CD30 d) mostra imunomarcacão tipo membrana com algumas células demonstrando reforço perinuclear em ponto. Imagem gentilmente cedida por Dr. Cristiano Claudino Oliveira.

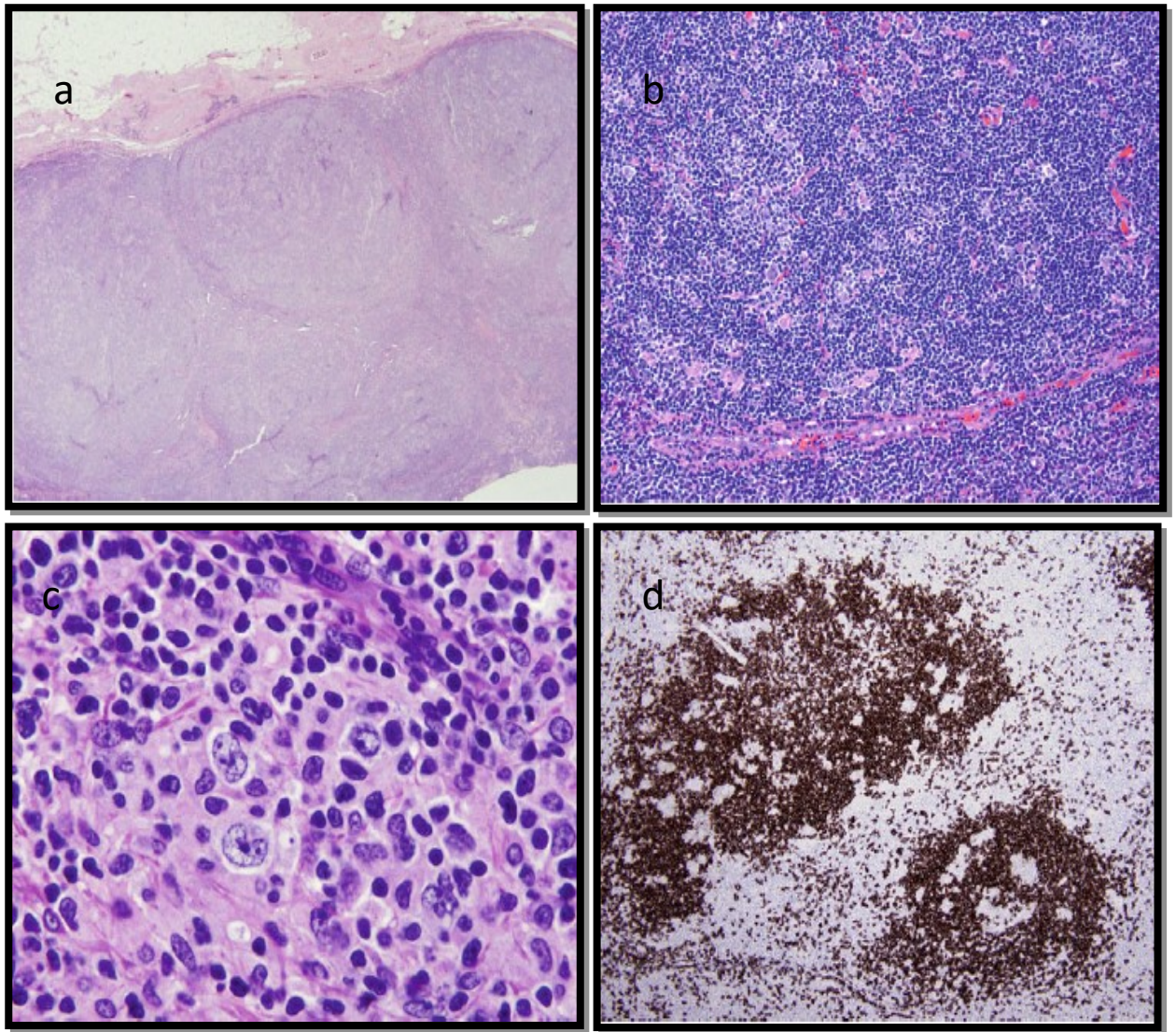


Figura III: Linfoma de Hodgkin predomínio linfocítico-nodular acometendo linfonodo e distorcendo sua arquitetura. Nota-se a) proliferação nodular comprometendo todo o linfonodo, composta por b) linfócitos pequenos, raros histiócitos e c) células de núcleo vesiculoso, grande e com nucleolo proeminente que d) expressam CD20. Extraído de Miranda N et al. Atlas of Lymph Node Pathology. New York: Springer ,2013.

2.1.1. O imunofenótipo das células HRS e LP

O imunofenótipo das células HRS clássicas é caracterizado pela expressão de CD30, conhecido por TNFRSM8, proteína capaz de ativar a via de sinalização anti-apoptótica do fator nuclear kappa B (NFκB) seja por associação à proteína CD30L ou por interação com a proteína latente do vírus Epstein-Barr (LMP1-EBV)²². Outro marcador importante e expresso em 75% a 85% dos casos é o CD15, identificado por meio do anticorpo LeuM127¹. O padrão imunoistoquímico mostra marcação em padrão membrana no limite celular, associado, a reforço perinuclear, originando padrão denominado de marcação tipo *Golgi*. O antígeno leucocitário comum (HLA) também conhecido pelo respectivo cluster, CD45, é consistentemente negativo nas células HRS²².

Aproximadamente 20% dos casos de linfomas de Hodgkin têm células HRS expressando imunofenótipo de linfócitos B, em especial o CD20^{22,23}. Por outro lado, o produto da transcrição do gene PAX5-BSAP, típica de linfócitos B, está expressa nas células HRS, entretanto, a intensidade de expressão dessa proteína à marcação imunoistoquímica é menos intensa do que nos linfócitos B não-neoplásicos²². CD79a, uma proteína transmembrana associada à imunoglobulina de superfície e componente do complexo do receptor de células B, tem sua expressão suprimida em células HRS, assim como o fator de transcrição Oct2 e seus cofatores BOB.1/OBF.1 - proteínas comuns a linfócitos B presentes no centro germinativo²².

O padrão imunofenotípico das células LP reflete melhor seu genótipo B. Há expressão consistente de CD45, assim como CD20 e PAX5^{14,21,22}. Marcadores consagrados de células HRS como CD30 e CD15 são consistentemente negativos nas células LP^{21,22}. CD79a, BOB.1/OBF.1 e Oct2 são proteínas expressas nas células LP, diferentemente das células HRS²¹.

Tabela III: antígenos expressos em células HRS e LP

	<u>Célula HRS</u>	<u>Célula LP</u>
<u>CD45</u>	<u>Negativo</u>	<u>Positivo</u>
<u>CD20</u>	<u>Negativo</u>	<u>Positivo</u>
<u>PAX5/BSAP</u>	<u>Negativo</u>	<u>Positivo</u>
<u>CD30</u>	<u>Positivo</u>	<u>Negativo</u>
<u>CD15</u>	<u>Positivo*</u>	<u>Negativo</u>
<u>CD79a</u>	<u>Negativo</u>	<u>Positivo</u>
<u>Oct2</u>	<u>Negativo</u>	<u>Positivo</u>
<u>BOB.1</u>	<u>Negativo</u>	<u>Positivo</u>
<u>PU.1</u>	<u>Negativo</u>	<u>Positivo</u>
<u>JunB</u>	<u>Positivo</u>	<u>Negativo</u>
<u>Cadeia-J</u>	<u>Negativo</u>	<u>Positivo</u>
<u>IgD</u>	<u>Negativo</u>	<u>Positivo**</u>
<u>BCL6</u>	<u>Variável</u>	<u>Positivo</u>
<u>IRF4/MUM1</u>	<u>Positivo</u>	<u>Negativo</u>
<u>CD138</u>	<u>Negativo</u>	<u>Negativo</u>
<u>LMP1</u>	<u>Positivo</u>	<u>Negativo</u>
<u>Fascina***</u>	<u>Positivo</u>	<u>Negativo</u>
<u>PDL</u>	<u>Positivo</u>	<u>Positivo</u>
*Expresso em 75 a 85% dos casos		
**Positivo em cerca de 27% dos casos de linfoma de Hodgkin predominância linfocítico-nodular		
***Alto valor preditivo negativo para linfomas de Hodgkin clássicos		

2.2. O substrato genético dos linfomas de Hodgkin

Diferente de outras neoplasias, linfomas de Hodgkin não são caracterizados por uma mutação específica, mas sim por um conjunto de alterações genéticas recorrentes e sinérgicas¹⁷. Mutações associadas à transcrição do inibidor alfa do fator nuclear do gene do polipeptídeo de cadeia leve de células B *kappa* ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$), proteína supressora do fator de transcrição nuclear *kappa* B (NF κ B) são reconhecidas nas células HRS em pelo menos um terço dos casos de linfoma de Hodgkin¹⁷..

Análises de balanceamento gênico nas células HRS das regiões cromossômicas demonstraram ganhos genéticos recorrentes em vários *loci*, destacando-se os *loci* 2p13-16, associado à transcrição do gene envolvido na síntese da proteína *c-REL*, 9p23-24, associado à proteína JAK-2 e 12q14, relacionado à transcrição do gene envolvido na produção da proteína MDM2^{17,24}. Outras regiões demonstraram perdas recorrentes, com destaque para o *locus* 17p13, associado à gênese da proteína TP53^{17,24}.

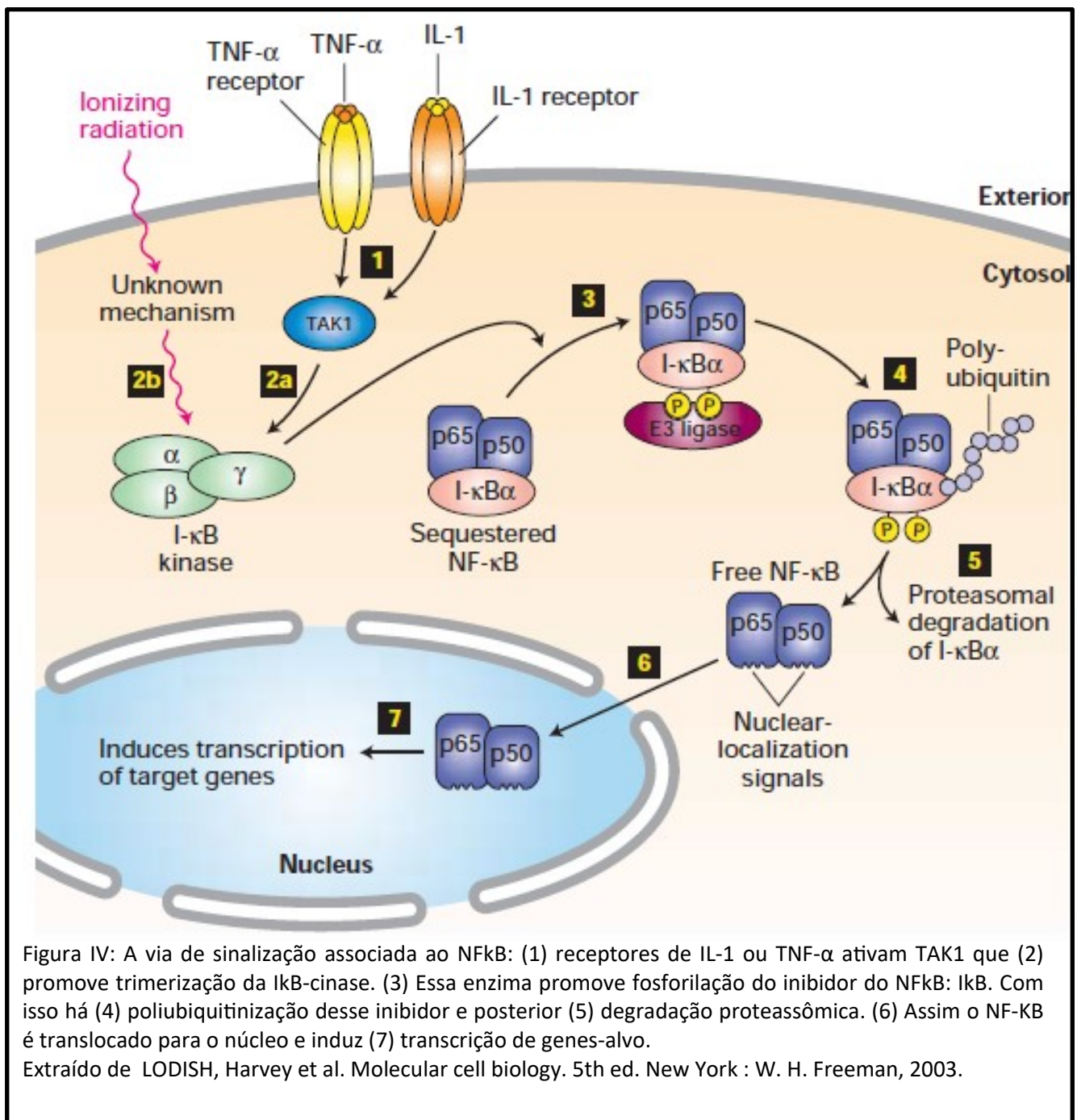
As amplificações supracitadas podem explicar a ativação das vias de sinalização JAK/STAT e NF κ B e exemplificam o fenômeno da instabilidade gênica associada à gênese da célula HRS¹⁷. Entretanto, isoladamente, não são entendidas como eventos primários que originam esse processo neoplásico, visto que nenhuma dessas alterações se mostrou absolutamente necessária para o surgimento da célula HRS¹⁷.

2.3. Via de sinalização NF κ B e a patogênese dos linfomas de Hodgkin

O NF κ B é uma família de fatores de transcrição nucleares que, quando inativos, associam-se ao seu ligante e inibidor $\text{I}\kappa\text{B}$ ²⁵. Em sua estrutura, destacam-se duas subunidades heterodiméricas p65 e p50 que compartilham de uma região homóloga em sua porção N-terminal²⁵. A inibição da proteína $\text{I}\kappa\text{B}$ associada à dimerização dessa região N-terminal é necessária para a ativação do NF κ B30. Quando ativo esses fatores nucleares estimulam à transcrição de mais de 150 genes, incluindo os relacionados a produção de citocinas e quimiocinas capazes de atrair células do sistema imunológico inato e adaptativo assim como são transcritos genes anti-apoptóticos, incluindo *c-FLIP*, XIAP e Bcl_{XL}¹⁷,.

É sabido que, em linfomas de Hodgkin, há hiperregulação da ativação da via de sinalização dependente de NFκB^{14,15,18,20,22,26,27,28}. A amplificação do gene *c-Rel*, as ativações ligantes-mediadas e ligantes-independentes de receptores de superfície celular como CD30, CD40 e receptor ativador do NFκB (RANK) e a imunoexpressão das proteínas LMP-1 e LMP-2a nos linfomas de Hodgkin EBV-relacionados são explicações postuladas para esse fenômeno²⁵. Além disso, mutações inativadoras de IκBα estão ligadas à amplificação dos sinais da via NFκB em linfomas de Hodgkin²⁵. Além desses mecanismos, foram descritas, recentemente, mutações no gene da proteína 3 TNFα-induzida (TNFAIP3), que codifica a A20, uma ubiquitinase e desubiquitinase envolvida na supressão da sinalização via NFκB, desse modo hiperregulando a expressão dessa via pró-inflamatória e anti-apoptótica¹⁵.

O fator anti-apoptótico *c-FLIP*, transcrito pelas células HRS, está implicado na resistência dessas células à apoptose^{15,17}. Sabe-se que células HRS não exibem receptores de células B que são as imunoglobulina de superfície e suas proteínas associadas e, portanto, deveriam ser induzidas à apoptose no centro germinativo, por meio da ativação do Fas/CD95, também conhecido por antígeno de apoptose 1¹⁷. Entretanto a expressão constitutiva de *c-FLIP*, confere resistência a apoptose, já que essa proteína se associa ao complexo DISC, necessário para a clivagem da procaspase-8, fenômeno essencial para a iniciação da apoptose¹⁷. Além disso, *c-FLIP* inibe as proteínas TNFR, TRAIL-R1 e TRAIL-R2, fatores pró-apoptóticos¹⁷.



Células HRS expressam XIAP, que bloqueia a via intrínseca de apoptose por meio da inibição da caspase-3 e caspase-7¹⁷. Já a proteína Bcl_{XL} antagoniza a função pró-apoptótica da proteína Bax na membrana mitocondrial¹⁷e, em ambos os cenários, ocorre resistência a morte celular programada pelo clone neoplásico do Linfoma de Hodgkin.

2.4. Via de sinalização JAK2-STAT e a patogênese dos linfomas de Hodgkin

Janus Kinase (JAK) é uma família de proteínas citoplasmáticas envolvidas na sinalização intracelular e transcrição de genes-alvo²⁵ que se acoplam a uma proteína transmembrana que funciona como receptor: quando da ativação deste receptor há dimerização da JAK e fosforilação de proteínas-alvo do tipo fatores de transcrição²⁵. Já as proteínas STAT são fatores de transcrição citoplasmáticas que, quando da dimerização da JAK, se desligam de seus receptores e se dimerizam por meio da fosforilação de sua porção SH2²⁵. Esse processo expõe sinais de localização nuclear que, assim, guiam o dímero STAT para o núcleo de forma a induzir transcrição de genes-alvo²⁵.

São frequentes as mutações que amplificam sinais da JAK, especialmente a JAK2, em linfomas de Hodgkin¹⁵. Além disso, há frequente inativação do supressor de sinalização de citocinas (SOCS1), um inibidor da via de sinalização JAK-STAT¹⁵. Desse modo há manutenção de sinais de proliferação e sobrevivência para as células HRS. Quatro proteínas STAT são descritas como constitutivamente ativas no linfoma de Hodgkin: STAT3, STAT5A, STAT5B e STAT6²⁰.

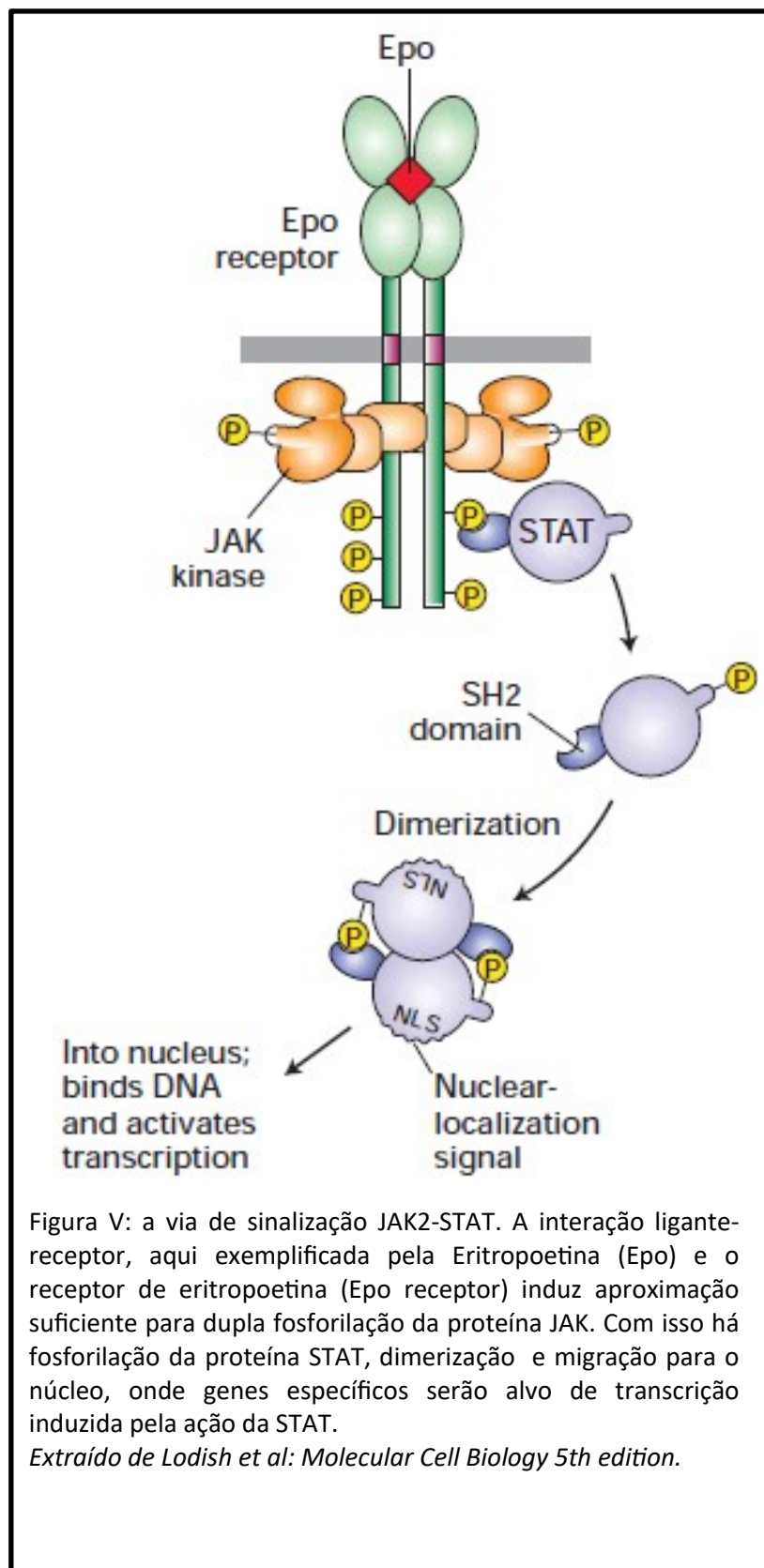
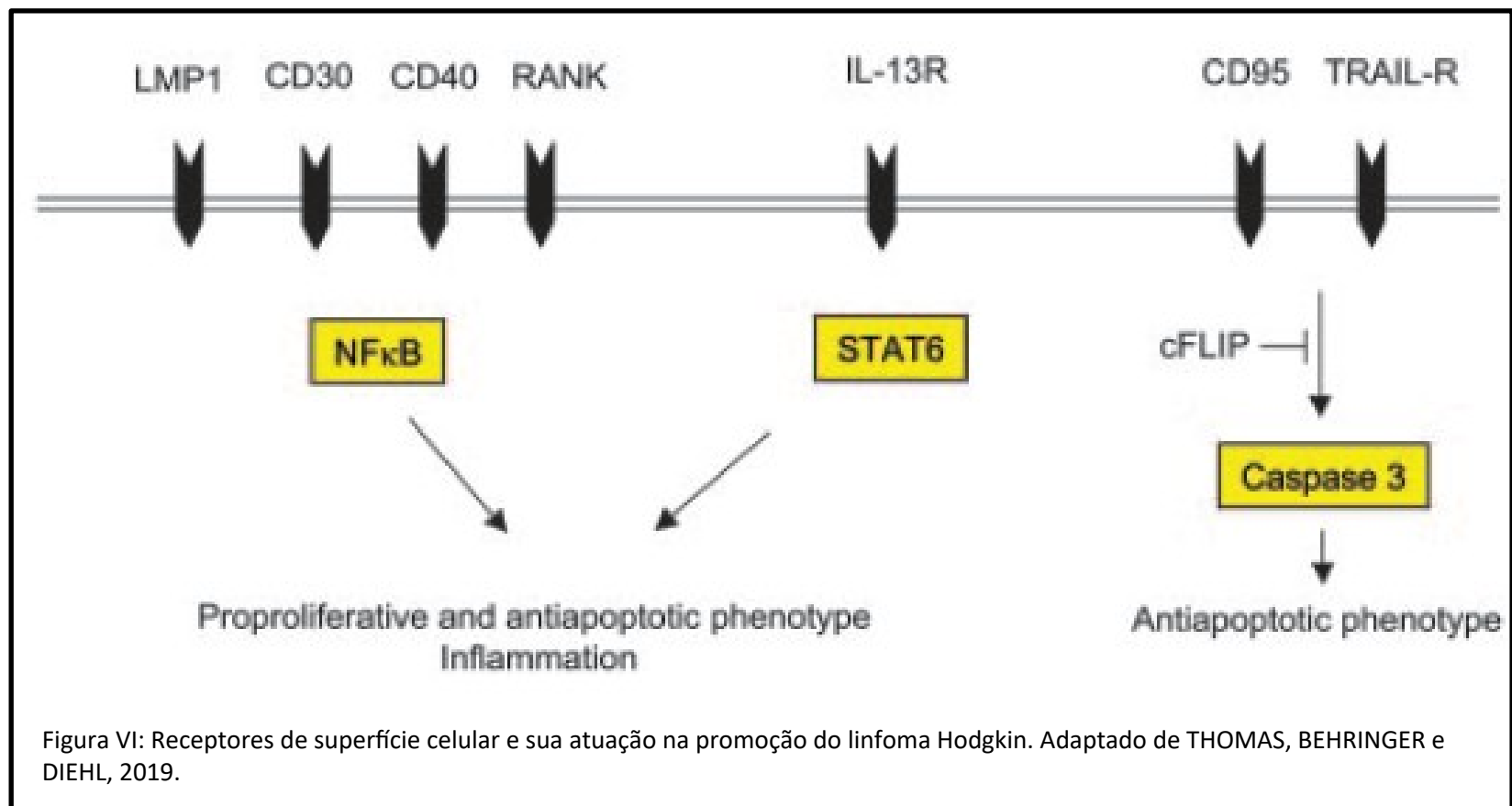


Figura V: a via de sinalização JAK2-STAT. A interação ligante-receptor, aqui exemplificada pela Eritropoetina (Epo) e o receptor de eritropoetina (Epo receptor) induz aproximação suficiente para dupla fosforilação da proteína JAK. Com isso há fosforilação da proteína STAT, dimerização e migração para o núcleo, onde genes específicos serão alvo de transcrição induzida pela ação da STAT.

Extraído de Lodish et al: Molecular Cell Biology 5th edition.



2.5 O vírus Epstein-Barr e a patogênese dos linfomas de Hodgkin

Human gamma herpes virus 4 ou vírus Epstein-Barr (EBV) é um vírus de DNA de fita dupla linear pertencente à família *Herperviridae*²⁹. Vírus desta família são caracterizados pela presença de um nucleocapsídeo icosaédrico e assimétrico circundado por um envelope de glicoproteínas de superfície; preenchendo o espaço entre o capsídeo viral e o envelope glicoproteico estão as proteínas do tegumento viral³⁰. Dois tipos de EBV foram identificados em populações humanas: EBV-1 e EBV-2³¹. As diferenças entre essas cepas estão nos genes que codificam as proteínas nucleares do ciclo de infecção latente EBNA-2, EBNA-LP, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C e nos RNAs EBER-1 e EBER-2³¹.

EBV são capazes de infectar linfócitos B, causando proliferação ilimitada dessas células²³. Culturas de linfócitos B infectadas por EBV mostram, à microscopia óptica, linfócitos ativados, grandes e irregulares. Demonstrou-se, também, que há entrada no ciclo celular com tempo de duplicação entre 20 e 30 horas³².

O EBV utiliza da sua proteína de superfície gp350 para se ligar ao CD21 dos linfócitos B - um receptor para o fator C3d do sistema complemento³². Postula-se que alterações conformacionais desse receptor, induzidas pela infecção viral, sejam um dos mecanismos para imortalização desses linfócitos²⁹. A fusão do core viral é mediada por um heterodímero de glicoproteínas gH/gL e pela glicoproteína gB³³. Com isso, a partícula viral é endocitada em processo auxiliado pela proteína viral de superfície gp85, assim como pelas proteínas gp42, que se liga ao complexo de histocompatibilidade principal classe II (MHC II)^{29,33}.

Após endocitose, o conteúdo viral é liberado no citosol do linfócito infectado. A fim de permitir a integração funcional do DNA viral ao do hospedeiro, a proteína MTP codificada pelo gene BNRF1, presente no tegumento viral, atua se ligando à proteína Daxx e impedindo a metilação das histonas presentes no DNA viral que será associado, compondo um dos mecanismos de resistência intrínsecos virais²⁹.

Ocorre dissolução do nucleocapsídeo viral e o genoma viral, ao se integrar ao genoma do linfócito B, passa de linear a circular, permitindo persistên-

cia do material genético viral ao longo dos ciclos replicativos dos linfócitos B³¹. A replicação viral ocorre durante a fase S do ciclo celular e é mediada pela interação entre a enzima viral EBNA-1 e repetições múltiplas do tipo *tandem* presentes no DNA viral conhecidas como ori-P³².

À infecção latente pelo vírus EBV, apenas 10% dos genes codificados pelo DNA do EBV são atualmente transcritos³¹. Os primeiros produtos de transcrição do DNA viral são as proteínas EBNA-2 e EBNA-LP³¹, envolvidas no processo de imortalização celular por meio da ativação do ciclo celular através da indução da atividade da ciclina D2³². Proteínas da família EBNA-3 são associadas à transformação dos linfócitos B ao longo da infecção latente pelo vírus EBV³¹, com a proteína EBNA-3C ligada a inibição do p16 e inativação do gene Rb o que implica em atividade proliferativa aumentada nas células infectadas pelo EBV³².

O gene viral LMP-1 codifica a proteína homônima composta por 200 aminoácidos e com tropismo pela membrana plasmática dos linfócitos³². Em modelos murinos, LMP-1 é capaz de induzir comportamento ominoso em fibroblastos: estas células aumentam sua capacidade de adesão e adquirem crescimento autônomo, independente de fatores de ancoragem³². Nos linfócitos B essa proteína tem atuação dose-dependente: em níveis elevados é um agente citoestático, enquanto que em baixos níveis hiperregula a expressão de CD23, CD40 e CD54, assim como hiperregula a atividade dos transportadores de peptídeos e de moléculas MHC I e II, induzindo fenótipo proliferativo³². Além disso, a LMP-1 está envolvida na indução da ciclina D2 e de fatores anti-apoptóticos associados ao estresse celular como Bcl-2, A20 e bfl-1³².

A proteína LMP-1 está envolvida na ativação da via de sinalização dependente do NFκB por atuar, semelhante ao CD40, como receptor para fatores associados ao receptor de TNF (TRAF)³². Os TRAF inibem enzimas chamadas inibidores do fator κB (IKKα e IKKβ) assim como a enzima IκBα, promovendo ativação da via NFκB³², além disso também induzem atividade das vias AP1/JunB e Jak2/STAT estabelecendo uma relação entre atividade proliferativa aumentada e infecção pelo vírus EBV³². A proteína LMP-1 também atua como re-

ceptor constitutivamente ativo, mantendo regulada para cima a atividade da via de sinalização NF κ B³².

LMP-2A é uma proteína integral de membrana sintetizada a partir do epissomo viral que atua enviando sinais de sobrevivência alternativos ao do receptor de células B, ausente em células HRS^{17,32}. Estão envolvidas na sinalização da proteína de membrana LMP-2A a via antiapoptótica PI3K/Akt e PTK assim como as vias proto-oncogênicas Wnt/ β catenina e MAPK²⁶.

Junto ao LMP-1, a proteína LMP-2A é fundamental para a imortalização do clone de célula B hospedeiro do vírus EBV²⁶. Sabe-se que linfócitos B infectados pelo EBV podem exibir diferenciação para plasmócitos, entretanto a maior parte desses linfócitos se torna células B de memória, parte em razão da ação da proteína LMP-1²⁶. LMP-2A é tida como um dos facilitadores da transição entre linfócitos B do tipo centro germinativo infectados pelo EBV em plasmócitos, que eventualmente migram para as tonsilas e permitem liberação de partículas virais no ambiente, completando o ciclo viral²⁶.

Pequenos RNAs codificados pelo vírus EBV (EBER) são os transcritos mais abundantes presentes em células EBV-transformadas³². Apesar da abundância, em estudos utilizando linhagens de células EBV-recombinantes carregando mutações em EBER mostraram que essas moléculas de RNA não são necessárias para o crescimento e transformação de células EBV infectadas *in vitro*^{31,32}.

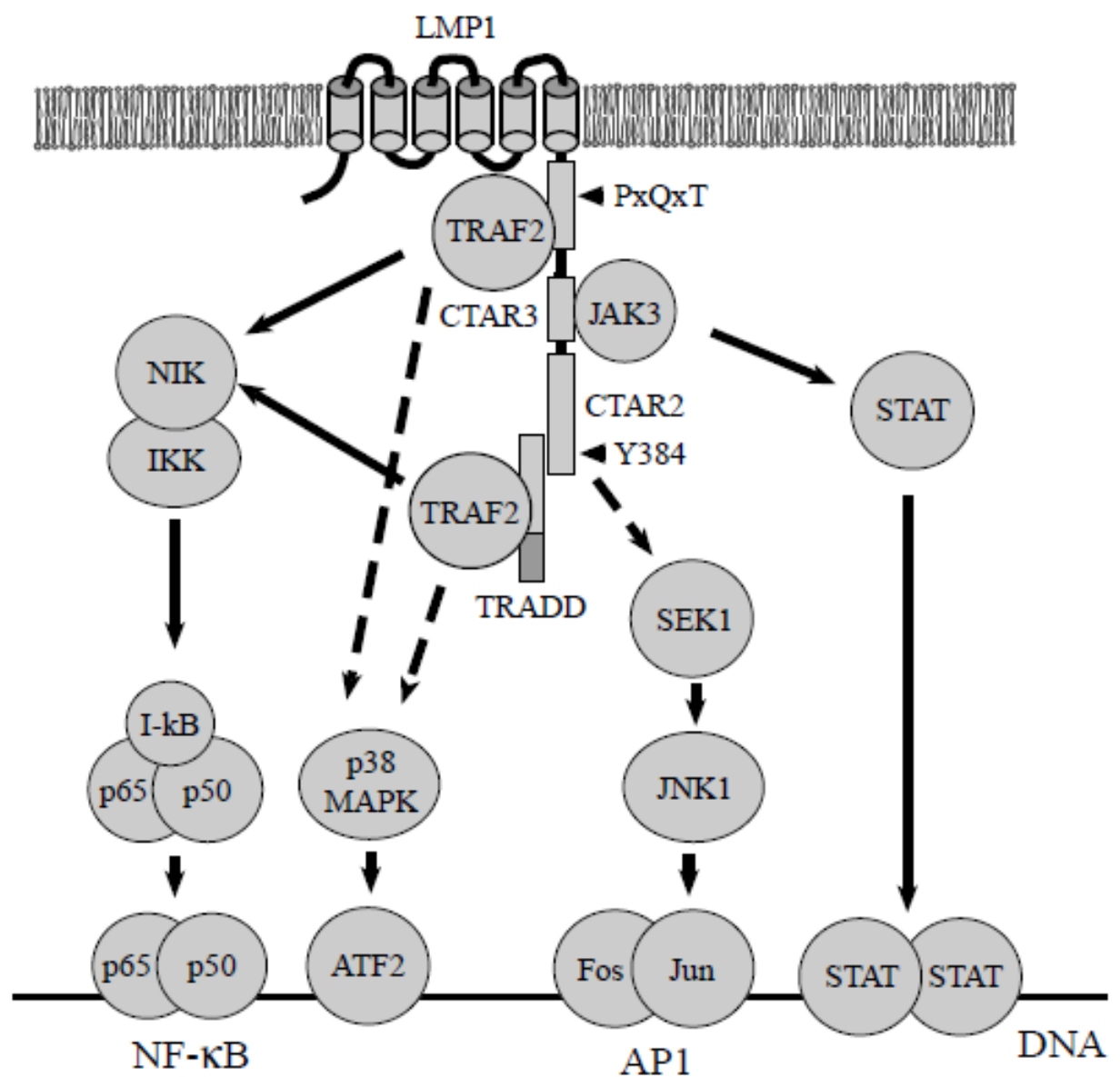


Figura VII: LMP-1, proteína transmembrana presente nos linfócitos B infectados pelo vírus EBV. Funciona como receptor para TRAF e está envolvida na persistente regulação para cima das vias NFκB, AP1 e Jak/STAT. Extraído de BORNKAMM e HAMMERSCHMIDT, 2001.

2.6. O microambiente do linfoma de Hodgkin clássico

O microambiente no linfoma de Hodgkin clássico é composto por uma grande variedade de células inflamatórias e estromais, como linfócitos T, linfócitos B, plasmócitos, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, células mieloides efibroblastos³⁴. Esse infiltrado celular inclui tanto células que visam eliminar as células HRS como células inflamatórias que promovem a sobrevivência e proliferação do clone tumoral³⁴.

Células HRS são capazes de secretar citocinas pró e anti-inflamatórias, recrutando uma miríade de células inflamatórias³⁴. Linfócitos T CD4+ são atraídos pelas citocinas CCL5, CCL17 e CCL22 produzidas pelas células HRS³⁴. Eosinófilos são recrutados através das citocinas IL-5, CCL5, CCL28 e GM-CSF³⁴. Mastócitos e macrófagos são atraídos pela citocina CCL5³⁴. Fibroblastos são atraídos e ativados pelas células HRS por meio da secreção de IL13, TNF- α e FGF e sua ativação contribui para o recrutamento de eosinófilos e linfócitos Th2 por meio da secreção de CCL11³⁴.

A atividade contínua das vias de sinalização JAK/STAT e NF κ B é fundamental para a sobrevivência das células HRS. Além de fatores genéticos, estão envolvidos nessa expressão constitutiva sinais autócrinos e parácrinos²⁷. Mastócitos e eosinófilos secretam CD30L, linfócitos T CD4+_{reg} secretam CD40L, macrófagos e linfócitos secretam TNF- α e a própria célula HRS é responsável por secretar TNFSF11, TNF α e linfotóxina- α , todos esses responsáveis por promover ativação da via canônica de sinalização NF κ B²⁷. Além disso, tanto as células HRS quanto neutrófilos, plasmócitos, macrófagos e mastócitos são capazes de secretar TNFRSF13B, TNFRSF17, TNFSF13 e TNFSF13B, fatores capazes de induzir a via alternativa da NF κ B²⁷. Interleucinas 13 e 21 induzem a ativação da via JAK/STAT e são secretadas pelas células HRS²⁷. Outra via de sobrevivência estimulada autocrina e paracrinamente é a via RTK através dos receptores c-MET, TRKA e DDR2, expressos constitutivamente pelas células HRS²⁷. Células dendríticas foliculares CD21+ secretam HGF, capaz de ativar c-MET; o colágeno tipo IV secretado por fibroblastos ativa TRKA e o fator de crescimento neural (NGF), secretado por granulócitos, ativa o receptor DDR2, induzindo a via de sobrevivência RTK³³.

Por meio do estudo das microvesículas extracelulares coletadas de células HRS, percebeu-se que são internalizadas por fibroblastos aumentando sua capacidade de migração. Estas células passam a exibir hiperregulação de actina do músculo liso alfa (α -SMA) e seu secretoma revela liberação aumentada de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α , além de fatores de crescimento (G-CSF e GM-CSF) e fatores pró-vasogênicos como o VEGF³⁵.

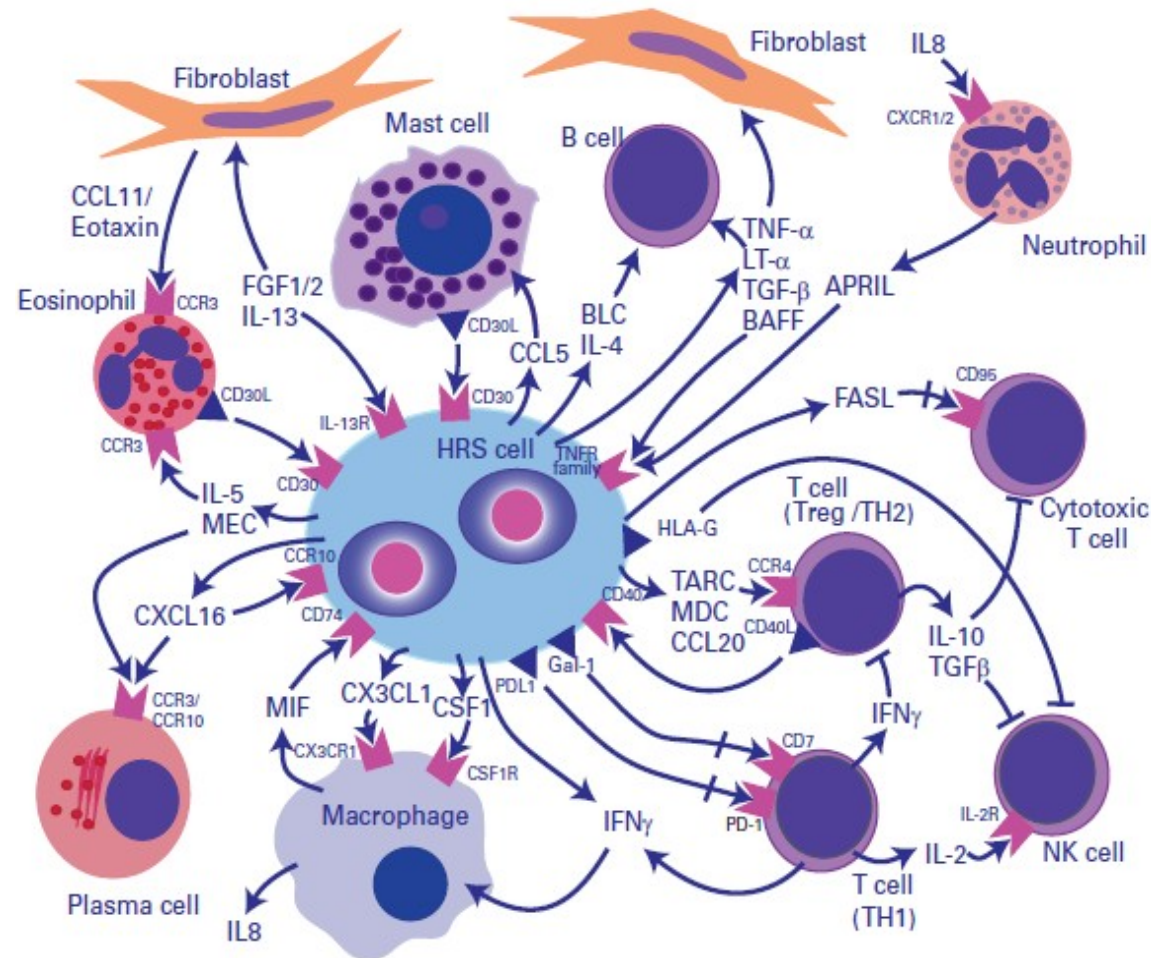


Figura VIII: As células de Hodgkin Reed-Sternberg (HRS) e o microambiente tumoral no linfoma de Hodgkin clássico. No centro, uma célula HRS bi-nucleada expressa moléculas de superfície características, bem como secreta citocinas e quimiocinas. Em torno da célula HRS estão células não neoplásicas atraídas e ativadas. As células do microambiente expressam uma variedade de quimiocinas e citocinas que moldam o infiltrado reativo e fornecem sinalização para as células HRS. Somente as principais funções ativadoras e inibitórias (setas) de moléculas ligadas à membrana (triângulos roxos) e moléculas mediadas por receptores de superfície (rosa) são ilustradas; outras interações existem. IL, interleucina; FGF, fator de crescimento de fibroblastos; TNF-, fator de necrose tumoral; LT-, linfoxina; TGF-, fator de crescimento transformador; BAFF, fator de ativação de células B; ABRIL, ligante indutor de proliferação; BLC, quimioatratante de linfócitos B; TNFR, receptor do fator de necrose tumoral; FASL, ligante de Fas; MEC, quimiocina epitelial associada a mucosa; Treg, célula reguladora T; Célula auxiliar TH, T; TARC, quimiocina relacionada à ativação e ao timo; MDC, quimiocina derivada de macrófagos; Gal-1, galectina-1; PDL, programmed death ligant 1; IFN-interferon gama; NK, célula natural killer. Adaptado de STEIDL 2019.

2.6.1. O papel dos linfócitos T CD4+ no microambiente dos linfomas de Hodgkin Clássicos

O microambiente de um linfoma de Hodgkin clássico é majoritariamente composto por linfócitos T dos tipo CD4⁺_{helper}, CD4⁺_{reg}, CD8⁺ e citotóxicos³⁴. Os linfócitos T CD4⁺ são encontrados em associação íntima com as células HRS, formando rosetas e expressam CD40L, proteína de membrana responsável por induzir sinais de sobrevivência nas células HRS por meio da via NFκB³⁴. Por outro lado, a célula HRS expressa CD80 e CD86, duas proteínas que estimulam migração de linfócitos T CD4⁺, especialmente devido à interação com o CD28³⁴. A roseta de linfócitos T CD4⁺, além de promover proteção mecânica contra a ação de células T CD8⁺ e células NK, contribuem para um microambiente de supressão inflamatória por meio da secreção de IL-10 e CTLA4, inibidores da atividade dessas células citotóxicas³⁴.

Células HRS, por meio da secreção de citocinas CCL5, CCL17, CCL20 e CCL22 atraem linfócitos T CD4⁺_{reg} para o microambiente tumoral, especialmente os clones CD4⁺CD26⁻ parecem ser atraídos de maneira preferencial pelas células HRS²⁷. A ausência de CD26 na superfície desses linfócitos mantém níveis elevados de CCL5, CCL11 e CCL22 retroalimentando positivamente o ciclo de atração linfocitária por células HRS²⁷. Além disso, células HRS secretam IL-7, capaz de induzir diferenciação de linfócitos T CD4⁺ imaturos em linfócitos T CD4⁺_{reg} FOXP3⁺²⁹, favorecendo respostas Th2²⁷.

As células HRS são capazes de secretar Galectina-1, inibidor da ação de linfócitos T CD8⁺ e responsável pela transição de um microambiente hostil para a célula HRS, composto por células citotóxicas, para um promotor da sobrevivência desse clone neoplásico²⁸. Colaboram para isso outros produtos secretados como TGF-β, MIF e PGE2, todos com atividade anti-inflamatória³⁵.

Células HRS comumente exibem mutações somáticas inativadoras nos genes da β2-microglobulina, proteína responsável pelo transporte da proteína MHC-I para a superfície celular, implicando expressão anômala ou ausente de MHC-I e, por conseguinte, prejuízo à interação células HRS e linfócitos T CD8⁺^{28,36,37}. Soma-se a isso a expressão de CD95L (FasL), CD274 (PD-L1) e

CD273 (PD-L2), indutores de apoptose de linfócitos T citotóxicos e células NK³⁵.

Desse modo, a expressão diferencial de moléculas MHC constitui um fator de proteção às células HRS, pois por expressar menos moléculas MHC-I, essas células escapam dos mecanismos de apoptose induzidas por células T citotóxicas^{28,36,37}. Além disso, ao hiporregular os níveis de MHC classe II, as células HRS passam a não estimular células CD4+ que eventualmente estejam em atividade associada a células T CD8+^{28,36,37}.

2.6.2 Checkpoint imunológico e patogênese dos linfomas de Hodgkin clássicos

Os *checkpoints* imunológicos referem-se a vias inibitórias ligadas ao sistema imunológico que são cruciais para manter a auto-tolerância e modular a duração e a amplitude das respostas imunológicas fisiológicas nos tecidos periféricos, a fim de minimizar o dano tecidual colateral³⁸.

O CTLA-4 é uma proteína homóloga ao CD28 e, quando ativa, compete com o próprio CD28 pelo sítio de ligação das moléculas CD80 e CD86 induzindo sinais de supressão nos linfócitos T³⁶. O gene LAG-3 codifica proteína homônima que provoca supressão dos linfócitos T por meio da ligação ao MHC II, também por competição, agora contra o CD4, com isso há supressão da expansão das células T CD4+^{28,39}.

O receptor tipo *programmed cell death 1* (PD-1) é expresso na superfície de linfócitos T ativados e sua ativação envia sinais de inibição da ativação dos linfócitos T, além de reduzir a produção de citocinas⁴⁰. PD-L1, o ligante predominante para PD-1, é expresso em múltiplos tecidos incluindo células T e B, células dendríticas e macrófagos⁴⁰. PD-L2, que atua de forma semelhante atenuando respostas das células T através da associação ao PD-1 é principalmente expressa em células dendríticas, macrófagos e mastócitos derivados da medula óssea⁴⁰.

A interação PD-1/PD-L1 gera um sinal, via proteína SHP2, para a inibição de sinais de sobrevivência de linfócitos como as vias NFκB e PI3K⁴⁰. A in-

dução da via de sinalização PD-1 pode provocar, nos linfócitos T dois resultados distintos: ou induzir apoptose³⁹ ou um estado de anergia imunológica, via desforilação da proteína ZAP70 e inativação dos sinais de ativação do receptor de células T, permanecendo a célula viva porém incapaz de realizar sua função imunológica de fato³².

A evasão imune mediada por *checkpoint* foi estabelecida como uma característica pivotal da patogênese do linfoma de Hodgkin clássico por meio da identificação de amplificações do *locus* 9p24 resultando na expressão constitutiva de PD-L1 e PD-L2 em mais de 85% dos pacientes com esse linfoma⁴¹. Em uma série de 108 casos de linfoma de Hodgkin clássico, demonstrou-se que em 97% desses linfomas haviam mutações nos *loci* de PD-L1 e PD-L2, incluindo polissomias, ganhos de cópias e amplificações^{28,40}. Mesmo em pacientes sem amplificações genéticas de PD-L1 ou PD-L2, a regulação positiva fisiológica destes ligantes ocorre provavelmente associada a sinalização JAK/STAT, produção de IFN- γ ou, em casos associados a EBV, expressão da proteína LMP1³⁶.

A superexpressão de PD-L1 em células HRS e de PD-1 em linfócitos intratumorais cria um sinal inibitório que ajuda a manter o microambiente imunossupressor do linfoma de Hodgkin⁴¹. Macrófagos tumorais não-neoplásicos também expressam PD-L1 e se correlacionam topograficamente com células HRS PD-L1 positivas gerando uma resposta imunossupressora organizada³⁶.que é estimulada pela produção de interferon- γ , que induz expressão de PD-L1 em macrófagos associados ao tumor e em células estromais circunjacentes, como fibroblastos²⁷.

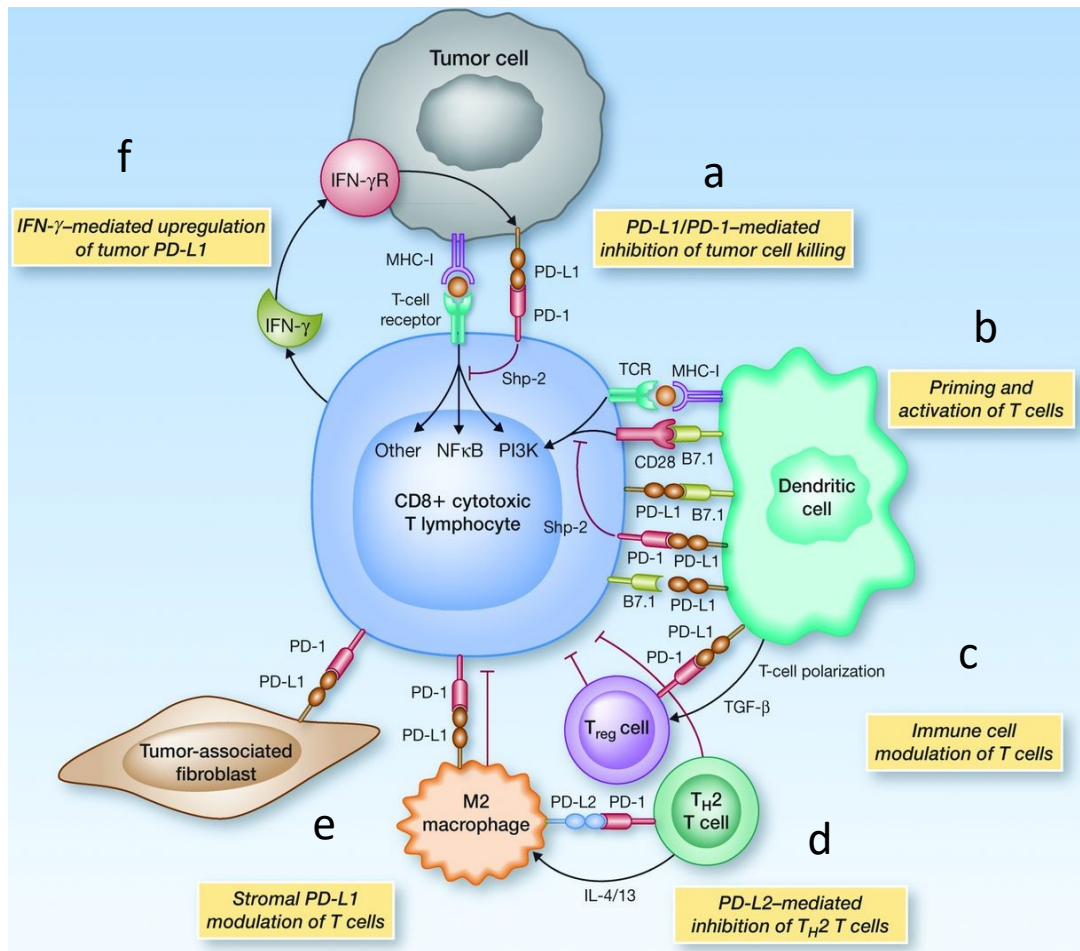


Figura IX: a interação entre um linfócito T, célula tumoral, macrófagos, fibroblastos e células dendríticas. Em a) um linfócito T citotóxico CD8+ tem sua atuação inibida por meio do sistema PD-1/PD-L1. b) O balanço de expressão de moléculas PD-L1 e sinais de sobrevivência via MHC-I por células dendríticas é responsável por diminuir o dano colateral da resposta imunológica. c) Por meio do sistema PD-1/PD-L1 outras células da resposta imunológica modulam a atuação dos linfócitos T. d) A interação PD-1/PD-L2, por outro lado, inibe a atuação dos linfócitos Th2 modulando a resposta imune humoral. e) Fibroblastos tumorais expressam PD-L1 e são capazes de modular a resposta Th1 dos linfócitos T CD8+. f) A célula tumoral é capaz de secretar interferon-gama, que por sua vez hiperregular a expressão de PD-L1 pela própria célula tumoral além de atrair outras células da resposta inflamatória que também expressarão PD-L1. Extraído de CHEN *et al* 2012.

2.7. O microambiente nos linfomas de Hodgkin do tipo predomínio linfocítico-nodular

Diferente do linfoma de Hodgkin clássico, nos LHPLN há um microambiente característico caracterizado pela presença de Linfócitos T CD4+ CD57+, linfócitos T CD4+ PD-1+, assim como linfócitos T CD4+ CD8+³⁷. Os LH clássicos, por sua vez, têm números aumentados de linfócitos T CD4+_{reg} e LTh2. Nos LHPLN, os linfócitos T CD4+ intratumorais são, na maior parte, linfócitos CD26-³⁷. Quando comparado a amostras reacionais nodais, o microambiente dos LHPLN demonstrou um número reduzido de células NK³⁷. LTh_{folicular} (CD4+ PD-1+ ICOS-) foram detectados nas proximidades das células LP, sendo responsáveis pela secreção de IL-21, cujo receptor está regulado para cima nas células LP³⁷. Além disso, linfócitos T efetores de memória (linfócitos Tem), cujo perfil imunistoquímico é caracterizado pela expressão de CD4+ e negatividade para CCR7 e CD45RA, foram detectados em níveis aumentados na região tumoral do LHPLN³⁷. Diferente dos linfomas de Hodgkin clássicos, no LHPLN foram detectados menos linfócitos T CD4+ FOXP3+, sugerindo outro mecanismo de escape imunológico por esta neoplasia³⁷.

3. O sistema de estadiamento dos linfomas de Hodgkin

O estadiamento define a localização e extensão da doença, sugere informações prognósticas, permite comparações entre estudos e fornece uma linha de base contra a qual a resposta ou eventual progressão da doença podem ser comparadas^{43,44}.

O estadiamento dos linfomas de Hodgkin leva em conta critérios clínicos obtidos através de uma propedêutica pormenorizada, associada a avaliações hematológica e bioquímica - incluindo velocidade de hemossedimentação, níveis de fosfatase alcalina sérica, testes de função hepática e renal⁴⁵. Exames de imagem, como tomografia computadorizada (TC) e tomografia por emissão de pósitrons (PET-CT) são indicados para avaliar o comprometimento de cadeias mediastinais assim como envolvimento infradiafragmático e retroperitoneal⁴³.

O sistema atual de estadiamento dos linfomas de Hodgkin⁴³, o sistema de Ann Arbor atualizado pelo Consenso de Lugano, classifica o paciente em quatro estágios de evolução da doença, atribuindo-lhe números correspon-

tes à extensão da doença e letras que indicam a presença ou não de sintomas sistêmicos e massa volumosa tumoral⁴⁶.

O envolvimento da medula óssea é um parâmetro relevante a ser acessado durante a propedêutica de pacientes portadores de linfoma de Hodgkin, pois além de conferir pior prognóstico quando acometida é necessário à composição dos escores prognósticos como o *International Prognostic Score* (IPS)^{43,47,48}

Tabela IV: *Classificação de Ann Harbor com modificações da Conferência de Lugano*

<u>Estágio</u>	<u>Definição</u>
I	Envolvimento de uma única região linfonodal (por exemplo, cervical, axilar, inguinal, mediastinal) ou estrutura linfoide, como o baço, timo ou anel de Waldeyer.
II	Envolvimento de duas ou mais regiões linfonodais ou estruturas linfonodais do mesmo lado do diafragma. Os linfonodos hilares devem ser considerados "lateralizados" e, quando envolvidos em ambos os lados, constituem a doença do estágio II.
III	Envolvimento de regiões de linfonodos ou estruturas linfóides em ambos os lados do diafragma.
IV	Envolvimento difuso de um ou mais órgãos extranodais ou tecido além daquele designado por E**, com ou sem envolvimento linfonodal associado.

*Subclassificam-se os casos em A ou B, indicando presença ou ausência, respectivamente, de sintomas sistêmicos como febre de origem indeterminada, sudorese noturna ou perda de peso inexplicável excedendo 10% do peso corporal durante os seis meses anteriores ao diagnóstico.

**A designação "E" refere-se à extensão extranodal que pode ser contida dentro de um campo de irradiação apropriado para doença nodal da mesma extensão anatômica. Doença extranodal mais extensa é designada estágio IV

***Massa neoplásica volumosa: massa nodal única, em contraste com múltiplos linfonodos menores, medindo 10 cm ou mais do que um terço do diâmetro transtorácico a qualquer nível das vértebras torácicas, conforme determinado por TC

Tabela V: *International Prognostic Score (IPS)**

<u>Idade</u>	<u>Acima dos 45 anos</u>
<u>Albumina sérica</u>	<u>Menor que 4g/dL</u>
<u>Contagem absoluta de leucócitos</u>	<u>Maior que 15.000/mm³</u>
<u>Hemoglobina sérica</u>	<u>Menor que 10.5 g/dL</u>
<u>Contagem absoluta de linfócitos</u>	<u>Menor que 600/mm³ ou Menor que 8% do total de leucócitos</u>
<u>Sexo</u>	<u>Masculino</u>
<u>Estadio</u>	<u>IV</u>

*O *International Prognostic Score (IPS)* tem a finalidade de tentar prever o prognóstico em pacientes com Linfoma Hodgkin avançado, refletido na sobrevida livre de doença em cinco anos. A cada fator prognóstico adverso adicional, a taxa prevista é reduzida em aproximadamente 8%. A pontuação foi desenvolvida e validada com base em um conjunto de pacientes em tratamento na década de 1980 com regimes incluindo ABVD, MOPP e ABVD e regimes híbridos.

3.1 O papel da biópsia da medula óssea no estadiamento dos linfomas de Hodgkin

O comprometimento histológico da medula óssea é considerado prova definitiva do envolvimento desse órgão por uma neoplasia⁴⁷. Entretanto é um procedimento desconfortável, a despeito do uso de anestésicos locais⁴⁸. A biópsia bilateral da medula óssea é superior à unilateral em termos de capacidade diagnóstica⁴⁹, pois quanto mais bem amostrada a medula for, maiores as chances de se detectar a célula diagnóstica⁵⁰.

Antes do estabelecimento do *Positron emission tomography* (PET-CT) com 18F-Fluorodesoxiglicose (18F-FDG) como técnica padrão para avaliação da medula óssea⁴³, a biópsia de medula óssea era utilizada como abordagem primária e, em locais de recursos limitados, a biópsia de medula óssea ainda guarda importância na composição do prognóstico de um paciente com linfoma de Hodgkin⁵¹. Contudo, desde a difusão da técnica de PET-CT com 18F-Fluorodesoxiglicose, tem se discutido o papel e a necessidade da biópsia de medula óssea no contexto do linfoma de Hodgkin^{43,44,47,50,51}.

3.2 O papel do PET-CT com 18F-Fluorodesoxiglicose no estadiamento dos linfomas de Hodgkin

PET é uma técnica de detecção de traçadores radioativos capaz de analisar a perfusão e atividade metabólica tissular⁵². Essa tecnologia se baseia na administração de compostos capazes de emitir pósitrons espontaneamente e que se incorporam ao metabolismo celular de maneira semelhante a sua contraparte não-radioativa⁵². Um desses marcadores é a 18F-fluorodesoxiglicose (18F-FDG), um análogo da glicose que é incorporado ao metabolismo celular de maneira semelhante e permite acompanhar a atividade metabólica da célula em função do seu decaimento⁵².

Uma das premissas que permitiram a disseminação da técnica de PET-CT com elementos radiomarcados como a 18F-FDG é o Efeito Warburg^{53,54}. Esse fenômeno postula que as células neoplásicas desviam suas vias metabólicas em favor da glicólise a despeito da presença de oxigênio e mitocôndrias funcionantes, um processo intitulado glicólise aeróbica⁵⁵. Entende-se que o benefício para o clone neo-

plásico desse desvio metabólico está na possibilidade de sintetizar mais rapidamente equivalentes redutores e, por fim, utilizá-los em reações de biossíntese redutora para produzir, por exemplo, lipídios⁵⁶, além de reduzir o pH do microambiente tumoral, colaborando para o aumento da capacidade de invasão do clone tumoral e limitando a quantidade disponível de glicose para os linfócitos intratumorais, prejudicando a atuação destas células⁵⁵.

A glicólise aeróbica aumenta a avidéz do clone neoplásico à glicose, que é assimilada rapidamente e, portanto, permite detecção do índice de captação, quando marcada com radioisótopo apropriado^{57,58,59}. A pesquisa com 18F-FDG PET-CT permite uma avaliação da incorporação do radioisótopo ao ambiente celular de maneira global e, além disso, é capaz de captar as variações em estágios iniciais do tratamento, permitindo um ajuste fino da conduta nos casos refratários^{57,58,59}.

Outra premissa que dá suporte ao uso do 18F-FDG PET-CT como método de estadiamento é a expressão aumentada de proteínas do tipo GLUT e hexoquinases por células neoplásicas, que pode também ser detectada em alguns tecidos em condições fisiológicas, como cérebro, estômago e coração⁶⁰. Isso permite maior influxo desse marcador e, por conseguinte, melhor contraste entre tecidos com alta captação e baixa captação⁶⁰. Em células HRS há expressão de GLUT-1 e cadeia A da enzima Lactato Desidrogenase (LDHA), indicando glicólise aeróbica, contudo não houve correlação entre a expressão desses marcadores e os achados de 18F-FDG PET-CT⁶⁰

A possibilidade de avaliação global da medula óssea, a não-invasividade do procedimento e suas elevadas sensibilidade e especificidade colocam a 18F-FDG PET-CT a frente da biópsia de medula óssea para fins de estadiamento^{43,47}. Entretanto alguns serviços não dispõem dessa técnica, mantendo a biópsia de medula óssea no rol dos procedimentos diagnósticos dos pacientes com linfoma de Hodgkin^{60,61}

Em pacientes cujas informações diagnósticas necessárias ao estadiamento foram obtidas por meio de 18F-FDG PET-CT, considera-se acometido por linfoma todo aumento da captação da 18F-FDG quando comparado ao *pool* sanguíneo mediastinal e hepático⁴³, segundo escore de Deauville^{43,63,64}.

A preferência pela avaliação por meio do 18F-FDG PET-CT se sustenta nas premissas de que pacientes em estágio inicial do linfoma de Hodgkin raramente exibem comprometimento da medula óssea na ausência de achados anormais ao 18F-FDG PET-CT e pacientes em estágios mais avançados costumam, além do comprometimento da medula óssea, exibir sintomatologia sistêmica condizente com o estágio, não sendo necessária biópsia desse sítio na disponibilidade de realização de 18F-FDG PET-CT⁴³. (tabela 7)

3.3 O padrão histopatológico de acometimento da medula óssea pelo linfoma de Hodgkin

A presença de células HRS, sejam uni ou binucleadas, é mandatória para firmar a presença de infiltração neoplásica da medula óssea por linfoma de Hodgkin⁶⁵, contudo, alguns padrões histológicos são sugestivos mesmo na ausência dessas células. A presença de histiócitos atípicos é sugestiva de infiltração da medula óssea, assim como a presença de necrose ou fibrose⁶⁵. Além disso, células HRS quase nunca são detectadas na ausência do microambiente inflamatório característico⁶⁵.

O padrão de infiltração da medula óssea pode ser focal ou difuso⁶⁵. Na maior parte dos casos o padrão difuso está presente, substituindo o componente hemato-poietico das trabéculas ósseas por um infiltrado inflamatório misto⁶⁵. Quando focal, o comprometimento pode ser na forma de nódulo ou placas que se mostram circundadas por tecido mielóide sem particularidades⁶⁵.

Quando o padrão de acometimento exibe de maneira inequívoca a célula HRS em meio ao microambiente inflamatório típico, recomenda-se chamar de infiltração por linfoma de Hodgkin⁶⁶. Já quando há histiócitos atípicos em meio ao microambiente associado à célula HRS, mas não se pode a identificar de maneira inequívoca, é preferível se referir aos achados como sendo sugestivos de infiltração por linfoma de Hodgkin⁶⁶.

4. Justificativa

A avaliação da medula óssea nos pacientes com diagnóstico linfoma de Hodgkin ainda é realizada, especialmente em locais que não dispõem do PET-CT.

Trata-se de um procedimento que oferece poucos riscos ao paciente, contudo é desconfortável e oferece custos aos sistemas de saúde.

A análise desse material inclui, basicamente, aspectos citológicos e morfológicos avaliados, respectivamente, pelo mielograma e biópsia de medula óssea. A infiltração da medula óssea pelo linfoma de Hodgkin é infrequente, mas, quando encontrada, acredita-se representar marcador de mau prognóstico.

Na literatura, existem discussões sobre a necessidade desse procedimento em vista da baixa taxa de detecção e da existência de outros fatores clínicos-laboratoriais que possam ser usados no estabelecimento do prognóstico desses doentes. O presente estudo se justifica por investigar a utilização da ferramenta da imunoistoquímica na tentativa de ampliar a capacidade de detecção da avaliação morfológica das biópsias, além estudar o impacto desse diagnóstico na evolução clínica desses pacientes.

Ressalta-se o papel inovador do estudo, pois contribuirá para a literatura com possíveis implicações para pacientes, por ser um procedimento doloroso, para o sistema, devido aos custos dessas biópsias, e para equipe médica, pelas questões relativas a precisão do diagnóstico, evolução e tratamento.

5. Objetivos

5.1 Objetivo geral:

Avaliar a infiltração da medula óssea em portadores de LH por meio de análises citológica, morfológica e imunofenotípica.

5.2 Objetivos específicos:

- a) Descrever os padrões medulares no contexto do linfoma de Hodgkin, independentemente da detecção de células neoplásicas.
- b) Avaliar as amostras de medula óssea por meio de estudo imunoistoquímico, estudando-se possível ampliação no poder diagnóstico da análise cito-morfológica.

- c) Avaliar quais padrões histológicos da medula óssea estão associados a presença de células CD30 positivas
- d) Correlacionar os padrões histológicos entre si de modo a buscar aumentar a eficácia da detecção de infiltração por linfoma de Hodgkin à histologia convencional

Referências

1. Jaffe ES, Campo E, Harris NL, Pileri SA, Stein H & Swerdlow SH. Introduction and overview of the classification of lymphoid neoplasms. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (revised 4th edition). Lyon: IARC, 2017. p.190-98
2. Pittaluga S, Barry TS & Raffeld M. Immunohistochemistry for the hematopathology laboratory. In: Jaffe ES, Arber DA, Campo E, Harris NL, Quintanilla-Martinez L. Hematopathology. Philadelphia: Elsevier, 2017. p.41-52
3. Campo E, Jaffe ES & Harris NL. Normal lymphoid organs and tissues. . In: Jaffe ES, Arber DA, Campo E, Harris NL, Quintanilla-Martinez L. Hematopathology. Philadelphia: Elsevier, 2017. p.131-52
4. 10. Kumar V, Abbas AK, Fausto N e Jon C. Robbins e Cotran, bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. Cap.13, doenças dos leucócitos, linfonodos, baço e timo. p.597-646
5. Aster JC et al. Normal B and T lymphocyte development. Uptodate. Acessado em 14 de março de 2019, disponível online: <https://www.uptodate.com/contents/normal-b-and-t-lymphocyte-development#h1596063853>
6. Stone MJ. Thomas Hodgkin: medical immortal and uncompromising idealist. Proc (Bayl Univ Med Cent). 2005 Oct; 18(4): 368–375
7. van der Valk P & Meijer CJLM. The lymph nodes. In: Mills SE. Histology for pathologists 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia: 2012. p.819-34
8. Basso K & Dalla-Favera R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. Nat Rev Immunol. 2015 Mar;15(3):172-84
9. Stone MJ. Thomas Hodgkin: medical immortal and uncompromising idealist. Proc (Bayl Univ Med Cent). 2005 Oct; 18(4): 368–375
10. Reed DM. On the pathological changes in Hodgkin's disease, with special reference to its relation to tuberculosis. Baltimore: Johns Hopkins Hosp Rep.1902 (vol. 10 p.133– 196)
11. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program [Internet]. Bethesda(MD): National Institutes of Health: Division of Cancer Control and Population Sciences (US); citado em 2019 Apr 27. Cancer Stat Facts: Hodgkin Lymphoma; [about 11p.]. Disponível em: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/hodg.html>

12. Press OW. Hodgkin lymphoma. In: Kaushansky K, Lichtman MA, Prchal JT, Levi MM, Press OW, Burns LJ et al. Williams Hematology 9th ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2016. p.1603-23
13. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva: Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2017
14. Stein H, Pileri SA, Weiss LM, Poppema S, Gascoyne RD & Jaffe ES. Hodgkin lymphomas introduction. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (revised 4th edition). Lyon: IARC, 2017. p.424-30
15. Küppers R. The biology of Hodgkin's Lymphoma. Nat Rev Cancer. 2009 Jan;9(1):15-2
16. Küppers R, Rajewsky K, Zhao M, Simons G, Laumann R, Fisher R et al. Hodgkin Disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. Proc Natl Acad Sci USA. 1994 Nov 8; 91(23): 10962–10966
17. Re D, Thomas RK, Behringer K & Diehl V. From Hodgkin disease to Hodgkin lymphoma : biologic insights and therapeutic potential. Blood. 2005 Jun; 105:4553-4560
18. Mathas S, Hartmann S & Küppers R. Hodgkin lymphoma: pathology and biology. Semin Hematol. 2016 Jul;53(3):139-47
19. Rengstl B, Newrzela S, Heinrich T, Weiser C, Thalemeier FB, Schmid F et al. Incomplete cytokinesis and re-fusion of small mononucleated Hodgkin cells lead to giant multinucleated Reed–Sternberg cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2013 Dec 17;110(51):20729-34. doi: 10.1073/pnas.1312509110. Epub 2013 Dec 3
20. Gopas J, Stern E, Zurgil U, Ozer J, Ben-Ari A, Shubinsky G et al. Reed-sternberg cells in hodgkin's lymphoma present features of cellular senescence. Cell Death Dis. 2016 Nov 10;7(11):e2457
21. Stein H, Swerdlow SH, Gascoyne RD, Poppema S, Jaffe ES & Pileri SA. Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (revised 4th edition). Lyon: IARC, 2017. p.431-34
22. Bhargava P & Kadin ME. Immunohistology of Hodgkin lymphoma. In: Dabbs DJ. Diagnostic Immunohistochemistry, theranostic and Genomic Applications. Philadelphia: Elsevier, 2018. p.130-47

23. Walport M, Murphy K, Janeway C & Travers PJ. Janeway's Immunobiology 7th Ed. New York: Garland Science, 2007. Chap 8, The development of B and T lymphocytes. p.295-343
24. Hartmann S, Martin-Subero JI, Gesk S, Hüsken J, Giefing M, Nagel I et al. Detection Of Genomic Imbalances in Microdissected Hodgkin and Reed-Sternberg Cells of Classical Hodgkin's Lymphoma by Array-Based Comparative Genomic Hybridization. *Haematologica*. 2008 Sep;93(9):1318-26
25. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP et al. Molecular Cell Biology 5th ed. New York: W.H. Freeman & Co. 2003. Chap.14 Signaling pathways that control gene activity. p.571-610
26. Vrzalikova K, Ibrahim M, Nagy E, Vockerodt M, Perry T, Wei W et al. Co-Expression of the Epstein-Barr Virus-Encoded Latent Membrane Proteins and the Pathogenesis of Classic Hodgkin Lymphoma. *Cancers (Basel)*. 2018 Sep; 10(9): 285
27. Steidl C, Connors JM & Gascoyne RD. Molecular Pathogenesis of Hodgkin's Lymphoma: Increasing Evidence of the Importance of the Microenvironment. *J Clin Oncol*. 2011 May 10;29(14):1812-26
28. Liu RW & Shipp RA. Signaling pathways and immune evasion mechanisms in classical hodgkin lymphoma. *Blood*. 2017 Nov 23;130(21):2265-2270
29. Stanfield BA & Luftig MA. Recent advances in understanding Epstein-Barr virus [version 1; referees: 4 approved] *F1000Research* 2017, (F1000 Faculty Rev):386
30. Germi R, Effatin G, Laurence G, Ruigrok RWH, Morand P & Schoen G. Three Dimensional structure of the Epstein-Barr virus capsid. *J Gen Virol*. 2012 Aug;93(Pt 8):1769-73
31. Sullivan JL & Luzuriaga K. Virology Of Epstein-Barr Virus. Uptodate. Waltham, Ma: UpToDate Inc. Disponível online em <https://www.uptodate.com> (acessado em 21 de março de 2019.)
32. Bornkamm GW & Hammerschmidt W. Molecular virology of Epstein-Barr virus. *Phil.Trans. R. Soc. Lond. B*, 2001. 356, 437-459
33. Matsuura H, Kirschner AN, Longnecker R & Jardetzky TS. Crystal structure of the Epstein-Barr virus (EBV) glycoprotein H/glycoprotein L (gH/gL) complex. 107(52), 22641–22646. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 Dec 28;107(52):22641-6
34. Wein F & Küppers R. The role of T cells in the microenvironment of Hodgkin lymphoma. *J Leukoc Biol*. 2016 Jan;99(1):45-50

35. Dörsam B, Bösl T, Reiners KS, Barnert S, Schubert R, Shatnyeva O et al. Hodgkin lymphoma-derived extracellular vesicles change the secretome of fibroblasts toward a CAF phenotype. *Front Immunol*. 2018 Jun 18;9:1358
36. Vardhana S & Younes A. The immune microenvironment in Hodgkin lymphoma: T cells, B cells, and immune checkpoints. *Haematologica*. 2016 Jul;101(7):794-802
37. Carey CD, Gusenleitner D, Lipschitz M, Roemer MGM, Stack EC, Gjini E et al. Topological analysis reveals a PD-L1-associated microenvironmental niche for Reed-Sternberg cells in Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2017 Nov 30;130(22):2420-2430
38. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012 Apr; 12(4): 252–264
39. Huard B, Tournier M, Hercend T, Triebel F, and Faure F. Lymphocyte-activation gene 3/major histocompatibility complex class II interaction modulates the antigenic response of CD4+ T lymphocytes. *European journal of immunology*. 1994;24(12):3216-21.
40. Chen DS, Irving BA & Hodi FS. Molecular Pathways: Next-Generation Immunotherapy—Inhibiting Programmed Death-Ligand 1 and Programmed Death-1. *Clin Cancer Res*. 2012 Dec 15;18(24):6580-7
41. Lin RJ & Diefenbach CS. Checkpoint Inhibition in Hodgkin Lymphoma: Saving the Best for Last? *Oncology (Williston Park)*. 30(10):914–920
42. Visser L, Wu R, Rutgers B, Diepstra A & van den Berg A. Characterization of the microenvironment of nodular lymphocyte predominant hodgkin lymphoma. *Int J Mol Sci*. 2016 Dec; 17(12): 212
43. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol*. 2014 Sep 20; 32(27): 3059–3067
44. Zelenetz AD, Jaffe ES, Advani RH, Harris NL, Hoppe RT, Link MP et al. Hodgkin and Non-Hodgkin lymphomas. In: Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK et al. (Eds.). *AJCC Cancer Staging Manual 8th edition*. New York: Springer; 2017. p. 937-58
45. Gobbi PG, Ferreri AJ, Ponzoni M & Levis A. Hodgkin lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013 Feb;85(2):216-37
46. Canellos GP. Staging and prognosis in Hodgkin lymphoma. In J. A. Melin (Ed.), *UpToDate*. Acessado em março de 2019, disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/staging-and-prognosis-of-hodgkin-lymphoma?search=hodgkin%20linfoma&topicref=4688&source=see_link>

47. Adams HJ, Nievelstein RA, Kwee TC. Opportunities and limitations of bone marrow biopsy and bone marrow FDG-PET in lymphoma. *Blood Rev.* 2015 Nov;29(6):417-25
48. Liden Y, Landgren O, Arner S, Sjölund KF & Johansson E. Procedure-related pain among adult patients with hematologic malignancies. *Acta Anaesthesiol Scand* 2009;53: 354–363
49. Wang J, Weiss LM, Chang KL, Slovak ML, Gaal K, Forman SJ & Arber DA. Diagnostic utility of bilateral bone marrow examination: significance of morphologic and ancillary technique study in malignant. *Cancer* 2002; 94:1522-1531
50. Levis A, Pietrasanta D, Godio L, Vitolo U, Ciravegna G, Di Vito F et al. A large-scale study of bone marrow involvement in patients with Hodgkin's lymphoma. *Clin Lymphoma.* 2004 Jun;5(1):50-5
51. Lee SH, Erber WN, Porwit A, Tomonaga M & Peterson LC; International Council for Standardization In Hematology. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. *Int. Jnl. Lab. Hem.* 2008;30, 349–364
52. Ministério da Saúde. Relatório de Recomendação da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC) 108: PET-CT no estadiamento e avaliação da resposta ao tratamento dos linfomas. Brasília, 2014.
53. Warburg O, Wind F & Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol.* 1927 Mar 7;8(6):519-30
54. Cori CA & Cori GT. The carbohydrate metabolism of tumours. *J. Biol. Chem.* 1925 May 65, 397–405
55. Liberti MV & Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci.* 2016 March ; 41(3): 211–218.
56. Adams HJA & Kwee TC. Controversies on the prognostic value of interim FDG-PET in advanced-stage Hodgkin lymphoma. *Eur J Haematol.* (2016) Dec;97(6):491-498. doi: 10.1111/ejh.12791
57. Southwest Oncology Group, Cancer and Leukemia Group B/Alliance, Eastern Cooperative Oncology Group & AIDS Malignancy Consortium. US Intergroup Trial of Response-Adapted Therapy for Stage III to IV Hodgkin Lymphoma Using Early Interim Fluorodeoxyglucose-Positron Emission Tomography Imaging: Southwest Oncology Group S0816. *J Clin Oncol.* 2016 Jun 10;34(17):2020-7
58. Johnson P, Federico M, Kirkwood A, Fossa A, Berkahn L, Carella A et al. Adapted Treatment Guided by Interim PET-CT Scan in Advanced Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med.* 2016 Jun 23; p.374-25

59. D'Amico A. Review of clinical practice utility of positron emission tomography with 18F-fluorodeoxyglucose in assessing tumour response to therapy. *Radiol med* (2015) 120:345–351
60. Potter M, Newport E & Morten KJ. The Warburg effect: 80 years on. *Biochem Soc Trans*. 2016 Oct 15; 44(5): 1499–1505
61. Caetano R, Schluckebier LF, Bastos RCG, da Silva RM, Carneiro MP, da Silva JWE et al. Análise dos custos do procedimento PET-TC com 18F-FDG na perspectiva do SUS provedor: estudo em uma unidade pública de saúde do rio de janeiro, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 30(2):379-392, fev, 2014
62. Robilotta CC. A tomografia por emissão de pósitrons: uma nova modalidade na medicina nuclear brasileira. *Rev Panam Salud Publica* 20(2/3), 2006
63. Barrington SF, Mikhaeel NG, Kostakoglu L, Meignan M, Hutchings M & Müller SP. Role of Imaging in the Staging and Response Assessment of Lymphoma: Consensus of the International Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group. *J Clin Oncol*. 2014 Sep 20; 32(27): 3048–3058
64. Hoppe RT, Advani RH, Ai WZ, Ambinder RF, Aoun P, Bello CM et al. Hodgkin Lymphoma Version 1.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017 May;15(5):608-638
65. Franco V, Tripodo C, Rizzo A, Stella M & Florena AD. Bone marrow biopsy in Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol* 2004; 73: 149–155
66. Rappaport H, Berard CW, Butler JJ, Dorfman RF, Lukes RJ, Thomas LB. Report of the committee on histopathological criteria contributing to staging of Hodgkin's disease. *Cancer Res* 1971;31:1864–1865

Capítulo II

Artigo

Título

Medula óssea no linfoma de Hodgkin: a imunoistoquímica amplia o diagnóstico de infiltração neoplásica?

Autores:

Rodrigo Tavares Macedo

MD. Médico patologista, aluno de pós-graduação do programa de Pós-Graduação em Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Universidade Estadual Paulista (UNESP). Patologista do Instituto de Anatomia Patológica - IAP. Santa Bárbara D'Oeste, São Paulo, Brasil. E-mail: rodrigotmacedo@gmail.com

Rafael Dezen Gaiolla

MD. PhD. Médico hematologista Serviço de Quimioterapia e disciplina de Hematologia, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Universidade Estadual Paulista (UNESP). Botucatu, São Paulo, Brasil. E-mail: rdgaiolla@gmail.com

Ligia Niero-Mello

MD. PhD. Professora e médica hematologista. Disciplina de Hematologia, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Universidade Estadual Paulista (UNESP). Botucatu, São Paulo, Brasil. E-mail: ligia.niero@unesp.br

Maria Aparecida Custódio Domingues

MD. PhD. Professora e médica patologista. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Universidade Estadual Paulista (UNESP). Botucatu, São Paulo, Brasil. E-mail: maria.domingues@unesp.br

Cristiano Claudino Oliveira

MD. PhD. Médico patologista. Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) e Departamento de Anatomia Patológica do Hospital São Luiz/D'Or. São Paulo/SP, Brasil. E-mail: cristiano_c_oliveira@hotmail.com.

Endereço de correspondência:

Rodrigo Tavares Macedo

Rua bancário Amaury de Souza Nº93 João Pessoa, Paraíba, Brasil. CEP 58051-380.

Resumo

Background: O estadiamento de pacientes com linfoma de Hodgkin inclui avaliação da medula óssea (MO). No caso da análise da MO por meio de material obtido na biópsia, buscam-se células de padrão Hodgkin-Reed-Sternberg em meio a fundo reacional. O presente estudo avaliou a utilização da imunoistoquímica como ferramenta para ampliar o poder de detecção da infiltração nas amostragens de MO.

Material e métodos: Foram selecionados 68 pacientes com diagnóstico de linfoma de Hodgkin entre 1998 e 2017, que tiveram seus prontuários médicos revisados e suas de biópsias e/ou aspirados de medula óssea revistos morfológicamente. Estudo de imunoistoquímica com CD30 e CD15 foram realizados. Os dados tabulados O valor de p considerado significativo foi quando menor que 0,05. Resultados. Hiper-celularidade ($n=33$, $p=0,019$), plasmocitose ($n=23$, $p=0,009$), aumento de reticulina ($n=14$, $p=0,002$), granulomas ($n=5$, $p=0,000$) e histiocitose ($n=31$, $p=0,001$) foram os parâmetros que tiveram melhor associação com a detecção de infiltração neoplásica pela imunoistoquímica. O marcador CD30 foi mais útil para utilização do que o CD15.

Conclusão: A utilização do CD30 amplia a precisão do diagnóstico de infiltração e o aumento da reticulina, a plasmocitose, a histiocitose e a presença de granulomas na medula óssea representam fatores indicativos da necessidade de complementação da avaliação morfológica com a técnica imunoistoquímica.

Palavras-chave

1. Hodgkin, Doença de. 2. Linfoma. 3. Medula óssea. 4. Estadiamento de neoplasias.

Abstract

Hodgkin's lymphomas are malignancies characterized by the presence of scant Hodgkin-Reed-Sternberg cells or, in lymphocytic nodular variants, by lymphocytic-predominant cells among a robust inflammatory infiltrate composed of lymphocytes, plasma cells, histiocytes and eosinophils. In order to increase the detection of bone marrow infiltration by morphological evaluation of its biopsy, immunohistochemical markers such as CD30 and CD15 are often used. The present study aims to evaluate the importance of these markers in the detection of staging related bone marrow infiltration by Hodgkin's lymphoma.

In total, 68 patients with a diagnosis of Hodgkin lymphoma between 1998 and 2017 were selected which had their biopsy slides and / or bone marrow aspirates reviewed. Immunohistochemical reactions were performed with the CD30 and CD15 markers. Histological variables analysed comprises the plasmacytosis, eosinophilia, reticulin fibers thickness increase, histiocytosis and granulomatous reaction pattern. Comparisons between frequencies of histological and clinical variables were performed using the Chi-Square Test and Fisher's Exact Test, when appropriate. The p value considered significant was below 0.05.

Among the histological parameters evaluated, hypercellularity ($n = 33$, $p = 0.019$), plasmacytosis ($n = 23$, $p = 0.009$), reticulin increase ($n = 14$, $p = 0.002$), granulomas and histiocytosis ($n = 31$, $p = 0.001$) showed a statistically significant correlation ($p < 0.05$) with infiltration confirmed by immunohistochemistry (CD30 positive cells).

The findings of plasmacytosis, histiocytosis and presence of granulomas in the bone marrow affected by Hodgkin's lymphoma correlate in a statistically significant way with the presence of CD30 positive cells. The presence of increased reticulum is also correlated with the presence of neoplastic cells in the bone marrow. This highlights the importance of the microenvironment in this neoplasia and how it can help distinguish a high risk biopsy from a low risk one.

Key-words (MeSH): Hodgkin Disease, Lymphoma, Bone Marrow, Neoplasm Staging

*Based on submission guidelines of Diagnostic Pathology Journal, available online: <https://diagnosticpathology.biomedcentral.com/submission-guidelines> (accessed on may 13th of 2019)

Background

Linfomas de Hodgkin (LH) são neoplasias clonais caracterizadas pela presença de células de Hodgkin-Reed-Sternberg (HRS) ou, nas variantes predomínio linfocítico nodular, por células linfocítico-predominantes (LP)¹ em meio a robusto infiltrado inflamatório composto por linfócitos, plasmócitos, histiócitos e eosinófilos¹. Seu estadiamento envolve determinar quais cadeias nodais estão acometidas, sua relação com o diafragma, se há ou não presença de lesão volumosa "*bulky disease*" e que outros órgãos exibem comprometimento, como o fígado, baço e medula óssea (MO)^{1,4}. O acometimento da MO por linfoma de Hodgkin confere prognóstico mais reservado e classifica o paciente em estágio IV^{1,4}.

Segundo o Consenso de Lugano⁴, o método de escolha para a avaliação da medula óssea tem é o exame de *positron emission tomography with 2-deoxy-2-[fluorine-18]fluoro- D-glucose integrated with computed tomography* (18F-FDG PET-CT),⁴. Entretanto, a biópsia de medula óssea pode representar o único recurso disponível para estadiamento⁶, seja por questões relativas à custo ou logística, ou mesmo pode representar uma indicação clínica em situações específicas. A sensibilidade, a especificidade e o valor preditivo negativo da avaliação da MO por meio da biópsia são inferiores em relação à técnica de medicina nuclear, impondo-se um desafio aos patologistas durante a tarefa diagnóstica^{4,8}.

A utilização de marcadores imunoistoquímicos, como CD30 e CD15, são discutidas como possibilidades técnicas a fim de se aumentar a detecção de infiltração.

O presente estudo avaliou a estadiamento, buscando-se caracterizar a histopatologia medular e associar os elementos descritos com os resultados da imunoistoquímica. .

Metodologia

Estudo retrospectivo transversal com pacientes com diagnóstico de LH submetidos a biópsia e/ou aspirado de medula óssea para estadiamento entre os anos de 1998 e 2017.

Foram selecionados, inicialmente 72 pacientes com diagnóstico anatomopatológico de linfoma de Hodgkin, nodal ou extranodal, independentemente do subtipo e que possuíam seguimento clínico pela disciplina de Hematologia do Departamento de Clínica Médica no complexo Hospital das Clínicas e Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB-UNESP). Esses pacientes foram selecionados a partir dos laudos anatomopatológicos, pesquisados no sistema de arquivos do Departamento de Patologia do HC-FMB-UNESP. Os pacientes selecionados precisavam ter os materiais das biópsias e/ou aspirados de MO disponíveis no Departamento de Patologia do HC-FMB-UNESP em condições satisfatórias para análise morfológica e realização de estudo imunoistoquímico. Diante disso, quatro pacientes foram excluídos do estudo, culminando em amostragem final de 68 pacientes. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do HC-FMB-UNESP sob número 83424718.4.0000.5411.

Os prontuários foram revisados e informações clínicas foram coletados em formulário específico contendo informações quanto ao sexo, idade no momento do diagnóstico, presença de sintomas “B”, terapêutica adotada, estadiamento e presença ou não de infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). Os pacientes selecionados tiveram suas lâminas de biópsias e/ou coágulos de aspirados de medula óssea revisadas por patologistas com experiência em Hematopatologia. Além da coloração histológica convencional por hematoxilina-eosina, foram aliadas seções coradas por técnicas de Perls e reticulina.

Após serem consideradas representativas, foram avaliados os seguintes itens: 1) presença de hipercelularidade, definida como celularidade global acima do limite superior para a idade segundo a relação 100-idade do paciente; 2) contagem de eosinófilos, definida como o número de eosinófilos em um campo de grande aumento que contém a maior densidade dessas células (*hotspot*); 3) linfocitose intersticial, definida pelo aumento do número de linfócitos não-neoplásicos nas zonas intersticiais; 4) acúmulos linfóides, definidos por acúmulos de linfócitos com ou sem centro germinativo nas áreas não-infiltradas da medula óssea ou coágulo de medula óssea; 5) plasmocitose, definida como contagem plasmocitária acima de 1% do valor relativo, quando comparado ao volume celular total; 6) hiperplasia megacariocítica, definida como acúmulos de megacariócitos acima de 15 células/mm², na zona de maior acúmulo megacariocitário; 7) status da trama reticulínica, definida como a presença de bandas de reticulina, à coloração homônima, e considerada aumentada quando maior que NF2; 8) presença ou ausência de granulomas, definidos como acúmulos de linfócitos, histiócitos e outras células inflamatórias em padrão granulomatoso com ou sem células gigantes multinucleadas; 9) histiocitose, definida como aumento no número de histiócitos no interstício não-infiltrado; 10) ectasia vascular, definida como aumento do calibre dos vasos sangüíneos acima de 1,5 vezes o tamanho normal. À avaliação por hematoxilina-eosina, determinou-se, baseado nos critérios acima, se a medula era suspeita para infiltração ou não.

As reações de imunoistoquímica foram realizadas no Departamento de Patologia do HC-FMB-UNESP conforme protocolo do serviço, que envolve desparafinização em xilol, passagem em etanol absoluto e hidratação, seguido por bloqueio da peroxidase endógena em água oxigenada 3% e recuperação antigênica em citrato de sódio 0,21% pH 6.0 em câmara de pressão. Em seguida é realizada a incubação

com os anticorpos primários e posteriormente com os anticorpos secundários (Anti-Mouse/Anti-Rabbit), utilizando-se o método de detecção por polímeros. Por fim, é realizada a revelação com o cromógeno 3,3-diaminobenzidina, contra-coloração com hematoxilina de Harris e desidratação em etanol, diafanização em xilol e montagem em resina sintética.

Os marcadores utilizados foram CD30 (Ber-H2, Dako, 0.0015Mol/L) e CD15 (Carb-3, Dako, 0.0015Mol/L), que foram aplicados à amostra mais suspeita do ponto de vista morfológico dos casos em que foi realizado o procedimento de amostragem bi-crista ilíaca, ou à amostra única de biópsia de medula óssea ou, nos casos sem biópsia de medula óssea, o estudo imunoistoquímico foi aplicado ao coágulo parafinizado de medula óssea.

Foi realizada avaliação descritiva dos dados morfológicos, imunoistoquímicos e clínicos. As variáveis quantitativas foram tabuladas e analisadas pelo seu percentual. As comparações entre as frequências das variáveis histológicas e clínicas foram realizadas com testes paramétricos e não paramétricos, quando apropriados. O valor de p considerado significativo foi quando menor que 0,05. Para os testes diagnósticos, calcularam-se a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, acurácia e razão de probabilidade, quando apropriados. Os dados foram analisados usando o SPSS para Windows, versão 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

Resultados

Dos 68 pacientes com avaliação de MO para estadiamento, 32 (47,4%) eram mulheres. O total de coágulos de medula óssea foi de 2 casos (2,9%) enquanto que as biópsias totalizaram 66 casos (97,1%). Em relação aos subtipos dos linfomas de Hodgkin, com exceção de um (1,5%) todos eram clássicos, sendo que 49 (72%)

eram esclerose nodular, sete (10,2%) eram celularidade mista, 2 (2,9%) eram rico em linfócitos, 1 (1,5%) era depleção linfocitária e sete (11,9%) eram clássicos indeterminados. Oito casos (11,8%) demonstraram infiltração da medula óssea confirmada por imunomarcção positiva para CD30, sendo que, em dois casos (2,9%) houve imunomarcção positiva concomitante para CD15. A presença de células CD30, nesses contextos, são confirmatórios da infiltração neoplásica por LH. Sete pacientes (10,3%) que foram positivos para a infiltração na avaliação imunoistoquímica, não teriam sido assim classificados somente com a avaliação morfológica realizada na revisão das lâminas durante o estudo.

Considerando os estadiamentos prévios dos pacientes, contidos nos laudos e prontuários médicos, oito pacientes modificariam seu estágio com a realização da imunoistoquímica, sendo que sete reduziriam seu nível e um elevaria seu nível.

A tabela I exibe a análise do poder diagnóstico da avaliação morfológica, considerando a imunoistoquímica como o teste padrão-ouro. Observam-se sensibilidade e valor preditivo negativo elevados, alcançando 100%. O índice *kappa* de 0,64 evidencia uma boa concordância.

Dos parâmetros histológicos avaliados (tabela II), hipercelularidade (n=7; 87,5%, $p=0,022$), aumento de reticulina (n=5; 62,5%, $p=0,0072$), granulomas (n=5; 62,5%, $p<0,001$) e histiocitose (n=8; 100% $p=0,001$) demonstraram associação estatisticamente significativa com infiltração neoplásica confirmada por imunoistoquímica. Não foi detectada associação estatisticamente significativa entre parâmetros clínicos (tabela II) como a presença de sintomas "B" e infiltração da medula óssea confirmada por estudo imunoistoquímico (n=7; 87,5%, $p=0,168$), assim como não

houve entre óbito e infiltração ($n=2$; 25%, $p=0,110$) e infecção por vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) e infiltração da medula ($n=1$; 12,5%, $p=0,233$).

O achado de granulomas na medula óssea está associado a uma sensibilidade de 62,5%, especificidade de 98,4%, valor preditivo positivo de 83,3%, valor preditivo negativo de 95,2, acurácia de 94,2%, índice *kappa* de 0,68 (substancial⁸; $p<0,0001$), conforme exposto na Tabela III. A junção de granulomas e histiocitose aprimora ainda mais esses valores, que estão destacados na Tabela IV.

A presença de ectasias vasculares ($n=4$; 50%; $p=0,408$) e linfocitose intersticial ou associada a acúmulos linfoides ($p=0,349$) não mostraram associação estatisticamente significativa com a infiltração da medula óssea demonstrada por imunomarcção com CD30 (tabela I).

A presença de eosinofilia não se associou estatisticamente com a infiltração da medula óssea ($n=8$; 100%; $p=0,143$), embora esteja presente na maior parte dos casos ($n=55$; 80,9%). Além disso, a diferença entre as médias das contagens de eosinófilos entre os casos infiltrados ($n=8/55$; média=91,87 $\pm$ 9,41 eosinófilos em campo de grande aumento) e os casos livres de neoplasia ($n=47/55$; média=102,36 $\pm$ 7,16) não foi estatisticamente significativa ($p=0,388$; teste T-student).

O aumento da reticulina, cuja associação foi observada com infiltração neoplásica, nesse estudo, foi avaliada também na curva ROC, com área sob a curva de 0,829 ($p=0,003$; IC95%=0,655-1,000). Valores acima de MF2 para a reticulina tiveram especificidade para detecção de infiltração de 98,3%, ainda que a sensibilidade seja de 50%. Entre os oito pacientes identificados com infiltração neoplásica medular, quatro (50%) foram classificados como MF3, estágio máximo do aumento da reticulina, o qual já evidencia presença de colágeno ($p<0,001$).

Discussão

A biópsia de medula óssea fez parte por muitos anos do rol de procedimentos diagnósticos necessários ao estadiamento dos pacientes portadores de linfoma de Hodgkin⁹, sendo recentemente substituída pelo 18F-FDG PET-CT como modalidade diagnóstica inicial nos protocolos internacionais¹⁰. Entretanto, a biópsia de medula óssea ainda tem seu espaço em muitos serviços de Hematologia, tanto no âmbito nacional como internacional. Em virtude dos aspectos reacionais da medula óssea do paciente com LH, a detecção morfológica das atipias neoplásicas verdadeiras pode representar um desafio ao patologista. O presente estudo acrescentou a ferramenta da imunoistoquímica na avaliação da MO desses pacientes visando aprimorar a precisão do diagnóstico anatomopatológico.

A avaliação de infiltração pelo método morfológico tem alto valor preditivo negativo, ou seja, se aplica a situação de exclusão de casos suspeitos. Muito provavelmente isso está intimamente relacionado a presença de fatores morfológicos tão marcantes (tabela I) como a presença dos granulomas e macrófagos. De fato, a concordância é boa ($kappa=0,64$), mas o valor preditivo positivo é baixo (53,3%), valorizando a necessidade do complemento pela imunoistoquímica.

Os critérios histológicos de comprometimento da medula óssea por esse linfoma envolvem a presença de infiltrado inflamatório associado a aumento das fibras reticulínicas, desorganização do colágeno e presença das células de Hodgkin-Reed-Sternberg (HRS)^{11,12}. Contudo é raro encontrar estas células dispostas de maneira convincente na medula óssea e outros achados são encarados como ominosos, a despeito da ausência de células HRS indiscutíveis.

Hiper celularidade é um achado recorrente nas biópsias de medula óssea dos pacientes com linfoma de Hodgkin, mesmo na ausência de infiltração neoplásica¹³.

Aumento das séries granulocítica e megacariocítica são relatadas em casos de infiltração focal ou sem infiltração da medula óssea¹³. Plasmocitose também é um achado recorrente em biópsias de medula óssea de pacientes com linfoma de Hodgkin, não necessariamente acometidos pela neoplasia¹³. Células HRS provocam alterações no microambiente de modo a favorecer sua sobrevivência, uma delas é o recrutamento de infiltrado inflamatório por meio da secreção de citocinas, como CCL28 e CXCL16, capazes de recrutar eosinófilos e plasmócitos¹⁴.

A hiper celularidade foi um fator que se mostrou relacionado à presença de células neoplásicas, contudo é um padrão morfológico que, isolado, mostra baixo valor preditivo positivo. Essa característica pode ser entendida no contexto da resposta inflamatória sistêmica presente em pacientes com linfomas de Hodgkin^{1,3,5}. Células HRS secretam quimiocinas capazes de atrair células inflamatórias, sobretudo IL-1, IL-6 e TNF- α , por isso é comum a presença de anemia associada a inflamação crônica em pacientes com linfomas de Hodgkin¹⁸. Fatores estimuladores de colônias de granulócitos (G-CSF) e monócitos (GM-CSF) também são secretados por fibroblastos estimulados por células HRS¹⁶ que podem provocar, na medula óssea, hiperplasia de série granulocítica não necessariamente associada a infiltração neoplásica.

Eosinófilos são células da imunidade inata frequentemente encontradas em meio ao microambiente em que se inserem as células HRS^{1,22}. A expressão de CD30L confere aos eosinófilos um papel central na manutenção dos estímulos oncogênicos à célula HRS²². A presença de eosinófilos em um linfonodo com arquitetura alterada é um sinal de suspeita para infiltração por linfoma de Hodgkin^{1,5,13}. Entretanto, indo de encontro aos achados característicos da doença nodal e confirmando achados de outros estudos de biópsias de medula óssea^{23,24}, eosinofilia na medula

óssea não se correlacionou com a presença de células HRS CD30 positivas no presente estudo. Classicamente, tem-se a eosinofilia e a plasmocitose como parâmetros indiretos de infiltração ou parâmetros sugestivos de infiltração. O atual estudo não encontrou associação entre esses achados a infiltração neoplásica confirmada na imunoistoquímica. É provável que a elevação de eosinófilos e plasmócitos esteja muito mais relacionada ao microambiente inflamatório promovido pela doença do que propriamente dito a presença de células neoplásicas.

Histiocitose é uma característica peculiar à infiltração da medula óssea por linfoma de Hodgkin^{11,12}. Em linfonodos acometidos por linfoma de Hodgkin, a presença de histiócitos CD68 positivos está correlacionada a piores desfechos prognósticos¹⁷. É possível a presença desse infiltrado na medula óssea seja uma das razões de mau comportamento biológico dessa neoplasia. A detecção à coloração histológica convencional por hematoxilina-eosina dessas células, no presente estudo, associou-se com a presença de células CD30 positivas na medula óssea, indicando um possível marcador de infiltração da medula óssea.

Quando associados os achados de histiocitose e formação de granulomas, os valores preditivos positivos e negativos são de 100% e 95,2%. Esses padrões histológicos, ao presente estudo, associam-se aos casos com a presença de células CD30 positivas ($p < 0,001$). Esse achado reforça o que já consta na literatura, ainda que de forma escassa: histiocitose atípica isolada e histiocitose aliada formação de granulomas são características associadas à infiltração por células HRS^{11,12}. A presença de granulomas nas estruturas nodais, principalmente, diagnosticadas com LH é discutida na literatura, pois pode ser um complicador diagnóstico levando a dife-

renciais infecciosos e de sarcoidose. Não é tão frequente na prática patológica, como se observou no contexto da medula óssea.

O aumento da reticulina é um fenômeno descrito nos linfomas de Hodgkin^{11,12}. O colágeno tipo IV secretado por fibroblastos recrutados por células HRS induz sobrevivência destas células por meio da ativação da via RTK¹⁰. Além disso, fibroblastos em íntima relação com células HRS exibem aumento da secreção de interleucina IL-1, IL-6 e TNF- α , promovendo ambiente pró-inflamatório¹⁶. O achado da associação entre aumento da reticulina e presença de células CD30 positivas na medula óssea corrobora a hipótese da alteração do microambiente induzido pelas células HRS^{11,12}.

O presente estudo, além de mostrar a ampliação da detecção de infiltração neoplásica com o apoio da imunoistoquímica, reconhece o aumento de custos que esse exame poderia trazer aos diferentes sistemas de saúde. Por isso, a informação de parâmetros histológicos como a reticulina e os granulomas com histiocitose são tão relevantes. Eles podem servir como guias morfológicos aos patologistas na seleção das medulas ósseas que mais necessitem da avaliação imunofenotípica com o CD30.

A identificação morfológica da célula HRS na medula óssea pode ser difícil e muitas vezes é necessário uso de recurso imunoistoquímico¹³. Aliar a pesquisa com anticorpo CD30 aos achados de granulomas com histiocitose podem ser ferramentas histopatológicas facilitadoras da detecção do clone neoplásico nas medulas ósseas de linfomas de Hodgkin, independente da presença de hiper celularidade. Identificar esses três padrões morfológicos e associar à imunomarcagem com CD30 se

mostrou, conforme resultados do presente estudo, um procedimento com alto valor preditivo positivo e negativo.

Conclusão

Os achados de plasmocitose, histiocitose e presença de granulomas na medula óssea acometida por linfoma de Hodgkin se correlacionam de maneira estatisticamente significativa a presença de células CD30 positivas. A presença de retículo aumentado também está correlacionada a presença de células neoplásicas na medula óssea. Apesar de ser uma característica rotineiramente descrita como associada ao linfoma de Hodgkin, a presença de eosinófilos aumentados na medula óssea não está correlacionada com a presença de células diagnósticas. Ao patologista, buscar por esses parâmetros em associação à pesquisa por células CD30 pode levar a uma maior detecção da infiltração neoplásica em biópsias de medula óssea.

Aprovação pelo comitê de ética

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética sob número 2.577.081 em 03 de abril de 2018.

Agradecimentos

Ao departamento de Patologia do Hospital das Clínicas de Botucatu - UNESP

Financiamento

O presente trabalho teve como fonte de financiamento a Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (Capes).

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.Stein H, Pileri SA, Weiss LM, Poppema S, Gascoyne RD & Jaffe ES. Hodgkin lymphomas introduction. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (revised 4th edition). Lyon: IARC, 2017. p.424-30
- 2.Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program [Internet]. Bethesda(MD): National Institutes of Health: Division of Cancer Control and Population Sciences (US); citadoem 2019 Apr
- 3.Campo E, Jaffe ES & Harris NL. Normal lymphoid organs and tissues. . In: Jaffe ES, Arber DA, Campo E, Harris NL, Quintanilla-Martinez L. Hematopathology. Philadelphia: Elsevier, 2017. p.131-52
- 4.Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. J ClinOncol. 2014 Sep 20; 32(27): 3059–3067
- 5.Press OW. Hodgkin lymphoma. In: Kaushansky K, Lichtman MA, Prchal JT, Levi MM, Press OW, Burns LJ et al. Williams Hematology 9th ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2016. p.1603-23
- 6.Caetano R, Schluckebier LF, Bastos RCG, da Silva RM, Carneiro MP, da Silva JWE et al. Análise dos custos do procedimento PET-TC com 18F-FDG na perspectiva do SUS provedor: estudo em uma unidade pública de saúde do rio de janeiro, Brasil. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 30(2):379-392, fev, 2014

7. Southwest Oncology Group, Cancer and Leukemia Group B/Alliance, Eastern Cooperative Oncology Group & AIDS Malignancy Consortium. US Intergroup Trial of Response-Adapted Therapy for Stage III to IV Hodgkin Lymphoma Using Early Interim Fluorodeoxyglucose-Positron Emission Tomography Imaging: Southwest Oncology Group S0816. *J Clin Oncol*. 2016 Jun 10;34(17):2020-7
8. Landis RJ & Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*. 1977 Mar; 33. p.159-74.
9. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW & Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res* 1971; 31:1860.
10. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol*. 2014 Sep 20; 32(27): 3059–3067
11. Lukes RJ. Criteria for involvement of lymph node, bone marrow, spleen, and liver in Hodgkin's disease. *Cancer Res*. 1971 Nov;31(11):1755-67.
12. O'Carroll DI, McKenna RW & Brunning RD. Bone marrow manifestations of Hodgkin's disease. *Cancer*. 1976 Jan 1;38(4):1717-1728.
13. Wilkins, BD. Lymphomas. In: Porwit A, McCullough JJ & Erber WN. *Blood and bone marrow pathology* 2nd Ed. London: Churchill-Livingstone, 2011. p.441-42
14. Hanamoto H, Nakayama T, Miyazato H, Takegawa S, Hieshima K, Tatsumi Y et al. Expression of CCL28 by Reed-Sternberg Cells Defines a Major Subtype of Classical Hodgkin's Disease with Frequent Infiltration of Eosinophils and/or Plasma Cells. *Am J Pathol*. 2004 Mar; 164(3): 997–1006.

- 15.Vardhana S &Younes A. The immune microenvironment in Hodgkin lymphoma: T cells, B cells, and immune checkpoints. *Haematologica*. 2016 Jul;101(7):794-802
- 16.Dörsam B, Bösl T,Reiners KS, Barnert S, Schubert R, Shatnyeva O et al.Hodgkin lymphoma-derived extracellular vesicles change the secretome of fibroblasts toward a CAF phenotype. *Front Immunol*. 2018 Jun 18;9:1358
- 17.Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T et al. Tumor-Associated Macrophages and Survival in Classic Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med*. 2010 Mar 11; 362(10): 875–885.
- 18.Cuccaro A, Bartolomei F, Cupelli E, Galli E, Giachelia M &Hohaus S. Prognostic factors in Hodgkin lymphoma. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2014; 6(1): e2014053.
- 19.Zelenetz AD, Jaffe ES, Advani RH, Harris NL, Hoppe RT, Link MP et al. Hodgkin and Non-Hodgkin lymphomas. In: Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK et al. (Eds.). *AJCC Cancer Staging Manual* 8th edition. New York: Springer; 2017. p. 937-58
- 20.Wang J, Weiss LM, Chang KL, Slovak ML, Gaal K, Forman SJ & Arber DA. Diagnostic utility of bilateral bone marrow examination: significance of morphologic and ancillary technique study in malignant. *Cancer* 2002; 94:1522-1531
- 21.Levis A, Pietrasanta D, Godio L, Vitolo U, Ciravegna G, Di Vito F et al. A large-scale study of bone marrow involvement in patients with Hodgkin's lymphoma. *Clin Lymphoma*. 2004 Jun;5(1):50-5
- 22.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. *Blood*, Vol 88, No 9 (November 1), 1996: pp 3299-330

23. Macintyre EA. Vaughan Hudson B , Vaughan Hudson G , Jelliffe AM , Linch DC. Incidence and clinical importance of bone marrow eosinophilia in Hodgkin's disease (BNLI report no 29): British National Lymphoma Investigation. J Clin Pathol. 1987;40(3):245–246
24. Montgomery ND, Dunphy CH, Mooberry M, Laramore A, Foster MC, Park SL *et al*. Diagnostic Complexities of Eosinophilia. Arch Pathol Lab Med—Vol 137, February 2013

Tabela I – Avaliação do poder preditivo dos achados histopatológicos para a detecção de infiltração da medula óssea, tendo como padrão ouro o exame de imunoistoquímica.

Sensibilidade (%)	100
Especificidade (%)	88,3
Valor preditivo positivo (%)	53,3
Valor preditivo negativo (%)	100
Acurácia (%)	89,7
Índice <i>kappa</i>	0,64
<i>p</i> -valor	<0,001

la II – Associação das características anátomo-clínicas com a detecção de infiltração neoplásica após imunoistoquímico, em 68 pacientes com linfoma de Hodgkin

	Pacientes com infiltração neoplásica na MO (n=8)		
	n	%	p-valor*
hipercelularidade global	7	87,5	0,022
neofilia	8	100	0,165
plasmocitose	-	-	0,457
histiocitose	6	75	0,150
plasmoplasia megacariocítica	5	62,5	0,474
aumento da reticulina	5	62,5	0,007
granulomas	5	62,5	<0,001
plasmocitose	8	100	0,001
angiopatia vascular	4	50	0,324
linfócitos B	7	87,5	0,268
exatificação para óbito	2	25	0,110
diagnóstico pelo HIV	1	12,5	0,233

la III - Associação entre os principais achados histológicos da medula óssea com a detecção de infiltração neoplásica no exame imunoistoquímico, em análise individual.

	granulomas	histiocitose	hipercelularidade	plasmocitose	reticulina aumentada
especificidade (%)	62,5	100	87,5	75	62,5
especificidade (%)	98,4	61,7	56,7	71,7	85
valor preditivo positivo (%)	83,3	25,8	21,2	26,1	35,7
valor preditivo negativo (%)	95,2	100	97,1	95,6	94,4
acurácia (%)	94,2	66,2	60,3	72,1	82,4
valor de kappa	0,68	0,27	0,19	0,26	0,36
valor*	<0,0001	<0,0001	0,022	0,015	0,007

*p-valor<0,05.

Tabela IV – Avaliação do poder preditivo dos achados combinados de granulomas e histiocitose em relação à detecção de infiltração da medula óssea

Granuloma e histiocitose	
Sensibilidade (%)	62,5
Especificidade (%)	100
Valor preditivo positivo (%)	100
Valor preditivo negativo (%)	95,2
Acurácia (%)	95,6
Índice <i>kappa</i>	0,75
<i>p</i> -valor	<0,0001

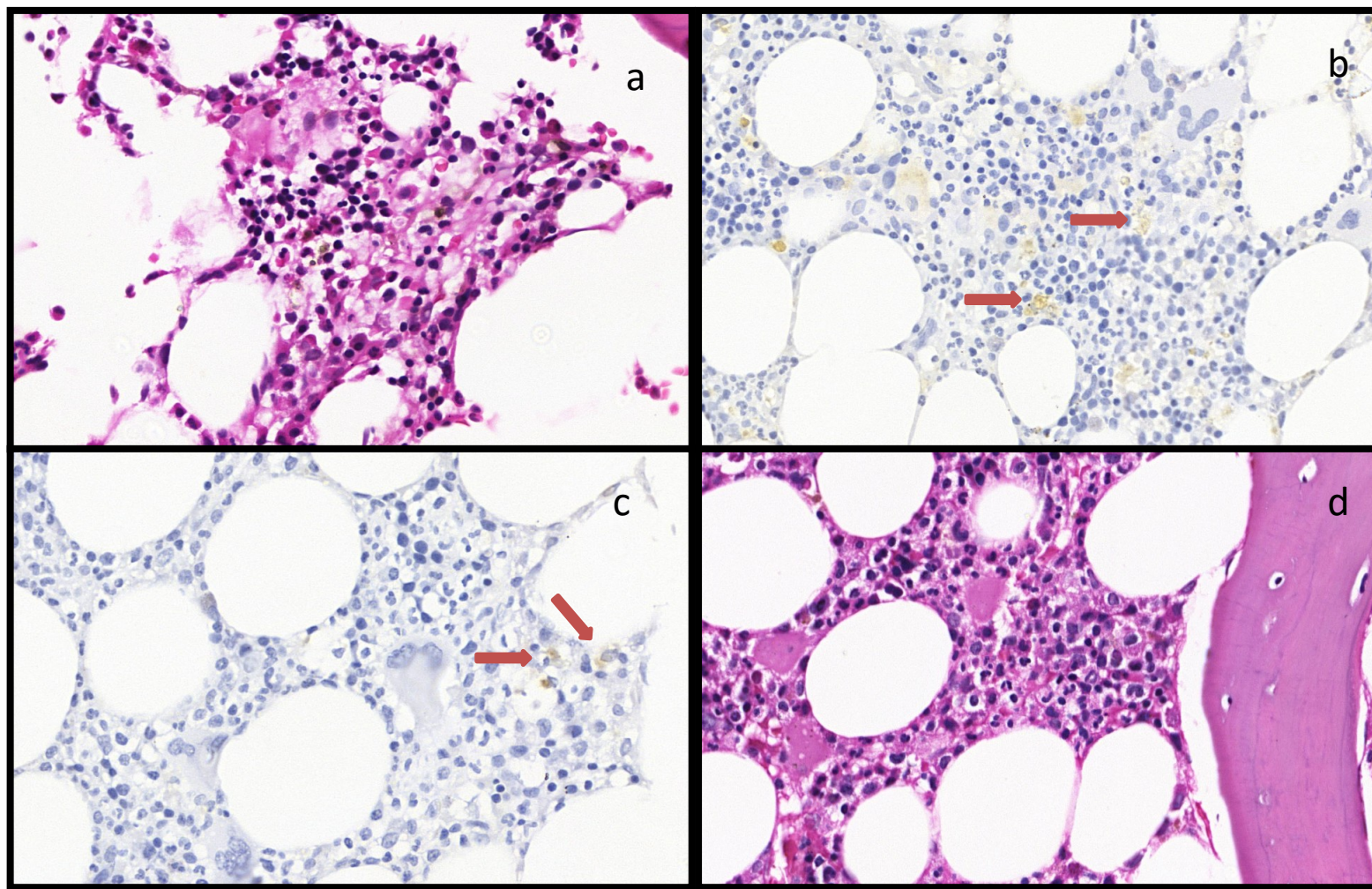


Figura I: histiocitose e esboços de granulomas em medulas ósseas acometidas por linfoma de Hodgkin. a) plasmócitos e histiócitos são identificáveis; b) em meio a esse infiltrado inflamatório e precursores hematopoiéticos há células CD30 positivas; c) infiltração peritrabecular por linfoma de Hodgkin; d) à coloração histológica convencional há raros histiócitos em meio a série granulocítica madura.