



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

MARCELO PADOVANI DE TOLEDO MORAES

**Linfoma de Hodgkin: características anátomo-clínicas e análise
de novo biomarcador (IMP3)**

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues

**Botucatu
(2015)**

Marcelo Padovani de Toledo Moraes

Linfoma de Hodgkin: características anátomo-clínicas e análise de novo biomarcador (IMP3)

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues

Botucatu
(2015)

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

Moraes, Marcelo Padovani de Toledo.

Linfoma de Hodgkin : características anátomo-clínicas e análise de novo biomarcador (IMP3) / Marcelo Padovani de Toledo Moraes. - Botucatu, 2015

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

Orientador: Maria Aparecida Custódio Domingues
Capes: 40105008

1. Hodgkin, Doença de. 2. Linfoma - Diagnóstico. 3. Prognóstico. 4. Revisão.

Palavras-chave: IMP3; Linfoma de Hodgkin; Sobrevida.

Dedicatória

**Aos meus pais, Bento e Tarsila, que sempre me brindaram com dedicação
e amor incondicional.**

**A minha querida esposa Daniela, pelo amor, apoio e força que me
proporcionou.**

Aos meus filhos, Felipe e Murilo, fonte de toda minha coragem.

Agradecimentos

A professora Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues, amiga de imensa generosidade a quem nunca conseguirei agradecer o suficiente.

Ao meu amigo Ívison Xavier Duarte, pelo companheirismo, pelos conselhos, pela força nos momentos difíceis e pelas palavras de otimismo, fundamentais para concretização desse trabalho.

Aos professores Dr. Flávio de Oliveira Lima e Dr. Rodrigo Mattos dos Santos, pela contribuição científica no exame de qualificação.

Sumário

Lista de abreviações e siglas

Resumo

Summary

REVISÃO DA LITERATURA	1
1. LINFOMAS	2
2 LINFOMA DE HODGKIN - ASPECTOS GERAIS	2
2.1 Contexto Histórico.....	2
2.2 Definição.....	3
2.3 Epidemiologia, Apresentação Clínica e História Natural.....	4
2.4 Fatores de Risco.....	6
3 LINFOMA DE HODGKIN - PATOLOGIA E BIOLOGIA	7
3.1 Morfologia	7
3.1.1 Linfoma de Hodgkin Clássico	7
3.1.1.1 Esclerose Nodular	8
3.1.1.2 Celularidade Mista.....	9
3.1.1.3 Rico em Linfócitos	9
3.1.1.4 Depleção Linfocitária.....	10
3.1.2 Linfoma de Hodgkin Predominância Linfocítica Nodular.....	11
3.2 Imunofenótipo	12
3.2.1 Linfoma de Hodgkin Clássico (LHC)	12
3.2.2 Linfoma de Hodgkin Predominância Linfocítica Nodular.....	14
3.3 Genética e Biologia.....	15
3.4 Fatores Prognósticos	17
4 IMP3.....	19
5 Referências bibliográficas	22
ARTIGO.....	37
RESUMO	39
ABSTRACT.....	40
INTRODUÇÃO.....	41
MATERIAL E MÉTODOS.....	44
Seleção de casos	44

Construção da micromatriz tecidual.....	45
Avaliação histológica	45
Estudo imuno-histoquímico.....	45
Análise estatística	47
RESULTADOS.....	48
Achados clínicos.....	48
Achados histológicos e imuno-histoquímicos	48
Seguimento e sobrevida	50
DISCUSSÃO.....	58
REFERÊNCIAS.....	62
CONCLUSÕES	66
ANEXOS	68
ANEXO 1: Termo de consentimento livre e esclarecido.	69
ANEXO 2: Parecer consubstanciado do CEP (versão resumida)	70
ANEXO 3:Tabela geral de casos	71

Lista de abreviaturas e siglas

LH: Linfoma de Hodgkin

LHC: Linfoma de Hodgkin Clássico

LNH: Linfoma não Hodgkin

LHPLN: Linfoma de Hodgkin predominância linfocítica nodular

LHCEN: Linfoma de Hodgkin clássico, subtipo esclerose nodular

LHCDL: Linfoma de Hodgkin clássico, subtipo depleção linfocitária

LHCRL: Linfoma de Hodgkin clássico, subtipo rico em linfócitos

LHCCM: Linfoma de Hodgkin clássico, subtipo celularidade mista

LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B

LGCA: Linfoma de grandes células anaplásicas

LB: Linfoma de Burkitt

LF: Linfoma folicular

LL/LLC: Linfoma linfocítico/leucemia linfocítica crônica

LM: Linfoma de células do manto

LZM: Linfoma da zona marginal

CDF: Células dendríticas foliculares

TMA: Micromatriz tecidual

OMS: Organização mundial da saúde

H&E: Hematoxilina & eosina

RS: Reed-Sternberg

LP: Predominância Linfocítica

L&H: Linfocítica e Histiocítica

RESUMO

O Linfoma de Hodgkin (LH) é uma neoplasia hematopoiética que acomete caracteristicamente adultos jovens e apresenta, quando não tratado, curso clínico fatal. O diagnóstico precoce e preciso desse linfoma, associado à terapia moderna, por outro lado, tem proporcionado diminuição dramática das taxas de letalidade. Ainda assim, cerca de 15-20% dos pacientes evoluem de maneira insatisfatória com resistência a terapia primária ou recaída precoce pós-tratamento. Nesse sentido, há estudos variados na tentativa de buscar perfis prognósticos capazes de selecionar pacientes candidatos a terapias particulares. O IMP3 (insulin-like growth factor mRNA binding protein 3) tem sido descrito como biomarcador relacionado a pior prognóstico em diversas neoplasias, especialmente carcinomas, mas ainda pouco estudado em neoplasias hematopoiéticas. Para avaliar seu potencial papel prognóstico no LH, foi estudada a expressão do IMP3 em 61 casos, incluindo estratificação da imunocoloração em intensidades (0, 1+, 2+ e 3+) e relação com sobrevida, dados clínicos, aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos. A expressão forte (intensidade 3+) para IMP3 foi observada em 61% (34/56) dos LH e apresentou forte indicio de associação com melhor sobrevida livre de doença. Nossos achados mostram o IMP3 como potencial biomarcador de melhor prognóstico em LH.

Palavras-chave: Hodgkin lymphoma, IMP3, sobrevida

ABSTRACT

Hodgkin lymphoma (HL) is a hematopoietic neoplasm that characteristically affects young adults and, if untreated, presents a fatal clinical course. Early and accurate diagnosis of this lymphoma associated with modern therapeutic management, on the other hand, has promoted a dramatic decrease in mortality rates. Despite this, around 15-20% of patients show unsatisfactory progression, with resistance to primary therapy or early relapse following treatment. The literature comprises numerous studies attempting to determine prognostic profiles that are capable of selecting candidate patients for specific therapies. Insulin-like growth factor mRNA binding protein 3 (IMP3) has been described as a biomarker that indicates worse prognosis in several malignancies, particularly carcinomas; however, studies of IMP3 in hematopoietic malignancies are rare. To assess their potential prognostic role in HL, IMP3 expression was studied in 61 cases and included stratification of immunostaining intensities (0, +, ++ and +++) and their relation to status of life, clinical data and morphological and immunohistochemical features. Intense IMP3 expression (++++) was observed in 61% (34/56) cases and showed a strong indication of association with better disease-free survival. Our findings show that IMP3 is a potential biomarker of better prognosis in HL.

Keywords: Hodgkin lymphoma, IMP3, survival

REVISÃO DA LITERATURA

1. LINFOMAS

Os linfomas são neoplasias malignas do sistema linfático caracterizados pela proliferação clonal de linfócitos T ou B em diversas fases de diferenciação (Swerdlow SH CE, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H 2008). Classicamente, são divididos em dois grandes grupos, Hodgkin e Não Hodgkin, devido a diferenças morfológicas e clínicas (Roman E and Smith AG 2011). Atualmente sabe-se que há cerca de 100 sub-tipos de Linfoma Não Hodgkin (LNH) e cinco de Linfoma Hodgkin (LH), cada qual com manifestações clínicas próprias, grau de agressividade diverso (Balague Ponz O, Ott G et al. 2009; Ott G, Balague-Ponz O et al. 2009) e tratamento diferenciado.

2 LINFOMA DE HODGKIN - ASPECTOS GERAIS

2.1 Contexto Histórico

Thomas Hodgkin, fisiologista e patologista inglês, descreveu, no ano de 1832, as manifestações clínicas e alterações macroscópicas da doença, em sete autópsias, denominando-a de “Doença dos gânglios absorventes” (Hodgkin 1832). Por cerca de duas décadas essa neoplasia ficou esquecida até que, em 1856, o médico inglês Samuel Wilks reconheceu a mesma condição patológica em autópsias, publicando um artigo intitulado “Cases of Lardaceous Disease and Some Allied Affections” (Wilks S 1856). Em 1865, o próprio Wilks descreveu 15 casos adicionais da doença e finalmente denominou-a de

“Doença de Hodgkin” (Wilks S 1865; Geller SA and Taylor CR 2013). Apesar da descrição da característica e histórica célula diagnóstica (Figura 1) por Sternberg (Sternberg C 1898) e Reed (Reed DM 1902), a sua origem, bem como a verdadeira natureza neoplásica da doença, permaneceu sob debate durante décadas (Geller SA and Taylor CR 2013). Com a demonstração relativamente recente de sua origem em células clonais B (Kuppers R, Rajewsky K et al. 1994; Kuppers R, Kanzler H et al. 1996), foi possível a mudança definitiva do termo “Doença de Hodgkin” para “Linfoma de Hodgkin” (Harris NL, Stein H et al. 2001).

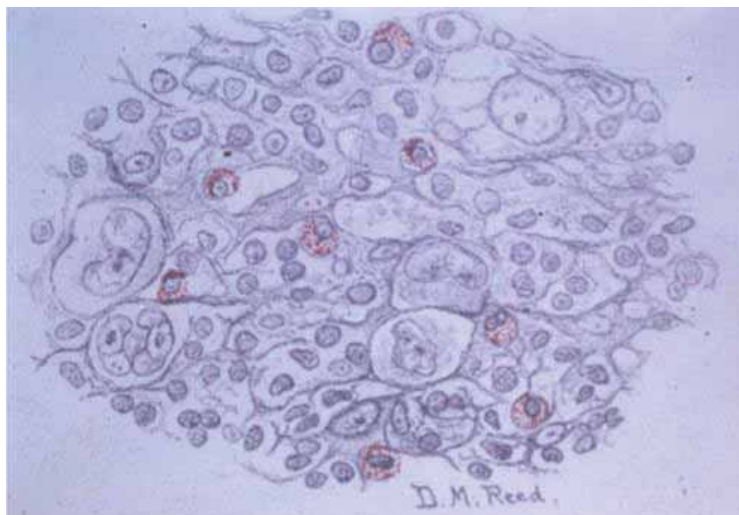


Figura 1: Ilustração original da célula gigante diagnóstica do LH feita por Dorothy Reed (Reed DM 1902)

2.2 Definição

O Linfoma de Hodgkin (LH) é definido, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), como uma neoplasia maligna do sistema linfático, potencialmente curável (Diehl V, Klimm B et al. 2005), que acomete geralmente adultos jovens e manifesta-se, usualmente, em linfonodos da região cervical. A

neoplasia é representada, de maneira muito característica, por raros elementos neoplásicos (cerca de 1% da massa tumoral) - células de Reed-Sternberg e suas variantes - dispersos em abundante estroma inflamatório acessório não neoplásico, majoritariamente linfocitário T.

Classicamente, é dividido em dois grandes grupos, Linfoma de Hodgkin clássico (LHC) e Linfoma de Hodgkin predominância Linfocítica nodular (LHPLN), constituindo entidades clínico-biológicas distintas, com características clínicas, prognósticas, morfológicas, imunofenotípicas e genéticas peculiares (Diehl V, Sextro M et al. 1999; Anagnostopoulos I, Hansmann ML et al. 2000).

2.3 Epidemiologia, Apresentação Clínica e História Natural

O LH compreende aproximadamente 12-30% dos linfomas (Swerdlow SH, Campo E et al. 2008; Siegel R, Naishadham D et al. 2013) e, diferentemente dos LNH, sua incidência absoluta não tem se alterado de maneira significativa. A última estimativa mundial apontou que, em 2012, ocorreram 659 mil casos novos de LH, sendo 385 mil no sexo masculino e 274 mil no sexo feminino (INCA 2014). Ainda segundo dados do Instituto Nacional do Câncer houve, no Brasil, no ano de 2009, 2.870 novos casos de LH, sendo 1.600 em homens e 1.270 em mulheres. O número de mortes para 2010 foi de 483, sendo 260 homens e 223 mulheres. Para o Brasil, no ano de 2014, estimam-se 1300 novos casos de LH em homens e 880 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 1,28 casos novos a cada 100 mil homens e 0,83 a cada 100 mil mulheres.

Nos países economicamente desenvolvidos há uma maior incidência

dessa neoplasia (7000 – 7500 novos casos/anos, nos EUA). Exceção é feita para faixa etária menor que 15 anos, onde o número de casos é maior nos países em desenvolvimento (Correa P and O'Connor GT 1973). Diferença na distribuição dos subtipos histológicos também é observada mundialmente, sendo o subtipo esclerose nodular menos prevalente em países subdesenvolvidos.

O LH é uma doença tipicamente de adultos jovens com envolvimento nodal supradiafragmático, incluindo cadeia cervical, supraclavicular, axilar e mediastinal anterior. A neoplasia é identificada em exames físicos e radiológicos de rotina, visto que grande parte dos pacientes não apresenta sintomas ao diagnóstico. Em um terço dos casos, contudo, há sintomatologia, sendo a febre mais comum que suores noturnos e perda ponderal (Gobbi PG, Ferreri AJ et al. 2013).

O LH apresenta caracteristicamente um padrão previsível de disseminação, com envolvimento sequencial e contíguo de sítios nodais (Kaplan HS 1981). Em estágios mais avançados, a doença pode acometer vísceras adjacentes, por invasão direta, ou disseminação hematogênica em um padrão semelhante a metástases de neoplasia epiteliais (Ansell SM 2012). Os sítios extranodais mais comumente envolvidos são baço, pulmão, fígado e medula óssea. Nesses casos avançados em que há acometimento nodal subdiafragmático e/ou visceral é mais frequente o encontro de sintomas B.

Há, também, algumas particularidades relativas à apresentação clínica, nos diferentes subtipos morfológicos de LH. O LHPLN pode ocorrer em qualquer idade, mas é mais comum em adultos do sexo masculino e é uma doença geralmente localizada ao diagnóstico. Frequentemente há

envolvimento de linfonodos periféricos (cervical e inguinal), sem acometimento de mediastino. Estadio IV com envolvimento de medula óssea raramente é encontrado. O LHCEN acomete mais comumente adolescentes e adultos jovens com discreto predomínio em mulheres. Envolvimento mediastinal é frequente. O LHCEN demonstra uma tendência a permanecer restrito as porções torácicas superiores, envolvendo linfonodos e estruturas adjacentes. A variante celularidade mista, por outro lado, apresenta-se, geralmente, em estadio mais avançado com acometimento de baço, fígado ou medula óssea. O LHCDL, variante menos comum do LHC, acomete paciente idosos e apresenta-se com linfadenopatia abdominal ou doença extranodal, incluindo envolvimento de baço, fígado, e medula óssea. O estadio ao diagnóstico é avançado e a resposta a terapia é geralmente pior em relação aos outros subtipos (Gobbi PG, Ferreri AJ et al. 2013). O LHCRL acomete geralmente adultos acima dos 50 anos e apresenta baixa agressividade. Há, nessa variante, acometimento de linfonodos subdiafragmáticos, sendo raro a formação de massa tumoral e envolvimento mediastinal e extranodal.

2.4 Fatores de Risco

Não há nenhum fator de risco plenamente estabelecido para o LH. No entanto, a distribuição etária bimodal do LH suporta a hipótese de que essa neoplasia seja resultado de dois processos patológicos distintos (Gobbi PG, Ferreri AJ et al. 2013). O primeiro deles infeccioso (Hjalgrim H and Engels EA 2008), associado ao grupo de adultos jovens, e o segundo mecanismo possivelmente semelhante ao de outras neoplasias linfoides, relacionado ao

grupo de pacientes com maior idade.

Já está documentada, na literatura, a mononucleose infecciosa como fator de risco para o desenvolvimento subsequente de LH EBV-relacionado (Hjalgrim H, Askling J et al. 2003). O DNA do vírus Epstein-Barr (EBV) pode ser detectado no soro de 30-50% dos pacientes apresentando LH (Gallagher A, Armstrong AA et al. 1999), com semelhante expressão, no tumor, da proteína latente de membrana (LMP1 e 2), EBERs (Epstein-Barr RNAs codificados) e EBNA (antígeno nuclear Epstein-Barr) (Levine PH, Pallesen G et al. 1994).

3 LINFOMA DE HODGKIN - PATOLOGIA E BIOLOGIA

3.1 Morfologia

3.1.1 Linfoma de Hodgkin Clássico

O LHC é subdividido em quatro grupos: esclerose nodular, celularidade mista, rico em linfócitos e depleção linfocitária. Essa subdivisão é feita levando em consideração diferenças clínicas e morfológicas (padrão de crescimento, grau de fibrose, composição do estroma inflamatório não neoplásico, número de células tumorais, relação com infecção pelo vírus Epstein-Barr).

3.1.1.1 Esclerose Nodular

Subtipo mais comum, perfazendo 75-80% dos casos de LHC. O achado marcante dessa variante é a presença de bandas de tecido fibroso densamente colagenizado, espessando a cápsula nodal e septando o parênquima em nódulos. Essas bandas fibróticas apresentam caracteristicamente birrefringência verde à microscopia de luz polarizada (Gobbi PG, Ferreri AJ et al. 2013). Os nódulos são compostos por população dominante de células inflamatórias (incluindo linfócitos pequenos, plasmócitos, macrófagos e eosinófilos) em proporções variadas, bem como dispersas células de Reed-Sternberg (RS) e suas variantes mononucleadas, incluindo células de Hodgkin e lacunares (Figura 2). As células de RS, consideradas elemento patognomônico, apresentam polinucleação, classicamente binucleação, com nucléolos eosinofílicos proeminentes semelhantes a inclusões. Entre as variantes mononucleares das células de RS encontramos células de Hodgkin, células “mumificadas” exibindo cromatina nuclear densamente condensada, e células lacunares com artefato de retração citoplasmático, secundário a fixação com formalina. Essa última mais comumente vista no subtipo esclerose nodular, sendo considerada por muitos a célula símbolo desse subtipo morfológico de LHC.

Associação com infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV) ocorre em 10-40% dos casos. O diagnóstico de LHCEN só pode ser estabelecido quando as células diagnósticas estão em um contexto inflamatório apropriado, incluindo a presença de linfócitos pequenos, plasmócitos, neutrófilos, macrófagos e histiócitos.

3.1.1.2 Celularidade Mista

É o segundo subtipo mais comum do LHC, representando 20-30% dos casos. Essa variante é mais frequentemente associada à infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV), em cerca de 75% dos casos, e HIV. As células diagnósticas características desse subtipo são as clássicas células de RS, disposta de maneira isolada em meio à componente inflamatório heterogêneo de pequenos linfócitos, eosinófilos, plasmócitos e macrófagos. A arquitetura nodal é difusa ou vagamente nodular, mas sem fibrose esclerosante nodular. Apesar da ausência de bandas fibróticas esclerosantes, discreta fibrose intersticial pode estar presente, sem desfavorecer esse diagnóstico.

Em alguns casos, especialmente naqueles diagnosticados em fase precoce da doença, essa variante pode apresentar um padrão interfolicular de crescimento associado a folículos linfoides residuais (King RL, Howard MT et al. 2014).

3.1.1.3 Rico em Linfócitos

Subtipo incomum, representando cerca de 6% dos casos de LHC, que apresenta aspectos morfológicos semelhantes ao LHPLN, incluindo padrão nodular de crescimento e ausência de neutrófilos, plasmócitos e eosinófilos. Esse padrão nodular é conferido não por fibrose, mas por folículos linfoides residuais, sendo freqüente o encontro de centros germinativos excentricamente localizados. As células diagnósticas são as células de RS e suas variantes,

tipicamente dispostas de maneira isolada e fora dos centros germinativos. Apesar das semelhanças morfológicas com o LHPLN, essa distinção pode ser facilmente feita pela imuno-histoquímica, visto que essa variante apresenta imunofenótipo de LHC. A associação com EBV é menor, quando comparado com o subtipo celularidade mista.

3.1.1.4 Depleção Linfocitária

É a apresentação morfológica menos comum do LHC, perfazendo menos de 1% dos casos, e com elevada associação com infecção pelo EBV e HIV (Glaser SL, Clarke CA et al. 2003). É caracterizada pelo apagamento da arquitetura nodal por fibrose extensa, mas diferentemente da fibrose da variante esclerose nodular, não há birrefringência verde à microscopia de luz polarizada. De maneira muito característica as células neoplásicas diagnósticas estão dispostas nesse fundo fibrótico, associado a raros elementos inflamatórios não neoplásicos. Essa apresentação morfológica, por vezes, confere um aspecto “sarcomatoide” à neoplasia, podendo ser confundida, especialmente quando há confluência de células neoplásicas (variante “reticular” ou “Sarcoma de Hodgkin”)(Lukes RJ and Butler JJ 1966), com diversas malignidades, incluindo Linfoma de grandes células anaplásicas.

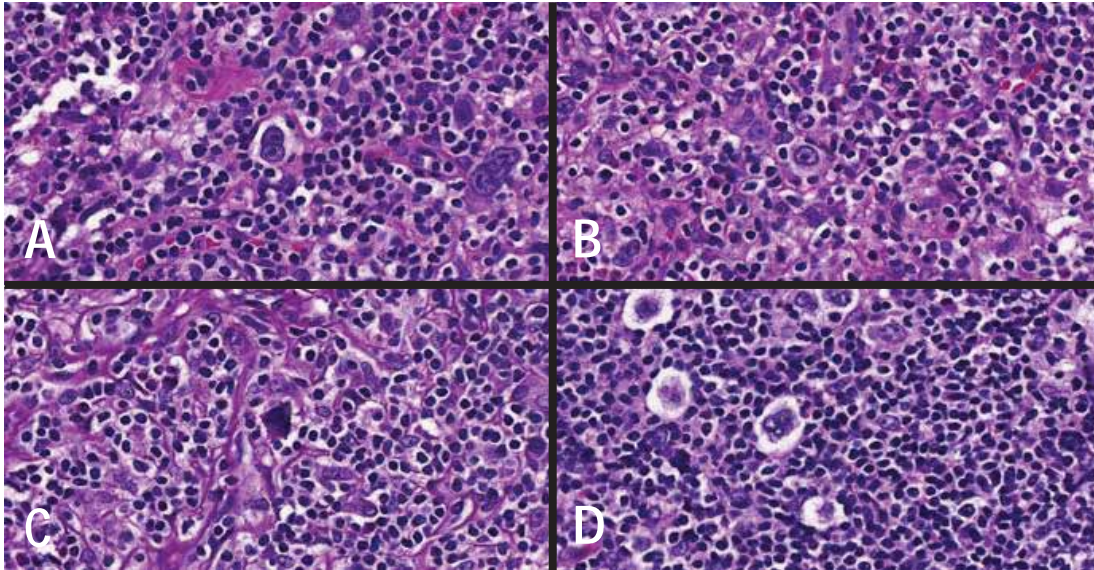


Figura 2: Célula de Reed-Sternberg (RS) e suas variantes: A) Clássica célula de RS; B) Célula de Hodgkin (variante mononucleada da células de RS); C) Célula de Hodgkin “mumificada”; D) Células neoplásicas de padrão “lacunar”

3.1.2 Linfoma de Hodgkin Predominância Linfocítica Nodular

De maneira semelhante ao LHC essa variante é caracterizada por escassa quantidade de células neoplásicas conhecidas, no LHPLN, como as células LP (Predominância Linfocítica) ou L&H (Linfocítica e Histiocítica). Essas células diagnósticas possuem abundante citoplasma e, diferentemente das células de Hodgkin, apresentam núcleos vesiculosos de aspecto multilobado/convoluto (“popcorn cell”) (Figura 3) com múltiplos pequenos nucléolos menores ao invés de um macronúcleolo único. Entretanto, células semelhantes às células de Hodgkin podem estar presentes, não impedindo o diagnóstico de LHPLN. As células L&H estão dispostas ao meio de formações linfoides macrofoliculares (nodulares), constituídas pela trama expandida de células foliculares dendríticas e população residual de pequenos linfócitos maduros B e T. Plasmócitos, eosinófilos e neutrófilos são raramente vistos (Burns BF, Colby TV et al. 1984). Número variável de histiócitos podem,

também, estar presentes formando, por vezes, pequenos granulomas não necrosantes (Gobbi PG, Ferreri AJ et al. 2013).

Importante salientar que as células L&H se dispõem de maneira isolada, sem tendência de formar agregados. Apesar de o padrão nodular representar o selo morfológico dessa malignidade, sendo necessário para o diagnóstico de LHPLN, áreas difusas de crescimento podem estar presentes de maneira proeminente, em determinados casos. Cinco variações morfológicas são descritas na literatura: 1. Nodular serpiginoso; 2. Nodular com células LP extranodulares proeminentes; 3. Nodular rico em células T; 4. Difuso com fundo rico em células T e 5. Difuso de grandes células B, rico em células T, Símile (Fan Z, Natkunam Y et al. 2003).

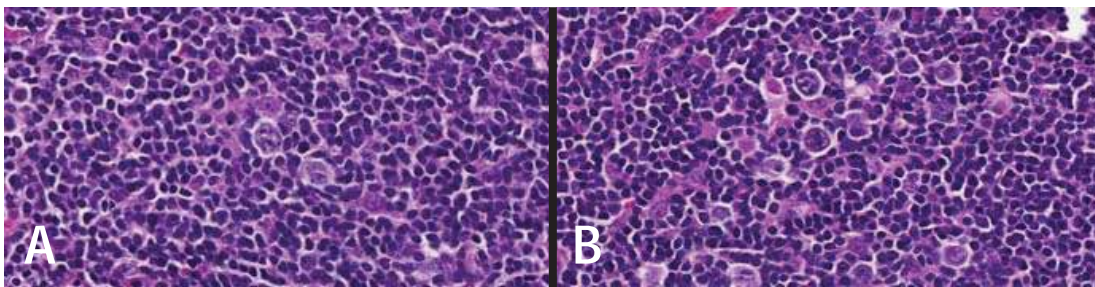


Figura 3: A e B) Células LP (predominância linfocítica) de padrão “popcorn” denominadas, no passado, células L&H

3.2 Imunofenótipo

3.2.1 Linfoma de Hodgkin Clássico (LHC)

O imunofenótipo de todos os subtipos de LHC é similar (Lu J and Chang KL 2011). De acordo com sua origem B, as células de Reed-Sternberg (RS) e suas variantes expressam fator de transcrição de células B (PAX5). Essa expressão é geralmente menos intensa quando comparado com os linfócitos B

adjacentes não neoplásicos. Na maioria dos casos, a expressão de PAX5 é a única evidência imuno-histoquímica de diferenciação B da neoplasia. Em cerca de 30-40% dos casos de LHC há positividade, também, de CD20 em um padrão caracteristicamente fraco e heterogêneo, associado a um grande contingente celular neoplásico negativo, dentro da mesma neoplasia. Outros marcadores de diferenciação B, incluindo CD79a, CD19, OCT2 e BOB.1 são negativos (King RL, Howard MT et al. 2014). O CD45, marcador pan-hematopoético, é clássica e misteriosamente negativo nos LHC (Figura 4A). CD30 é expresso em virtualmente todos os casos de LHC, em padrão membranoso, frequentemente associado a um reforço de imunocoloração paranuclear, área golgi do citoplasma (padrão “dot”) (Figura 4B). A expressão de CD15 (Figura 4C) é encontrada em 75-85% dos casos estando essa variação, também, relacionada ao clone do marcador empregado. Outros marcadores positivos e que auxiliam nos diagnósticos diferenciais com outras neoplasias hematopoiéticas, incluindo LGCA e LDGCB, são MUM1(Bai M, Panoulas V et al. 2006) e fascina (Bakshi NA, Finn WG et al. 2007; Bhargava P, Pantanowitz L et al. 2010).

A imunoexpressão para LMP1(Figura 4C) é vista nos casos associados ao vírus EBV, indicando infecção de latência tipo II.

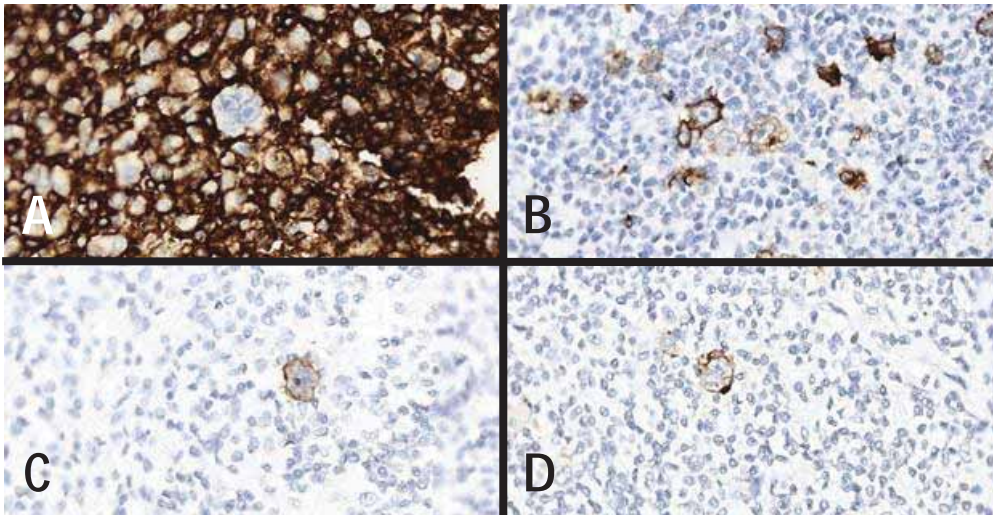


Figura 4: Imunofenótipo do LHC: A) CD45 (imunonegatividade em célula RS); B)CD30 (imunocoloração de membrana com acentuação da marcação em região perinuclear); C)CD15 (imunocoloração de membrana com acentuação da marcação em região parainuclear); D)LMP-1 (positivos em célula de RS; imunocoloração citoplasmática)

3.2.2 Linfoma de Hodgkin Predominância Linfocítica Nodular

Apesar de ocorrer alguma sobreposição morfológica entre o LHC e LHPLN, essas duas neoplasias podem ser facilmente diferenciadas pelo imunofenótipo. Diferentemente do LHC, as células L&H do LHPLN são tipicamente positivas, de maneira intensa e uniforme, para CD45 (Figura 5A) e marcadores de linhagem B incluindo CD20 (Figura 5B), CD79a (Figura 5C), PAX5, OCT2 e BOB.1 (McCune RC, Syrbu SI et al. 2006). CD30 e MUM1 são tipicamente negativos no LHPLN, no entanto positividade focal pode ser vista em subgrupo de casos (Ranjan P and Naresh KN 2003). Outro achado constante, nessa neoplasia, é a expressão difusa para proteína BCL6 (Figura 5D) (Herbeck R, Teodorescu Brinzeu D et al. 2011).

Achado imuno-histoquímico adicional e de importância para o diagnóstico de LHPLN inclui a identificação da expansão da trama de células

dendríticas foliculares (CD21+;CD23+/CD35+) nos macrofolicúlos. Ainda, no LHPLN as células neoplásicas são circundadas por uma rima (roseta) de pequenos linfócitos T foliculares “helper” expressando CD4, CD57 e PD1 (Kraus MD and Haley J 2000).

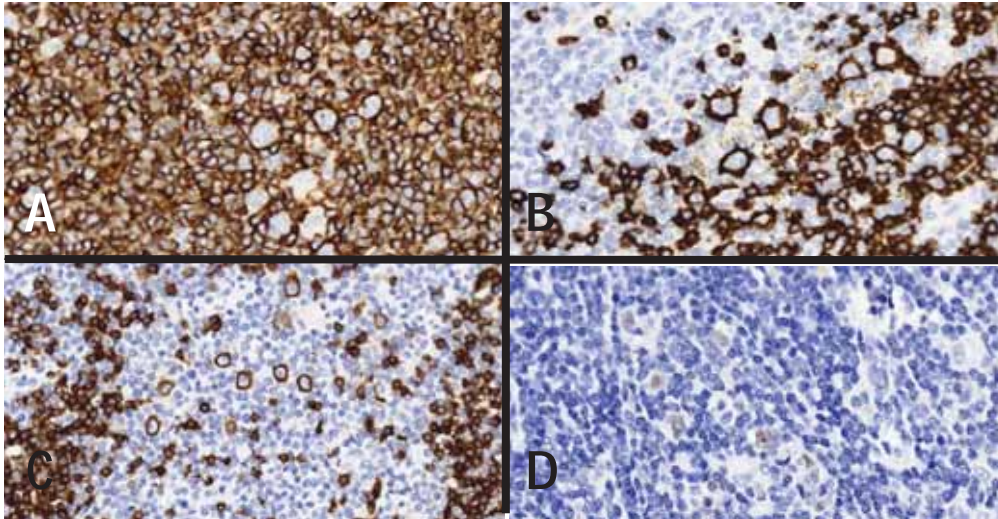


Figura 5: Imunofenótipo do LHPLN: A) CD45 (imunopositividade em células LP); B)CD20 (imunocoloração de membrana intensa e constante, nas células LP); C)CD79a (imunopositividade nas células neoplásicas); D)BCL6 (positividade nuclear em células LP).

3.3 Genética e Biologia

Acredita-se que as células LP (ou L&H) do LHPLN representem uma expansão clonal de células B derivadas de células centrogerminais em estágio de centroblasto. A expressão de marcadores centro-germinais (BCL6, HGAL, centerin) associado à alta taxa de mutações do gene V_H e a diversidade intraclonal suportam essa hipótese (Marafioti T, Hummel M et al. 1997; Schmitz R, Stanelle J et al. 2009).

Virtualmente todas as células Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS), do LHC, carregam rearranjo clonal e mutação somática nos genes de cadeia pesada e leve de imunoglobulina, sendo que em grande parte dos casos há mutações

somáticas destrutivas, causadoras de morte apoptótica imediata em células centro-germinais (CG) normais, detectadas em genes rearranjados de IgV (Schmitz R, Stanelle J et al. 2009). Esses achados indicam a origem das HRS em células CG pré-apoptóticas que adquiriram mutações somáticas desfavoráveis e foram resgatadas da apoptose por eventos transformadores adicionais (Schmitz R, Stanelle J et al. 2009).

No entanto, as células de HRS apresentam perda da expressão de genes específicos de diferenciação B (Schmitz R, Stanelle J et al. 2009), fato relacionado a dificuldade na caracterização imuno-histoquímica dessa neoplasia como deriva de linhagem B.

Em relação ao microambiente acessório, as células de HRS interagem com células estromais e inflamatórias (Figura 6) e, através da mediação de diversas quimiocinas e citocinas, orchestra o recrutamento de células do sistema imune, incluindo células T “helper”, plasmócitos, mastócitos, macrófagos, granulócitos e eosinófilos (King RL, Howard MT et al. 2014).

As células de RS são geralmente circundadas por uma roseta de linfócitos T, tanto tipo Th1 quanto Th2.

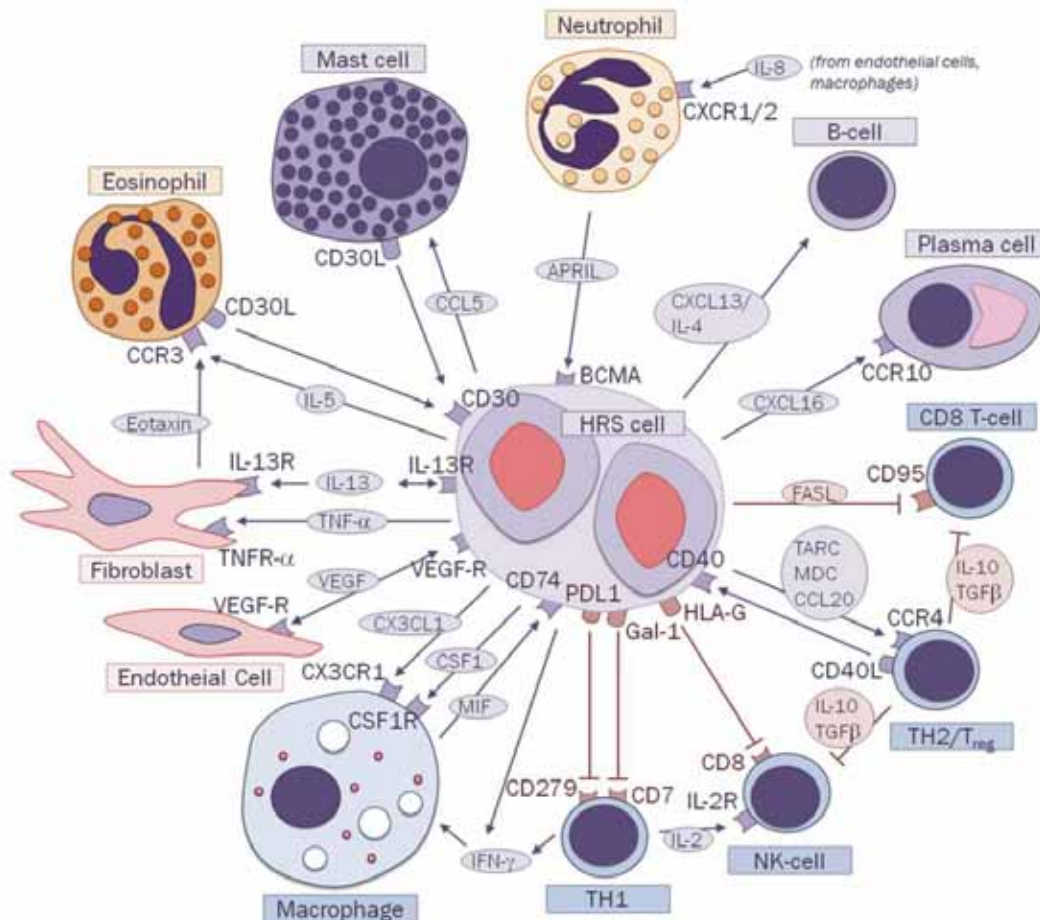


Figura 6: Interação entre as células de RS e o microambiente inflamatório acessório, promovendo a liberação de numerosas citocinas e quimiocinas (King RL, Howard MT et al. 2014).

3.4 Fatores Prognósticos

O linfoma de Hodgkin, considerado no passado uma neoplasia agressiva com curso clínico fatal, pela ausência de terapia adequada, é hoje curada com regimes quimioterápicos e radioterápicos atuais, particularmente nos casos de doença localizada.

De uma maneira geral, a mortalidade do LH tem sido reduzida progressivamente nos últimos anos. A mortalidade nos EUA, na década de 1950, era de 1,8 por 100.000 caindo, no começo dos anos 1990, para 0,47 por 100.000 (Landis SH, Murray T et al. 1998). Os mais recentes dados apontam

sobrevida geral, em 5 anos, de 81%.

Entretanto, uma fração de pacientes com doença avançada não responde completamente a terapia primária ou apresenta recorrência após períodos curtos de remissão. Esses pacientes se beneficiariam, eventualmente, de tratamento e seguimento clínico diferenciados. Nesse contexto, há, na literatura médica recente, muitos estudos focados na seleção desses pacientes através da identificação de fatores prognósticos associados à falha terapêutica.

Inicialmente, marcadores imuno-histoquímicos de desregulação do ciclo celular e apoptose, especialmente proteína BCL2 e proteína p53, foram relacionados com baixa resposta ao tratamento e/ou diminuição da sobrevida (Smolewski P, Robak T et al. 2000; Rassidakis GZ, Medeiros LJ et al. 2002; Garcia JF, Camacho FI et al. 2003; Montalban C, Garcia JF et al. 2004; Bai M, Papoudou-Bai A et al. 2007).

A composição celular do microambiente tumoral, dada pela caracterização imunofenotípica de células T reativas, em especial baixa concentração de células FOXP3+ e alta densidade de células TIA-1+, foi também relacionado como marcador preditivo de pior prognóstico (Alvaro T, Lejeune M et al. 2005; Tzankov A, Meier C et al. 2008).

Ainda, o fenótipo de ativação macrófago/monocítico, identificado pelo acréscimo de macrófagos CD68+, foi correlacionado com recorrência precoce, recidiva pós-transplante autólogo de células tronco-hematopoiéticas e pior sobrevida (Steidl C, Lee T et al. 2010; Kamper P, Bendix K et al. 2011).

Mais recentemente, perfis de expressão gênica identificaram subtipos moleculares de Linfoma de Hodgkin com capacidade de estratificação de risco e predição da sobrevida (Devillard E, Bertucci F et al. 2002; Chetaille B,

Bertucci F et al. 2009; Sanchez-Espiridion B, Montalban C et al. 2010; Steidl C, Lee T et al. 2010).

Finalmente, análises da expressão de miRNA em LHC tem demonstrado desregulação de alguns miRNAs específicos, incluindo *MIR21*, *MIR30E*, *MIR30D* e *MIR29B*, conferindo prognóstico desfavorável (Sanchez-Espiridion B, Martin-Moreno AM et al. 2013).

4 IMP3

O IMP3 (insulin-like growth factor mRNA binding protein 3) é uma proteína oncofetal, membro da família do fator de crescimento tipo insulina II (IGF-II), com importante função nas fases iniciais da embriogênese humana (Nielsen J, Christiansen J et al. 1999). É expresso, nas fases iniciais da embriogênese, em epitélio primitivo, músculo e placenta. Durante essa fase, o IMP3 é necessário para migração celular e formação da placa de revestimento do tubo neural e, subsequentemente, migração da crista neural.

Possui, fora do período embrionário, reconhecido papel carcinogênico sendo especificamente expresso em tumores malignos e associado a neoplasias agressivas e avançadas. Ele está presente em uma grande gama de cânceres, incluindo mesotelioma (Husain AN, Colby TV et al. 2009; Ikeda K, Tate G et al. 2010; Shi M, Fraire AE et al. 2011; Lee AF, Gown AM et al. 2013), carcinomas endometriais (seroso e de células claras) (Zheng W, Yi X et al. 2008), adenocarcinoma esofágico (Lu D, Vohra P et al. 2009; Feng W, Zhou Z et al. 2011), carcinoma laríngeo (Chen K, Cornejo KM et al. 2013), leiomiossarcoma (Cornejo K, Shi M et al. 2012), adenocarcinoma de pâncreas

(Yantiss RK, Woda BA et al. 2005; Zhao H, Mandich D et al. 2007; Wachter DL, Schlabrakowski A et al. 2011), melanomas (Pryor JG, Bourne PA et al. 2008; Mentrikoski MJ, Ma L et al. 2009; Yu L, Xu H et al. 2010), hepatocarcinoma (Wachter DL, Kristiansen G et al. 2012) sendo raramente encontrado em tecidos normais. Sua expressão é relacionada à proliferação de células tumorais, adesão, invasão e migração, resultando no comportamento biológico agressivo observado em diversas neoplasias (Yaniv K, Fainsod A et al. 2003; Liao B, Hu Y et al. 2005; Vikesaa J, Hansen TV et al. 2006). É utilizado como marcador prognóstico independente em carcinomas de células renais (Jiang Z, Chu PG et al. 2006; Hoffmann NE, Sheinin Y et al. 2008; Jiang Z, Chu PG et al. 2008), carcinomas uroteliais (Sitnikova L, Mendese G et al. 2008; Szarvas T, vom Dorp F et al. 2012) e adenocarcinomas pulmonares (Findeis-Hosey JJ, Yang Q et al. 2010).

King e col. (King RL, Pasha T et al. 2009), em um estudo inicial, avaliaram a superexpressão de IMP3 em tecidos linfoides não neoplásicos e em diversas neoplasia linfoides, incluindo 26 casos de LH, 26 casos de linfoma difuso de grandes células B (DLBCL), 12 casos de linfoma de Burkitt (LB) e 15 casos de linfoma folicular (LF). Eles encontraram expressão do IMP3 constante e fraca (escores 1+ e 2+) em células centrofoliculares de 21 controles normais (6 linfonodos, 6 baços, 4 tonsilas e 5 timos), além de positividade em todos os LH (intensidade forte), 83% dos LB (intensidade moderada) e em 85% dos LDGCB (intensidade variável). Nesse estudo, ainda, houve pequena proporção de imunocoloração, geralmente fraca (escores 1+ e 2+), em outros linfomas não centrogerminais derivados, incluindo expressão em 20% (2/10) dos linfomas de células do manto (LM), 10% (1/10) dos LGCA, 10% (1/10) dos

linfomas linfocíticos (LL/LLC) e 8% (1/11) dos linfomas da zona marginal (LZM).

Em estudo mais recente, Tang e col. (Tang H, Wei Q et al. 2013) avaliaram a expressão do IMP3 em 81 casos de LH, incluindo 10 casos de LHPLN, sugerindo seu uso como marcador diagnóstico. Eles encontraram imunexpressão do IMP3, restritamente em células neoplásicas diagnósticas, em 99% dos casos, sendo a intensidade de imunocoloração forte (escore 3+) em 73% dos casos.

5 Referências bibliográficas

- Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT, Bosch R, Garcia JF, Jaen J, Banham AH, Roncador G, Montalban C and Piris MA. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res.* 2005;11(4):1467-73.
- Anagnostopoulos I, Hansmann ML, Franssila K, Harris M, Harris NL, Jaffe ES, Han J, van Krieken JM, Poppema S, Marafioti T, Franklin J, Sextro M, Diehl V and Stein H. European Task Force on Lymphoma project on lymphocyte predominance Hodgkin disease: histologic and immunohistologic analysis of submitted cases reveals 2 types of Hodgkin disease with a nodular growth pattern and abundant lymphocytes. *Blood.* 2000;96(5):1889-99.
- Ansell SM. Hodgkin lymphoma: 2012 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2012;87(12):1096-103.
- Bai M, Panoulas V, Papoudou-Bai A, Horianopoulos N, Kitsoulis P, Stefanaki K, Rontogianni D, Agnantis NJ and Kanavaros P. B-cell differentiation immunophenotypes in classical Hodgkin lymphomas. *Leuk Lymphoma.* 2006;47(3):495-501.
- Bai M, Papoudou-Bai A, Horianopoulos N, Grepí C, Agnantis NJ and Kanavaros P. Expression of bcl2 family proteins and active caspase 3 in classical Hodgkin's lymphomas. *Hum Pathol.* 2007;38(1):103-13.
- Bakshi NA, Finn WG, Schnitzer B, Valdez R and Ross CW. Fascin expression in diffuse large B-cell lymphoma, anaplastic large cell lymphoma, and classical Hodgkin lymphoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2007;131(5):742-7.
- Balague Ponz O, Ott G, Hasserjian RP, Elenitoba-Johnson KS, de Leval L and

- de Jong D. Commentary on the WHO classification of tumors of lymphoid tissues (2008): aggressive B-cell lymphomas. *J Hematop.* 2009;2(2):83-7.
- Bhargava P, Pantanowitz L, Pinkus GS, Pinkus JL, Paessler ME, Rouillet M, Gautam S, Bagg A and Kadin ME. Utility of fascin and JunB in distinguishing nodular lymphocyte predominant from classical lymphocyte-rich Hodgkin lymphoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2010;18(1):16-23.
- Burns BF, Colby TV and Dorfman RF. Differential diagnostic features of nodular L & H Hodgkin's disease, including progressive transformation of germinal centers. *Am J Surg Pathol.* 1984;8(4):253-61.
- Chen K, Cornejo KM, Ye W, Wu Q, Liang J and Jiang Z. Oncofetal protein IMP3: a new diagnostic biomarker for laryngeal carcinoma. *Hum Pathol.* 2013;44(10):2126-31.
- Chetaille B, Bertucci F, Finetti P, Esterni B, Stamatoullas A, Picquenot JM, Copin MC, Morschhauser F, Casasnovas O, Petrella T, Molina T, Vekhoff A, Feugier P, Bouabdallah R, Birnbaum D, Olive D and Xerri L. Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome. *Blood.* 2009;113(12):2765-3775.
- Cornejo K, Shi M and Jiang Z. Oncofetal protein IMP3: a useful diagnostic biomarker for leiomyosarcoma. *Hum Pathol.* 2012;43(10):1567-72.
- Correa P and O'Connor GT. Geographic pathology of lymphoreticular tumors: summary of survey from the geographic pathology committee of the international union against cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1973;50(6):1609-17.
- Cox DR. Regression models and life-tables. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological).* 1972:187-220.

- Cuccaro A, Bartolomei F, Cupelli E, Galli E, Giachelia M and Hohaus S. Prognostic factors in hodgkin lymphoma. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2014;6(1):e2014053.
- Devillard E, Bertucci F, Trempat P, Bouabdallah R, Loriol B, Giaconia A, Brousset P, Granjeaud S, Nguyen C, Birnbaum D, Birg F, Houlgatte R and Xerri L. Gene expression profiling defines molecular subtypes of classical Hodgkin's disease. *Oncogene.* 2002;21(19):3095-102.
- Diehl V, Klimm B and Re D. Hodgkin lymphoma: a curable disease: what comes next? *Eur J Haematol Suppl.* 2005;(66):6-13.
- Diehl V, Sextro M, Franklin J, Hansmann ML, Harris N, Jaffe E, Poppema S, Harris M, Franssila K, van Krieken J, Marafioti T, Anagnostopoulos I and Stein H. Clinical presentation, course, and prognostic factors in lymphocyte-predominant Hodgkin's disease and lymphocyte-rich classical Hodgkin's disease: report from the European Task Force on Lymphoma Project on Lymphocyte-Predominant Hodgkin's Disease. *J Clin Oncol.* 1999;17(3):776-83.
- Fan Z, Natkunam Y, Bair E, Tibshirani R and Warnke RA. Characterization of variant patterns of nodular lymphocyte predominant hodgkin lymphoma with immunohistologic and clinical correlation. *Am J Surg Pathol.* 2003;27(10):1346-56.
- Feng W, Zhou Z, Peters JH, Khoury T, Zhai Q, Wei Q, Truong CD, Song SW and Tan D. Expression of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 in human esophageal adenocarcinoma and its precursor lesions. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(8):1024-31.
- Findeis-Hosey JJ, Yang Q, Spaulding BO, Wang HL and Xu H. IMP3

expression is correlated with histologic grade of lung adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 2010;41(4):477-84.

Gallagher A, Armstrong AA, MacKenzie J, Shield L, Khan G, Lake A, Proctor S, Taylor P, Clements GB and Jarrett RF. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) genomes in the serum of patients with EBV-associated Hodgkin's disease. *Int J Cancer.* 1999;84(4):442-8.

Garcia JF, Camacho FI, Morente M, Fraga M, Montalban C, Alvaro T, Bellas C, Castano A, Diez A, Flores T, Martin C, Martinez MA, Mazorra F, Menarguez J, Mestre MJ, Mollejo M, Saez AI, Sanchez L and Piris MA. Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays. *Blood.* 2003;101(2):681-9.

Geller SA and Taylor CR. Thomas Hodgkin: the "man" and "his disease": *humani nihil a se alienum putabit* (nothing human was foreign to him). *Virchows Arch.* 2013;463(3):353-65.

Glaser SL, Clarke CA, Gulley ML, Craig FE, DiGiuseppe JA, Dorfman RF, Mann RB and Ambinder RF. Population-based patterns of human immunodeficiency virus-related Hodgkin lymphoma in the Greater San Francisco Bay Area, 1988-1998. *Cancer.* 2003;98(2):300-9.

Gobbi PG, Ferreri AJ, Ponzoni M and Levis A. Hodgkin lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2013;85(2):216-37.

Harris NL, Stein H, Coupland SE, Hummel M, Favera RD, Pasqualucci L and Chan WC. New approaches to lymphoma diagnosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2001:194-220.

Hasenclever D and Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's

- disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. *N Engl J Med.* 1998;339(21):1506-14.
- Herbeck R, Teodorescu Brinzeu D, Giubelan M, Lazar E, Dema A and Ionita H. B-cell transcription factors Pax-5, Oct-2, BOB.1, Bcl-6, and MUM1 are useful markers for the diagnosis of nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. *Rom J Morphol Embryol.* 2011;52(1):69-74.
- Hjalgrim H, Askling J, Rostgaard K, Hamilton-Dutoit S, Frisch M, Zhang JS, Madsen M, Rosdahl N, Konradsen HB, Storm HH and Melbye M. Characteristics of Hodgkin's lymphoma after infectious mononucleosis. *N Engl J Med.* 2003;349(14):1324-32.
- Hjalgrim H and Engels EA. Infectious aetiology of Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiological evidence. *J Intern Med.* 2008;264(6):537-48.
- Hodgkin. On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Med Chir Trans.* 1832;17:68-114.
- Hoffmann NE, Sheinin Y, Lohse CM, Parker AS, Leibovich BC, Jiang Z and Kwon ED. External validation of IMP3 expression as an independent prognostic marker for metastatic progression and death for patients with clear cell renal cell carcinoma. *Cancer.* 2008;112(7):1471-9.
- Husain AN, Colby TV, Ordonez NG, Krausz T, Borczuk A, Cagle PT, Chirieac LR, Churg A, Galateau-Salle F, Gibbs AR, Gown AM, Hammar SP, Litzky LA, Roggli VL, Travis WD and Wick MR. Guidelines for pathologic diagnosis of malignant mesothelioma: a consensus statement from the International Mesothelioma Interest Group. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133(8):1317-31.
- Ikeda K, Tate G, Suzuki T, Kitamura T and Mitsuya T. IMP3/L523S, a novel

- immunocytochemical marker that distinguishes benign and malignant cells: the expression profiles of IMP3/L523S in effusion cytology. *Hum Pathol.* 2010;41(5):745-50.
- INCA. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2014.
- Jiang Z, Chu PG, Woda BA, Liu Q, Balaji KC, Rock KL and Wu CL. Combination of quantitative IMP3 and tumor stage: a new system to predict metastasis for patients with localized renal cell carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2008;14(17):5579-84.
- Jiang Z, Chu PG, Woda BA, Rock KL, Liu Q, Hsieh CC, Li C, Chen W, Duan HO, McDougal S and Wu CL. Analysis of RNA-binding protein IMP3 to predict metastasis and prognosis of renal-cell carcinoma: a retrospective study. *Lancet Oncol.* 2006;7(7):556-64.
- Jiang Z, Lohse CM, Chu PG, Wu CL, Woda BA, Rock KL and Kwon ED. Oncofetal protein IMP3: a novel molecular marker that predicts metastasis of papillary and chromophobe renal cell carcinomas. *Cancer.* 2008;112(12):2676-82.
- Kemper P, Bendix K, Hamilton-Dutoit S, Honore B, Nyengaard JR and d'Amore F. Tumor-infiltrating macrophages correlate with adverse prognosis and Epstein-Barr virus status in classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica.* 2011;96(2):269-76.
- Kaplan EL and Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc.* 1958:457-81.
- Kaplan HS. Hodgkin's disease: biology, treatment, prognosis. *Blood.* 1981;57(5):813-22.

- King RL, Howard MT and Bagg A. Hodgkin lymphoma: pathology, pathogenesis, and a plethora of potential prognostic predictors. *Adv Anat Pathol.* 2014;21(1):12-25.
- King RL, Pasha T, Rouillet MR, Zhang PJ and Bagg A. IMP-3 is differentially expressed in normal and neoplastic lymphoid tissue. *Hum Pathol.* 2009;40(12):1699-705.
- Klimm B and Engert A. Combined modality treatment of Hodgkin's lymphoma. *Cancer J.* 2009;15(2):143-9.
- Kraus MD and Haley J. Lymphocyte predominance Hodgkin's disease: the use of bcl-6 and CD57 in diagnosis and differential diagnosis. *Am J Surg Pathol.* 2000;24(8):1068-78.
- Kuppers R, Kanzler H, Hansmann ML and Rajewsky K. Single cell analysis of Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Ann Oncol.* 1996;7 Suppl 4:27-30.
- Kuppers R, Rajewsky K, Zhao M, Simons G, Laumann R, Fischer R and Hansmann ML. 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 U S A.* 1994;91(23):10962-6.
- Landis SH, Murray T, Bolden S and Wingo PA. Cancer statistics, 1998. *CA Cancer J Clin.* 1998;48(1):6-29.
- Lee AF, Gown AM and Churg A. IMP3 and GLUT-1 immunohistochemistry for distinguishing benign from malignant mesothelial proliferations. *Am J Surg Pathol.* 2013;37(3):421-6.
- Levine PH, Pallesen G, Ebbesen P, Harris N, Evans AS and Mueller N. Evaluation of Epstein-Barr virus antibody patterns and detection of viral

- markers in the biopsies of patients with Hodgkin's disease. *Int J Cancer*. 1994;59(1):48-50.
- Liao B, Hu Y, Herrick DJ and Brewer G. The RNA-binding protein IMP-3 is a translational activator of insulin-like growth factor II leader-3 mRNA during proliferation of human K562 leukemia cells. *J Biol Chem*. 2005;280(18):18517-24.
- Lu D, Vohra P, Chu PG, Woda B, Rock KL and Jiang Z. An oncofetal protein IMP3: a new molecular marker for the detection of esophageal adenocarcinoma and high-grade dysplasia. *Am J Surg Pathol*. 2009;33(4):521-5.
- Lu J and Chang KL. Practical immunohistochemistry in hematopathology: a review of useful antibodies for diagnosis. *Adv Anat Pathol*. 2011;18(2):133-51.
- Lukes RJ and Butler JJ. The pathology and nomenclature of Hodgkin's disease. *Cancer Res*. 1966;26(6):1063-83.
- Marafioti T, Hummel M, Anagnostopoulos I, Foss HD, Falini B, Delsol G, Isaacson PG, Pileri S and Stein H. Origin of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease from a clonal expansion of highly mutated germinal-center B cells. *N Engl J Med*. 1997;337(7):453-8.
- McCune RC, Syrbu SI and Vasef MA. Expression profiling of transcription factors Pax-5, Oct-1, Oct-2, BOB.1, and PU.1 in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas: a comparative study using high throughput tissue microarrays. *Mod Pathol*. 2006;19(7):1010-8.
- Mentrikoski MJ, Ma L, Pryor JG, McMahon LA, Yang Q, Spaulding BO, Scott GA, Wang HL and Xu H. Diagnostic utility of IMP3 in segregating metastatic

melanoma from benign nevi in lymph nodes. *Mod Pathol.* 2009;22(12):1582-7.

Montalban C, Garcia JF, Abreira V, Gonzalez-Camacho L, Morente MM, Bello JL, Conde E, Cruz MA, Garcia-Sanz R, Garcia-Larana J, Grande C, Llanos M, Martinez R, Flores E, Mendez M, Ponderos C, Rayon C, Sanchez-Godoy P, Zamora J and Piris MA. Influence of biologic markers on the outcome of Hodgkin's lymphoma: a study by the Spanish Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol.* 2004;22(9):1664-73.

Nielsen J, Christiansen J, Lykke-Andersen J, Johnsen AH, Wewer UM and Nielsen FC. A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. *Mol Cell Biol.* 1999;19(2):1262-70.

Ott G, Balague-Ponz O, de Leval L, de Jong D, Hasserjian RP and Elenitoba-Johnson KS. Commentary on the WHO classification of tumors of lymphoid tissues (2008): indolent B cell lymphomas. *J Hematop.* 2009;2(2):77-81.

Pryor JG, Bourne PA, Yang Q, Spaulding BO, Scott GA and Xu H. IMP-3 is a novel progression marker in malignant melanoma. *Mod Pathol.* 2008;21(4):431-7.

Ranjan P and Naresh KN. CD30 expression in L&H cells of Hodgkin's disease, nodular lymphocyte predominant type. *Histopathology.* 2003;42(4):406-7.

Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Vassilakopoulos TP, Viviani S, Bonfante V, Nadali G, Herling M, Angelopoulou MK, Giardini R, Chilosi M, Kittas C, McDonnell TJ, Bonadonna G, Gianni AM, Pizzolo G, Pangalis GA, Cabanillas F and Sarris AH. BCL-2 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease predicts a poorer prognosis in patients treated with ABVD or equivalent regimens. *Blood.* 2002;100(12):3935-41.

- Reed DM. On the pathological changes in Hodgkin's disease, with especial reference to its relation to tuberculosis. *Johns Hopkins Hosp Rep.* 1902;(10):63.
- Roman E and Smith AG. Epidemiology of lymphomas. *Histopathology.* 2011;58(1):4-14.
- Sanchez-Espiridion B, Martin-Moreno AM, Montalban C, Figueroa V, Vega F, Younes A, Medeiros LJ, Alves FJ, Canales M, Estevez M, Menarguez J, Sabin P, Ruiz-Marcellan MC, Lopez A, Sanchez-Godoy P, Burgos F, Santonja C, Lopez JL, Piris MA and Garcia JF. MicroRNA signatures and treatment response in patients with advanced classical Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol.* 2013;162(3):336-47.
- Sanchez-Espiridion B, Montalban C, Lopez A, Menarguez J, Sabin P, Ruiz-Marcellan C, Ramos R, Rodriguez J, Canovas A, Camarero C, Canales M, Alves J, Arranz R, Acevedo A, Salar A, Serrano S, Bas A, Moraleda JM, Sanchez-Godoy P, Burgos F, Rayon C, Fresno MF, Larana JG, Garcia-Cosio M, Santonja C, Lopez JL, Llanos M, Mollejo M, Gonzalez-Carrero J, Marin A, Forteza J, Garcia-Sanz R, Tomas JF, Morente MM, Piris MA and Garcia JF. A molecular risk score based on 4 functional pathways for advanced classical Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2010;116(8):e12-7.
- Schmitz R, Stanelle J, Hansmann ML and Kuppers R. Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:151-74.
- Shi M, Fraire AE, Chu P, Cornejo K, Woda BA, Dresser K, Rock KL and Jiang Z. Oncofetal protein IMP3, a new diagnostic biomarker to distinguish malignant mesothelioma from reactive mesothelial proliferation. *Am J Surg*

Pathol. 2011;35(6):878-82.

Siegel R, Naishadham D and Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA Cancer J Clin. 2013;63(1):11-30.

Sitnikova L, Mendese G, Liu Q, Woda BA, Lu D, Dresser K, Mohanty S, Rock KL and Jiang Z. IMP3 predicts aggressive superficial urothelial carcinoma of the bladder. Clin Cancer Res. 2008;14(6):1701-6.

Smolewski P, Robak T, Krykowski E, Blasinska-Morawiec M, Niewiadomska H, Pluzanska A, Chmielowska E and Zambrano O. Prognostic factors in Hodgkin's disease: multivariate analysis of 327 patients from a single institution. Clin Cancer Res. 2000;6(3):1150-60.

Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, Delaney A, Jones SJ, Iqbal J, Weisenburger DD, Bast MA, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK, Rimsza LM, Campo E, Delabie J, Braziel RM, Cook JR, Tubbs RR, Jaffe ES, Lenz G, Connors JM, Staudt LM, Chan WC and Gascoyne RD. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. N Engl J Med. 2010;362(10):875-85.

Sternberg C. Ueber eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberkulose des lymphatischen Apparates. Z Heilk. 1898;(19):71.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA and Stein H. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and lymphoid tissues: IARC; 2008.

Swerdlow SH CE, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and lymphoid tissues IARC; 2008.

Szarvas T, vom Dorp F, Niedworok C, Melchior-Becker A, Fischer JW, Singer

- BB, Reis H, Bankfalvi A, Schmid KW, Romics I, Ergun S and Rubben H. High insulin-like growth factor mRNA-binding protein 3 (IMP3) protein expression is associated with poor survival in muscle-invasive bladder cancer. *BJU Int.* 2012;110(6 Pt B):E308-17.
- Tang H, Wei Q, Ge J, Jian W, Liu J, Zhong L, Fu B and Zhao T. IMP3 as a supplemental diagnostic marker for Hodgkin lymphoma. *Hum Pathol.* 2013;44(10):2167-72.
- Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, Went P, Pileri SA and Dirnhofer S. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica.* 2008;93(2):193-200.
- Vikesaa J, Hansen TV, Jonson L, Borup R, Wewer UM, Christiansen J and Nielsen FC. RNA-binding IMPs promote cell adhesion and invadopodia formation. *EMBO J.* 2006;25(7):1456-68.
- Wachter DL, Kristiansen G, Soll C, Hellerbrand C, Breuhahn K, Fritzsche F, Agaimy A, Hartmann A and Riener MO. Insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 (IMP3) expression in hepatocellular carcinoma. A clinicopathological analysis with emphasis on diagnostic value. *Histopathology.* 2012;60(2):278-86.
- Wachter DL, Schlabrakowski A, Hoegel J, Kristiansen G, Hartmann A and Riener MO. Diagnostic value of immunohistochemical IMP3 expression in core needle biopsies of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2011;35(6):873-7.
- Wilks S. Cases of Lardaceous diseases and some allied affections. *Guy's Hosp*

Rep. 1856;(2):28.

Wilks S. Cases of enlargement of the lymphatic glands and spleen, (or Hodgkin's disease), with remarks. Guy's Hosp Rep. 1865;(11):11.

Yaniv K, Fainsod A, Kalcheim C and Yisraeli JK. The RNA-binding protein Vg1 RBP is required for cell migration during early neural development. Development. 2003;130(23):5649-61.

Yantiss RK, Woda BA, Fanger GR, Kalos M, Whalen GF, Tada H, Andersen DK, Rock KL and Dresser K. KOC (K homology domain containing protein overexpressed in cancer): a novel molecular marker that distinguishes between benign and malignant lesions of the pancreas. Am J Surg Pathol. 2005;29(2):188-95.

Yu L, Xu H, Wasco MJ, Bourne PA and Ma L. IMP-3 expression in melanocytic lesions. J Cutan Pathol. 2010;37(3):316-22.

Zhao H, Mandich D, Cartun RW and Ligato S. Expression of K homology domain containing protein overexpressed in cancer in pancreatic FNA for diagnosing adenocarcinoma of pancreas. Diagn Cytopathol. 2007;35(11):700-4.

Zheng W, Yi X, Fadare O, Liang SX, Martel M, Schwartz PE and Jiang Z. The oncofetal protein IMP3: a novel biomarker for endometrial serous carcinoma. Am J Surg Pathol. 2008;32(2):304-15.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Avaliar as características anátomo-clínicas e imunofenotípicas em 61 casos de Linfoma de Hodgkin, incluindo análise do IMP3 como potencial biomarcador prognóstico.

2. Objetivos específicos

- Caracterização clínica: idade, sexo, localização anatômica, estadiamento, tratamento e sobrevida.
- Confirmação diagnóstica e caracterização histológica: subtipo histológico de acordo com a classificação da OMS.
- Caracterização imunofenotípica com avaliação dos seguintes marcadores: CD20, PAX5, CD3, CD30, CD15, CD45, LMP1 e MUM1/IRF4.

ARTIGO

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

**LINFOMA DE HODGKIN: CARACTERÍSTICAS ANÁTOMO-CLÍNICAS E
ANÁLISE DE NOVO BIOMARCADOR (IMP3)**

Marcelo P. de T. Moraes (1); Iverson X. Duarte (1); Fernando Augusto
Soares (2); Maria Aparecida C. Domingues (1)

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

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

Endereço de correspondência:

Profa Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues, MD, PhD

Departamento de Patologia

Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade de São Paulo

Distrito de Rubião Junior, s/n - Botucatu, São Paulo - Brasil

CEP: 18618-970 – Fone 14 38801658

e-mail: mdomingues@fmb.unesp.br

Título consecutivo: IMP3 em linfoma de Hodgkin

RESUMO

O Linfoma de Hodgkin (LH) é uma neoplasia hematopoiética que acomete caracteristicamente adultos jovens e apresenta, quando não tratado, curso clínico fatal. O diagnóstico precoce e preciso desse linfoma associado à terapia moderna, por outro lado, tem proporcionado diminuição dramática das taxas de letalidade. Ainda assim, cerca de 15-20% dos pacientes evoluem de maneira insatisfatória com resistência a terapia primária ou recaída precoce pós-tratamento. Nesse sentido, há estudos variados na tentativa de buscar perfis prognósticos capazes de selecionar pacientes candidatos a terapias particulares. O IMP3 (insulin-like growth factor mRNA binding protein 3) tem sido descrito como biomarcador relacionado a pior prognóstico em diversas neoplasias, especialmente carcinomas, mas ainda pouco estudado em neoplasias hematopoiéticas. Para avaliar seu potencial papel prognóstico no LH, foi estudado a expressão do IMP3 em 61 casos, incluindo estratificação da imunocoloração em intensidades (0, 1+, 2+ e 3+) e relação com sobrevida, dados clínicos, aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos. A expressão forte (intensidade 3+) para IMP3 foi observada em 61% (34/56) dos LH e apresentou forte indicio de associação com melhor sobrevida livre de doença. Nossos achados mostram o IMP3 como potencial biomarcador de melhor prognóstico em LH.

Palavras-chave: Linfoma de Hodgkin, sobrevida, IMP3

ABSTRACT

Hodgkin lymphoma (HL) is a hematopoietic neoplasm that characteristically affects young adults and, if untreated, presents a fatal clinical course. Early and accurate diagnosis of this lymphoma associated with modern therapeutic management, on the other hand, has promoted a dramatic decrease in mortality rates. Despite this, around 15-20% of patients show unsatisfactory progression, with resistance to primary therapy or early relapse following treatment. The literature comprises numerous studies attempting to determine prognostic profiles that are capable of selecting candidate patients for specific therapies. Insulin-like growth factor mRNA binding protein 3 (IMP3) has been described as a biomarker that indicates worse prognosis in several malignancies, particularly carcinomas; however, studies of IMP3 in hematopoietic malignancies are rare. To assess their potential prognostic role in HL, IMP3 expression was studied in 61 cases and included stratification of immunostaining intensities (0, +, ++ and +++) and their relation to status of life, clinical data and morphological and immunohistochemical features. Intense IMP3 expression (+++) was observed in 61% (34/56) cases and showed a strong indication of association with better disease-free survival. Our findings show that IMP3 is a potential biomarker of better prognosis in HL.

Keywords: Hodgkin lymphoma, IMP3, survival

INTRODUÇÃO

O Linfoma de Hodgkin (LH) corresponde a uma parcela significativa das neoplasias hematopoiéticas. A maioria destes casos evoluiria para desfecho fatal, se não tratado. Por outro lado a terapia citotóxica moderna proporcionou uma diminuição dramática das taxas de mortalidade e morbidade, incluindo cura em 80-90% dos pacientes jovens e com estágio clínico precoce.¹ Ainda assim, cerca de 15-20% dos pacientes evoluem de maneira insatisfatória com resistência a terapia primária ou recaída precoce pós-tratamento, geralmente nos primeiros dois anos.² Nesse contexto, há, na literatura médica recente, muitos estudos focados na seleção desses pacientes através da identificação de fatores prognósticos associados à falha terapêutica. Inicialmente, marcadores imuno-histoquímicos de desregulação do ciclo celular e apoptose foram relacionados com baixa resposta ao tratamento e/ou diminuição da sobrevida.³⁻⁷ A composição celular do microambiente tumoral, dada pela caracterização imunofenotípica de células T reativas, em especial baixa concentração de células FOXP3+ e alta densidade de células TIA-1+, foi também relacionado como marcador preditivo de pior prognóstico.^{8,9} Ainda, o fenótipo de ativação macrofágico/monocítico, identificado pelo acréscimo de macrófagos CD68+, foi correlacionado com recorrência precoce, recidiva pós-transplante autólogo de células tronco-hematopoiéticas e pior sobrevida.^{10,11} Mais recentemente, perfis de expressão gênica identificaram subtipos moleculares de LH com capacidade de estratificação de risco e predição da sobrevida.^{10, 12-14} Finalmente, análises da expressão de miRNA em LHC tem

demonstrado desregulação de alguns miRNAs específicos, incluindo *MIR21*, *MIR30E*, *MIR30D* e *MIR29B*, conferindo prognóstico desfavorável.¹⁵

O IMP3 (*insulin-like growth factor mRNA binding protein 3*) é uma proteína oncofetal, membro da família do fator de crescimento tipo insulina II (IGF-II), com importante função nas fases iniciais da embriogênese humana. Nesse período inicial, esta proteína é encontrada em epitélios primitivos, músculo e placenta, com papel crítico na migração celular e formação da placa de revestimento do tubo neural e, subsequentemente, migração da crista neural.¹⁶ Possui reconhecido papel carcinogênico fora do período embrionário inicial, com participação na proliferação de células tumorais, adesão, invasão e migração. Tem sido descrita sua presença em alguns tumores malignos e geralmente associada a neoplasias agressivas e avançadas,¹⁷⁻¹⁹ incluindo mesotelioma,²⁰⁻²³ carcinomas endometriais (seroso e de células claras),²⁴ adenocarcinoma esofágico,^{25, 26} carcinoma laríngeo,²⁷ leiomiossarcoma,²⁸ adenocarcinoma de pâncreas,²⁹⁻³¹ melanomas³²⁻³⁴ e hepatocarcinoma³⁵. Muito raramente pode ser encontrado em tecidos normais. Como marcador prognóstico independente já é utilizado em carcinomas de células renais,³⁶⁻³⁸ carcinomas uroteliais,^{39,40} adenocarcinomas pulmonares.⁴¹

King e col.⁴² avaliaram, em um estudo inicial, a superexpressão do IMP3 em tecidos linfoides não neoplásicos e em diversas neoplasia linfoides, incluindo 26 casos de LH, 26 casos de linfoma difuso de grandes células B (DLBCL), 12 casos de linfoma de Burkitt (LB) e 15 casos de linfoma folicular (LF). Eles encontraram expressão do IMP3 constante e fraca (escores 1+ e

2+) em células centrofoliculares de 21 controles normais (6 linfonodos, 6 baços, 4 tonsilas e 5 timos), além de positividade em todos os LH (intensidade forte), 83% dos LB (intensidade moderada) e em 85% dos LDGCB (intensidade variável). Nesse estudo, ainda, houve pequena proporção de imunocoloração, geralmente fraca (escores 1+ e 2+), em outros linfomas não centrogerminais derivados, incluindo expressão em 20% (2/10) dos linfomas do manto (LM), 10% (1/10) dos LAGC, 10% (1/10) dos linfomas linfocíticos (LL/LLC) e 8% (1/11) dos linfomas da zona marginal (LZM).

Em estudo mais recente, Tang e col.⁴³ avaliaram a expressão do IMP3 em 81 casos de LH, incluindo 10 casos de LHPLN, sugerindo seu uso como marcador diagnóstico. Eles encontraram imunoexpressão do IMP3, restritamente em células neoplásicas diagnósticas, em 99% dos casos, sendo a intensidade de imunocoloração forte (escore 3+) em 73% dos casos.

Não há na literatura médica atual investigações adicionais sobre o IMP3 como marcador prognóstico independente em neoplasias hematopoiéticas. Esse artigo foi desenhado para caracterização anátomo-clínica e imunofenotípica de 61 casos de LH incluindo avaliação da expressão do IMP3 como potencial marcador prognóstico.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção de casos

O estudo está fundamentado na revisão sistemática de 79 casos consecutivos de LH diagnosticados entre janeiro de 1999 e abril de 2014, pelo Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB)-UNESP. Essa amostragem tem abrangência regional, incluindo cidades adjacentes a Botucatu, assistidas pelo HCFMB. Os critérios de inclusão foram: 1) Enquadramento morfológico e imuno-histoquímico para o diagnóstico de LH; 2) disponibilidade de informações clínicas e, quando possível, de seguimento; 3) disponibilidade dos blocos de parafina. Sessenta e um casos cumpriram estes requisitos. As informações clínicas de relevância prognóstica registradas para o estudo incluíam idade, sexo, data do diagnóstico inicial, data do evento adverso e/ou óbito, quando presente, data do último contato, sintomas sistêmicos ao diagnóstico, estadiamento clínico (Ann Arbor) e terapêutica pertinente.

Sintomas sistêmicos ao diagnóstico foram considerados presentes quando o paciente apresentava febre de origem desconhecida, sudorese noturna ou perda ponderal maior que 10%, nos últimos seis meses. Informações relativas ao tratamento incluíam protocolo de tratamento, resposta à terapia (remissão completa, parcial, ou sem remissão), duração da resposta inicial, *status* do paciente (morto ou vivo, com ou sem evidência de linfoma). Esse estudo tem a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB – UNESP (protocolo 837.530; vide anexos).

Construção da micromatriz tecidual

Blocos de parafina de 61 casos estavam disponíveis e foram utilizados para a construção da micromatriz tecidual, utilizando *arrayer* de tecido biológico (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA). Dois cores de cada caso, medindo 1,0 mm cada, foram retirados do bloco original de parafina. Cortes seriados do bloco da micromatriz tecidual, medindo 3 µm de espessura, foram realizados e utilizados para o estudo imuno-histoquímico. A plataforma da micromatriz tecidual foi confeccionada em colaboração com o Hospital A.C Camargo, São Paulo.

Avaliação histológica

Os casos foram revisados por dois dos autores (MPTM e MACD) com a finalidade de confirmação do diagnóstico de LH e classificação de acordo com o proposto pela OMS.⁴⁴ Para tal, foram usados os cortes originais dos blocos de parafina dos casos bem como os cores correspondentes na micromatriz tecidual, corados pela técnica de H&E.

Estudo imuno-histoquímico

O estudo imuno-histoquímico foi realizado em secções histológicas do bloco de TMA, utilizando o polímero *EnVision*® (Dako, California, USA) como sistema de detecção. O método de recuperação antigênica foi realizado de acordo com a necessidade específica de cada anticorpo, utilizando módulo de pré-tratamento *PTLink*® (Dako, California, USA).

Foi considerado como positivo o caso que apresentou qualquer expressão nas células alvo para os seguintes marcadores imunohistoquímicos: CD20, CD3, CD30, CD15, CD45, LMP1, PAX5, MUM1/IRF4. Para interpretação do IMP3 foi considerada qualquer expressão citoplasmática. A imunoposição foi graduada de acordo com a intensidade em 0 (ausente), 1+ (fraco), 2+ (moderado) e 3+ (forte). Para efeito de comparação os casos com imunoposição em intensidades 0 (ausente), 1+ (fraco) e 2+ (moderado) foram agrupadas sob a denominação “IMP3 negativos” e os casos com imunopositividade 3+ (forte) foram denominados “IMP3 positivos”. Controles positivos e negativos foram utilizados para atestar a fidelidade das imunocolorações. Informações sobre anticorpos usados e diluições estão sumarizadas na Tabela 1.

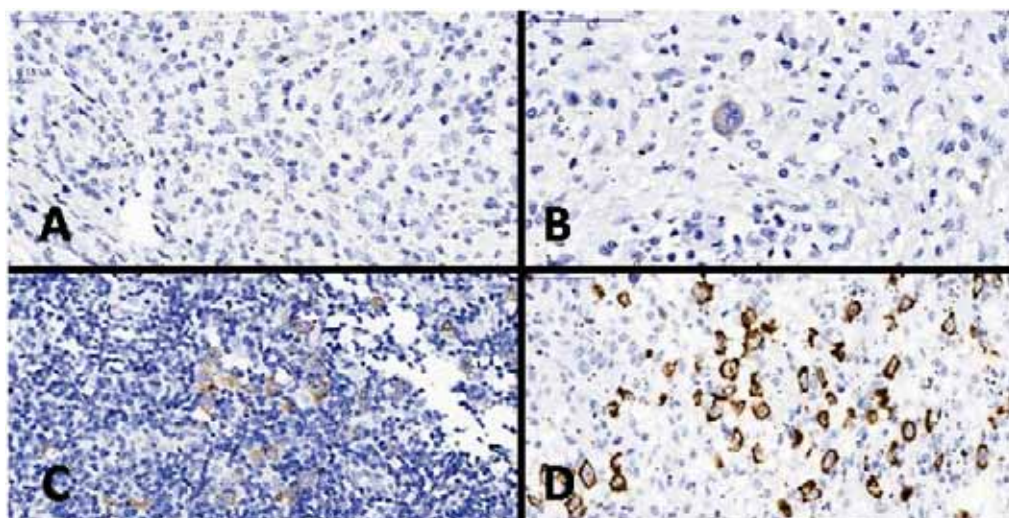


Figura 2 – Exemplos de semi-quantificação usada para avaliar a imunoposição para IMP3. A) Intensidade 0; B) Intensidade 1+; C) Intensidade 2+; D) Intensidade 3+.

Tabela 1. Especificações dos anticorpos primários, diluição e fonte

Anticorpo	Clone	Diluição	Fonte
CD30	Ber-H2	1:100	DAKO
CD20	L26	1:700	DAKO
CD15	C3D-1	1:150	DAKO
CD3	565	1:800	DAKO
CD45	DD7/26	1:250	DAKO
PAX5	ZP007	1:20	Biogenex
LMP1	CSI-4	1:100	DAKO
IMP3	69.1	1:100	DAKO
MUM1/IRF4	MUM1P	1:100	DAKO

Análise estatística

Para todas as variáveis pesquisadas foram levantadas as distribuições de frequência. A sobrevida geral foi calculada a partir da data do diagnóstico até a data do óbito ou do último contato. A sobrevida livre de doença foi obtida contando-se o período entre a data do diagnóstico e a data do primeiro evento adverso. Foram elaboradas tabelas de vida para todas as variáveis pesquisadas e com base nelas foi aplicada a técnica de Kaplan-Meier para avaliação da influência das variáveis pesquisadas na sobrevida geral e sobrevida livre de doença dos pacientes. Tempos médios de sobrevida foram estimados, sempre que possível, com base nessa técnica. Intervalos de confiança para os tempos médios de sobrevida foram obtidos com coeficiente de confiança de 95%. O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5%, sendo que, para todos os testes, o nível descritivo da estatística observada foi calculado (p).^{45, 46}

RESULTADOS

Achados clínicos

A população amostral foi de 61 pacientes diagnosticados com LH entre 1998 e 2014, com idades entre 15 e 72 anos. A mediana de idade foi de 26 anos. Trinta por cento (18/61) dos casos tinham idade >40 anos. Vinte e quatro pacientes eram do sexo feminino (39%) e trinta e sete do sexo masculino (61%).

Dos 61 casos, 59 casos tiveram apresentação nodal e apenas 2 casos foram de apresentação extranodal (coluna vertebral). O sítio anatômico nodal mais comum foi linfonodo cervical com 33 casos (54%), seguido de linfonodo axilar com 8 casos (13%) e linfonodo supraclavicular com 7 casos (11%). Presença de sintomas B ao diagnóstico foi identificada em 71% (37/52) casos. Trinta (81%) destes casos pertenciam ao subtipo esclerose nodular do linfoma de Hodgkin clássico. Vinte e cinco (51%; n=49) casos apresentaram estágio de Ann Arbor elevado (III e IV) ao diagnóstico. O comprometimento de medula óssea foi documentado em 14 casos (30%; n=47). Estes e outros dados detalhados relativos ao tratamento podem ser encontrados na Tabela 2.

Achados histológicos e imuno-histoquímicos

O subtipo histológico de linfoma de Hodgkin clássico mais prevalente foi o esclerose nodular, perfazendo 69% dos casos (42/61), seguido do subtipo celularidade mista (21%; 13/61). Dois casos foram classificados

como LHCDL (3%) e outros dois como LHPLN (3%). As apresentações extranodais (n=2) não foram subclassificadas. Nos 61 casos analisados nessa série, não houve nenhum representante do subtipo rico em linfócitos. A Tabela 2 apresenta a distribuição dos 61 casos de LH de acordo com a classificação OMS.

Todos os casos de LHC foram positivos para CD30 e negativos para CD45 e MUM1/IRF4. Os dois casos de LHPLN foram positivos para CD20, CD45 e MUM1/IRF4 e negativos para CD30, CD15 e LMP1. A expressão de CD20 foi observada em 12,5% (7/56) dos casos de LHC. O subtipo morfológico de LHC com maior expressão de CD20 foi o esclerose nodular (6/40). A positividade para PAX5 foi vista em 82% (46/56) dos LHC, sendo o subtipo esclerose nodular mais frequentemente positivo 85% (33/39). O padrão de imunocoloração do PAX5 foi, em todos os casos, mais fraco que o encontrado em linfócitos B não neoplásicos adjacentes. Vinte e nove casos de LHC (52%; n=56) foram positivos para CD15. A expressão de LMP1 foi encontrada em 34% (19/56) dos casos de LHC, sendo o subtipo celularidade mista o mais frequentemente associado à expressão desse marcador (54%; n=13). A expressão de IMP3 foi observada em 98% (55/56) dos casos de LHC e em um caso de LHPLN. A intensidade de imunocoloração foi 3+ (forte) em 58% (34/58) dos de LH. Nenhum (0/58) caso foi positivo para CD3. Um sumário dos achados morfológicos e imunofenotípicos é achado na Tabela 2.

Seguimento e sobrevida

Dados sobre a sobrevida geral estavam disponíveis em 57 casos, destes 51 estavam vivos, e dados de sobrevida livre de doença em 55 casos. A estimativa de sobrevida geral foi de $176 \pm 8,5$ meses, enquanto a estimativa de sobrevida livre de doença foi de 146 ± 12 meses. As curvas de sobrevida geral e sobrevida livre de doença foram calculadas (Figura 4A e Figura 4B). Não houve redução significativamente estatística das curvas de sobrevida relacionadas ao estadiamento clínico (Ann Arbor), subtipo histológico e expressão de CD20 (Tabela 2).

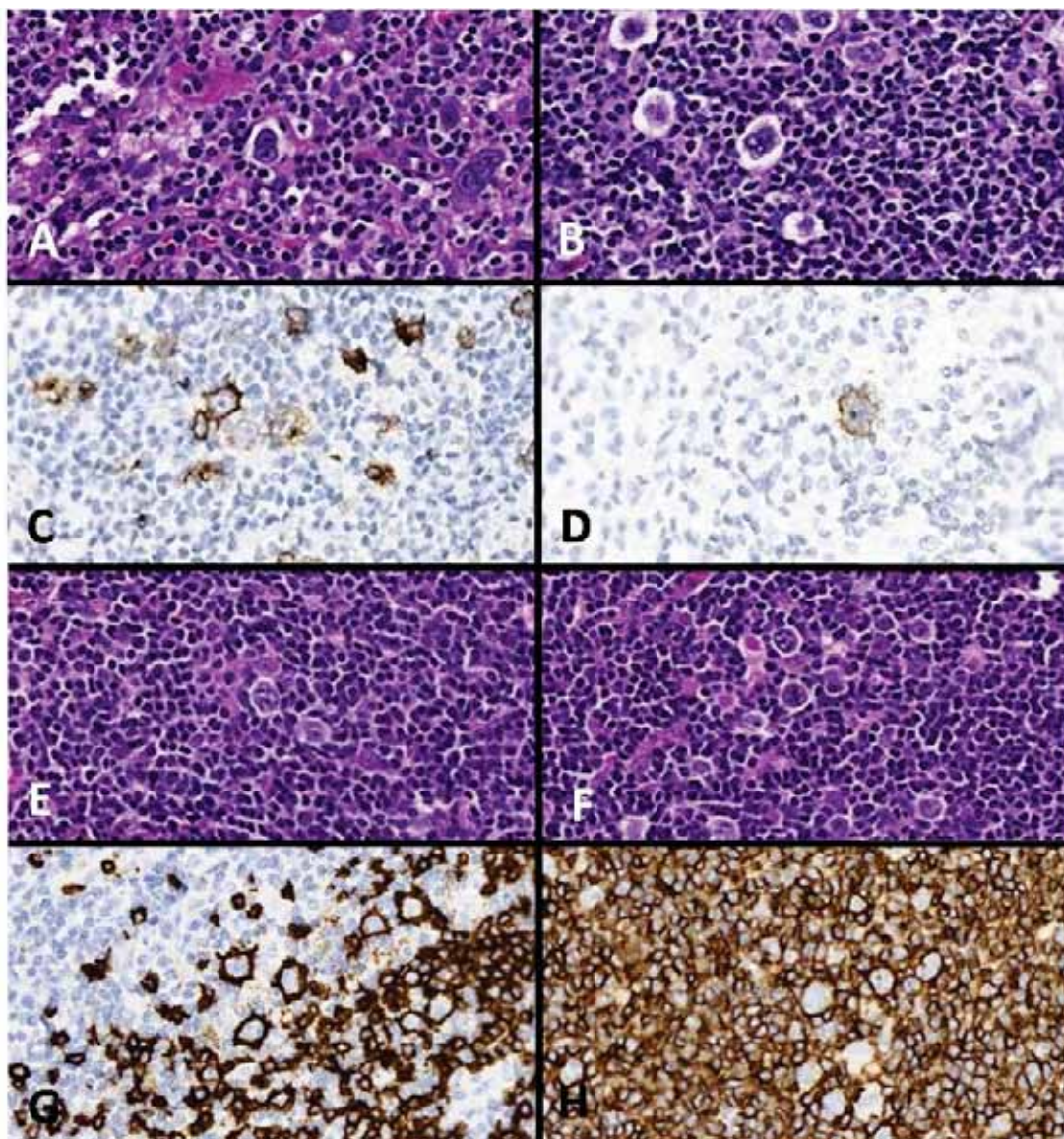


Figura 3 – Painel de exemplos de resultados morfológicos e imunofenotípicos: A) Célula de Reed-Sternberg em linfoma de Hodgkin clássico, variante celularidade mista (caso 9); B) Célula lacunar em linfoma de Hodgkin clássico, variante esclerose nodular (caso 22); C) Células diagnósticas do LHCEN imunocoradas pelo CD30 (caso 49); D) Células de Hodgkin imunocorada pelo CD15 (caso 58); E) e F) Células LP (predominância linfocítica) de padrão “popcorn” denominadas, no passado, células L&H (caso 51); G) Imunopositividade intensa e constante para CD20, nas células L&H do LHPLN (caso 10); H) Imunopositividade para CD45 (caso 51), em células L&H do LHPLN

Tabela 2. Informações clínicas e imunofenotípicas de 61 casos de linfoma de Hodgkin do HC/FMB/Unesp, de acordo com subtipos histológicos.

	LHC extranodal	Linfoma de Hodgkin Nodal				Total
		LHPLN	LHCEN	LHCCM	LHCDL	
TOTAL [% (casos)]	3 (2)	3 (2)	69 (42)	22 (13)	3 (2)	61
Idade [anos]						
Mediana	21	28	25	34	27	26
Faixa	20-22	16-40	15-72	18-69	17-38	15-72
M:F	1:1	2:0	26:16	6:7	2:0	37:24
SÍTIOS ANATÔMICOS						
Coluna vertebral (2)	Coluna vertebral (2)	Cervical (1)	Cervical (23)	Cervical (8)	Cervical	-
		Axilar (1)	Axilar (5)	Axilar (1)	(1)	-
			Inguinal (5)	Inguinal (2)	Axilar (1)	-
			Supracl. (5)	Supracl. (2)	-	-
			Mediastinal (4)	-	-	-
ESTADIO [% (+/testados)]						
I			8 (2/24)	10 (1/10)		6 (3/49)
II		50 (1/2)	71 (17/24)	30 (3/10)		43 (21/49)
III		50 (1/2)	29 (7/24)	10 (1/10)	100 (1/1)	20 (10/49)
IV	100 (2/2)		33 (8/24)	50 (5/10)		31 (15/49)
SINTOMAS B	50 (1/2)	-/2	81 (30/37)	50 (5/10)	100 (1/1)	71 (37/52)
ACOMETIMENTO DE MO	100 (2/2)	-/2	22 (7/32)	50 (5/10)	-/1	30 (14/47)

Tabela 2 (continuação)

	LHC extranodal	Linfoma de Hodgkin Nodal						Total
		LHPLN	LHCEN	LHCCM	LHCDL	LHCDL		
PROTOCOLO DE TRATAMENTO								
ABVD	2	-	21	6	1			30
ABVD+RTX	-	2	12	2	-			16
ABVD+BEACOPP	-	-	1	-	-			1
BEACOPP	-	-	1	-	-			1
BEACOPP+RTX	-	-	1	-	-			1
DHAP	-	-	-	2	-			2
MOPP-ABV+RTX	-	-	1	-	-			1
IMUNOFENÓTIPO [%(+/testados)]								
CD30	100 (2/2)	-/2	100 (39/39)	100 (13/13)	100 (2/2)			56/58
CD15	50 (1/2)	-/2	49 (19/39)	62 (8/13)	50 (1/2)			29/58
CD20	-/2	100 (2/2)	15 (6/40)	8 (1/13)	-/2			9/59
CD3	-/2	-/2	-/39	-/13	-/2			0/58
CD45	-/2	100 (2/2)	-/39	-/13	-/2			2/58
LMP1	-/2	-/2	28 (11/39)	54 (7/13)	50 (1/2)			19/58
PAX5	50 (1/2)	100 (2/2)	85 (33/39)	77 (10/13)	100 (2/2)			48/58
MUM1/IRF4	100 (2/2)	-/2	100 (38/38)	100 (13/13)	100 (2/2)			55/57
IMP3 intensidade 0	-	50 (1/2)	-	8 (1/13)	-			2/58
IMP3 intensidade 1+	-	-	5 (2/39)	8 (1/13)	50 (1/2)			4/58
IMP3 intensidade 2+	100 (2/2)	50 (1/2)	26 (10/39)	38 (5/13)	-			18/58
IMP3 intensidade 3+	-	-	69 (27/39)	46 (6/13)	50 (1/2)			34/58

Tabela 3. Resultado da imunomarcção para IMP3; correlação com aspectos clínicos e patológicos

Análise do IMP3:	IMP3 0 (n=2)	IMP3 1+ (n=4)	IMP3 2+ (n=18)	IMP3 3+ (n=34)
<i>Aspectos clínicos [%(+)]</i>				
Sexo: masculina	100 (2)	100 (4)	56 (10)	56 (19)
Idade>40 anos	50 (1)	25 (1)	28 (5)	18 (6)
Sintomas B	50 (1)	50 (2)	61 (11)	62 (21)
Estadio de Ann Arbor III-IV	100 (2)	50 (2)	56 (10)	29 (10)
Acometimento de medula óssea	50 (1)	25 (1)	44 (8)	9 (3)
<i>Aspectos imunofenotípicos [%(+)]</i>				
Positividade para CD20	50 (1)	25 (1)	11 (2)	15 (5)
Positividade para LMP1	-	50 (2)	28 (5)	35 (12)

Tabela 4. Associação de expectativa de vida com potenciais marcadores prognósticos em linfoma de Hodgkin

	Sobrevida livre de doença (meses)	Desvio padrão	Intervalo de confiança 95%	p
			Limite inferior	Limite superior
Geral	146	12	122	170
Idade	>40	20	46	123
	≤40	8	113	143
Sintomas B	Não	12	119	167
	Sim	11	83	128
Infiltração de MO	Não	11	120	164
	Sim	19	71	145
Estadio Ann Arbor	I ou II	10	135	175
	III ou IV	14	86	141
CD20	-	14	111	164
	+	0	139	139
LMP1	-	16	111	175
	+	16	85	149
PAX5	-	16	74	136
	+	9	93	128
IMP3	0/1+/2+	13	69	120
	3+	9	101	135

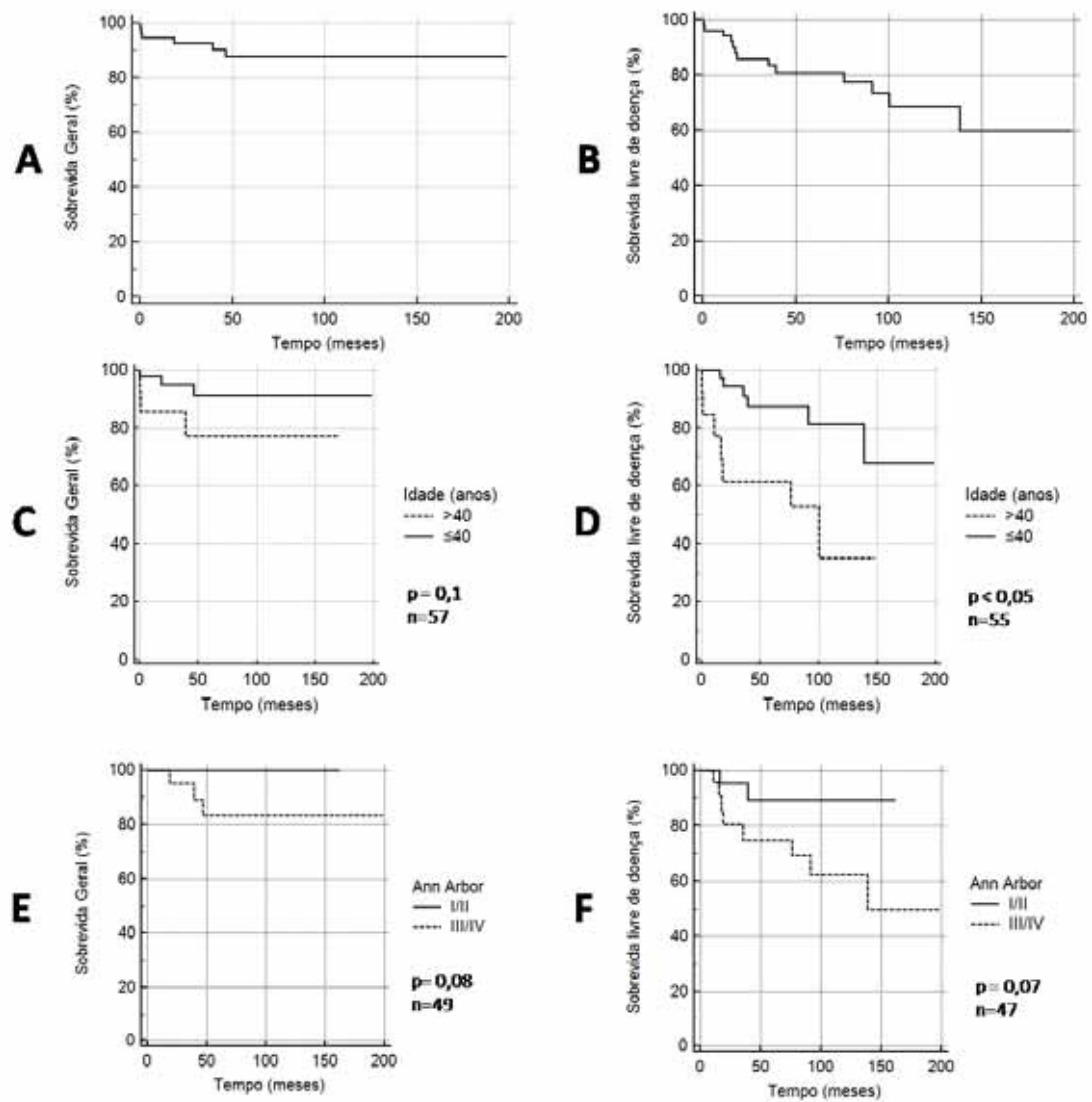


Figura 4 – Curvas de sobrevida geral e sobrevida livre de doença: A) Curva de sobrevida geral; B) Curva de sobrevida livre de doença; C) Curva de sobrevida geral relativa à idade; D) Curva de sobrevida livre de doença relativa à idade; E) Curva de sobrevida geral relativa ao estadiamento clínico (Ann Arbor); F) Curva de sobrevida livre de doença relativa ao estadiamento clínico (Ann Arbor)

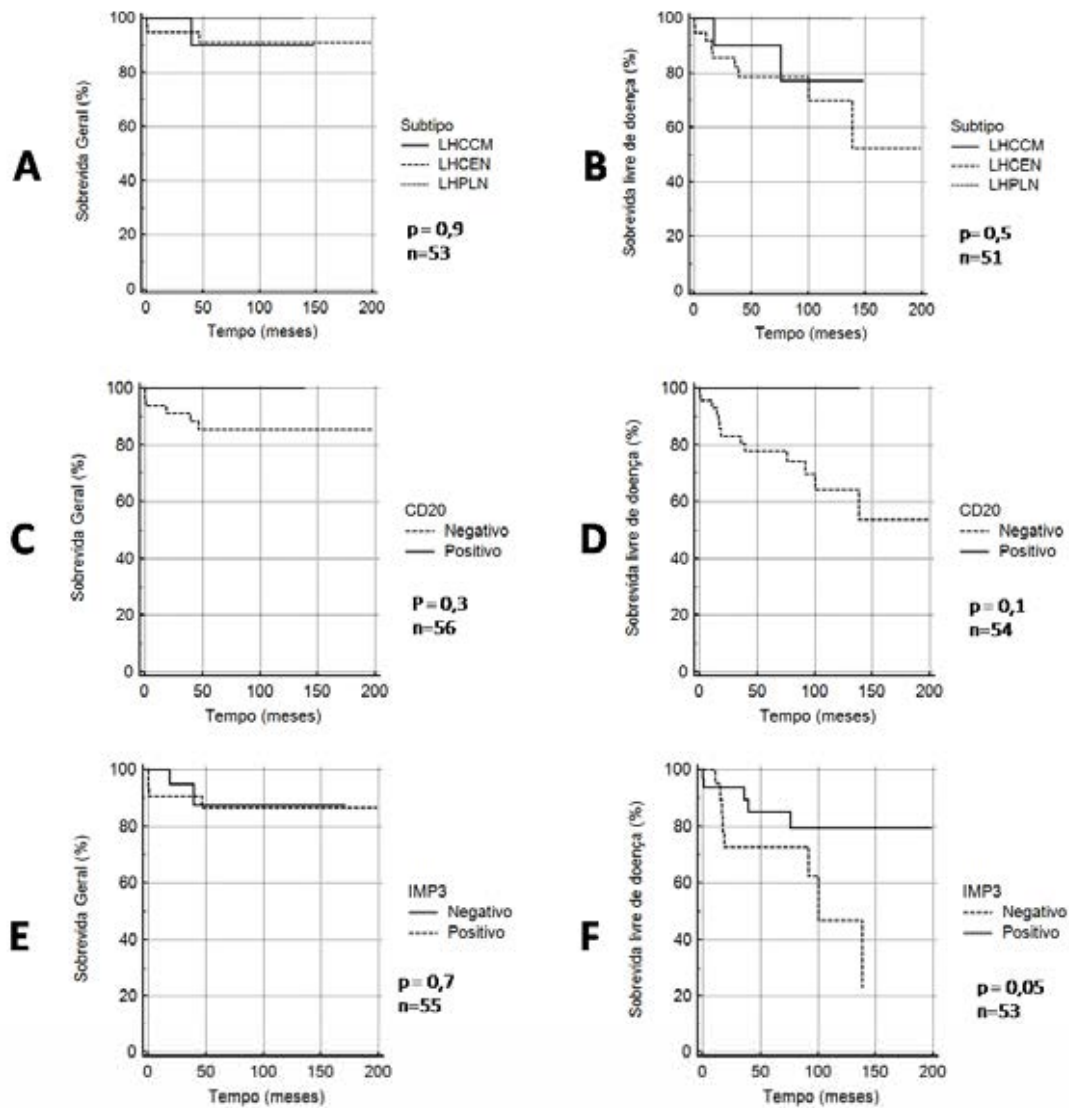


Figura 5 – Curvas de sobrevida geral e sobrevida livre de doença: A) Curva de sobrevida geral relativa ao subtipo histológico; B) Curva de sobrevida livre de doença relativa ao subtipo histológico; C) Curva de sobrevida geral relativa à expressão de CD20; D) Curva de sobrevida livre de doença relativa à expressão de CD20; E) Curva de sobrevida geral relativa à expressão de IMP3; F) Curva de sobrevida livre de doença relativa à expressão de IMP3

DISCUSSÃO

O LH é uma neoplasia maligna relativamente frequente com curso clínico fatal, quando não diagnosticado e tratado corretamente. Com o advento da terapia moderna, puderam-se alcançar taxas de cura da ordem de 80-90%, em pacientes jovens e com baixo estadiamento clínico. Na verdade o tratamento do LH é considerado, por alguns autores, como o maior sucesso na história da terapia oncológica do século XX.² Entretanto, uma fração significativa de casos, especialmente pacientes com doença avançada, não responde completamente a terapia primária ou apresenta recorrência após períodos curtos de remissão. Há, nesse sentido, grande debate na literatura, na tentativa de identificar fatores prognósticos de real impacto na sobrevida, selecionando esses grupos de pacientes com maior risco. Apesar da grande quantidade de fatores prognósticos elencados na literatura, estudos continuam com a intenção de refinar as classificações prognósticas, permitindo o desenvolvimento de terapias personalizadas.

No presente trabalho, foram avaliadas as características anátomo-clínicas e imunofenotípicas de uma série de LH com especial ênfase à expressão da proteína IMP3 e sua correlação com sobrevida.

Observamos, em relação à caracterização clínico-epidemiológica da nossa amostragem, o perfil classicamente descrito nas séries mundiais de LH, incluindo predomínio do sexo masculino (61%; 37/61) e acometimento tipicamente de jovens com mediana geral de idade igual a 26 anos. Em concordância com recente revisão realizada por Cuccaro e col.,² a idade maior que 40 anos teve, em nossa casuística, forte impacto na sobrevida livre de doença. Gobbi e col.,⁴⁷ descreveram a presença de sintomatologia, ao

diagnóstico em cerca de um terço dos casos de LH, dado francamente contrastante com nosso estudo que identificou sintomas ao diagnóstico em 71% (37/52) dos casos. O subtipo histológico mais frequentemente associado à presença de sintomatologia sistêmica foi esclerose nodular (30/37). A presença de sintomatologia ao diagnóstico é um reconhecido fator de risco no LH,⁴⁸ no entanto, em nossa série, não houve diferenças nas curvas de sobrevida geral e livre de doenças relativas a presença de sintomas. Vinte e cinco (51%; n=49) casos apresentaram estágio de Ann Arbor elevado (III e IV) ao diagnóstico e comprometimento de medula óssea foi documentado em 14 casos (30%; n=47), no entanto, para essas variáveis também não houve diferenças nas curvas de sobrevida geral e sobrevida livre de doença.

Em relação à distribuição dos subtipos histológicos constatamos padrão semelhante ao classicamente descrito pela OMS.⁴⁴ O subtipo mais comum em nosso estudo foi esclerose nodular, perfazendo 69% (42/61) dos casos, seguido do LHCCM representando 21% (13/61). Para o LHCEN foi nítido o acometimento de adultos jovens (mediana de idade igual a 25), no entanto não houve o ligeiro predomínio classicamente descrito para o sexo feminino, com apenas 16 (n=42) casos ocorrendo em mulheres. Nesse subgrupo foi observado envolvimento mediastinal frequente (4/42), além de baixo estadiamento, incluindo 45% (19/42) dos pacientes com estágio I e II. O descrito estágio avançado para o subgrupo celularidade mista foi observado em nossa casuística. Trinta e oito por cento (5/13) dos casos de LHCCM apresentava, ao diagnóstico, estágio IV, com acometimento de medula óssea em metade (5/10) dos casos. O LHPLN foi mais comum em adultos do sexo masculino (2/2) com baixo estágio clínico e sem envolvimento de medula

óssea. Não foi evidenciado comportamento diferenciado das curvas de sobrevida geral e sobrevida livre de doença entre os subtipos histológicos de LH.

O imunofenótipo dos subtipos de LHC foi similar e condizente com dados da literatura, incluindo expressão de CD30 em todos os casos e negatividade para CD45. King e col.⁴⁹ descreveram positividade de CD20 em até 40% dos casos e expressão de PAX5 em todos os casos. Em nossa casuística, a confirmação imuno-histoquímica da diferenciação B do LH foi menor. A expressão de CD20 foi identificada em 12,5% (9/59) dos casos de LHC, enquanto 82% (48/58) apresentaram positividade para PAX5. A explicação mais provável para esse fenômeno é que a positividade para esses marcadores ocorre de forma focal, em geral apenas em subgrupo de células neoplásicas. Dessa maneira, a avaliação segmentar do linfonodo (core de TMA), utilizada nesse estudo, determina uma menor sensibilidade na detecção de células imunocoradas.

Ao estudarmos a expressão do IMP3 no LH, identificamos um grupo (24/58) com nenhuma ou baixa positividade (intensidades 0, 1+ e 2+) para esse imunomarcador e um segundo grupo (34/58) com elevada expressão (intensidade 3+). Não houve diferenças nas curvas de sobrevida entre esses grupos, no entanto, há forte indicio estatístico de associação da expressão forte do IMP3 (intensidade 3+) com melhor sobrevida livre de doença.

Esse achado, além de inédito na literatura, contrasta com o comumente observado nas neoplasias sólidas, carcinomas em especial, nas quais a superexpressão da proteína IMP3 correlaciona-se com agressividade biológica e pior prognóstico. Uma possível explicação para essa diferença reside na

origem centrogerminativa do LH, local onde a proteína IMP3 é fisiologicamente, mas de maneira rudimentar, expressa. A perda da expressão constitucional dessa proteína, no LH, pode estar associada a outros desarranjos moleculares que determinam, por fim, comportamento biológico diferenciado. O estudo da expressão do IMP3 em outras neoplasia hematopoiéticas centrogerminais derivadas poderia apoiar essa teoria.

Em resumo, esse é o primeiro estudo a avaliar a expressão do IMP como fator prognóstico em LH. O índice estatístico de associação da expressão forte (intensidade 3+) do IMP3 com melhor sobrevida livre de doença é inédito na literatura e deve nortear, daqui por diante, a forma de leitura do IMP3, incluindo sua graduação em intensidades. É importante salientar, por outro lado, que novos estudos são necessários para elucidar o verdadeiro papel dessa proteína na linfomagenese e consolidar esse imunomarcador como fator preditivo de melhor prognóstico em LH.

REFERÊNCIAS

1. Klimm B, Engert A. Combined modality treatment of Hodgkin's lymphoma. *Cancer J* 2009; 15:143-149.
2. Cuccaro A, Bartolomei F, Cupelli E, et al. Prognostic factors in hodgkin lymphoma. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2014; 6:e2014053.
3. Garcia JF, Camacho FI, Morente M, et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays. *Blood* 2003; 101:681-689.
4. Montalban C, Garcia JF, Abaira V, et al. Influence of biologic markers on the outcome of Hodgkin's lymphoma: a study by the Spanish Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* 2004; 22:1664-1673.
5. Smolewski P, Robak T, Krykowski E, et al. Prognostic factors in Hodgkin's disease: multivariate analysis of 327 patients from a single institution. *Clin Cancer Res* 2000; 6:1150-1160.
6. Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Vassilakopoulos TP, et al. BCL-2 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease predicts a poorer prognosis in patients treated with ABVD or equivalent regimens. *Blood* 2002; 100:3935-3941.
7. Bai M, Papoudou-Bai A, Horianopoulos N, et al. Expression of bcl2 family proteins and active caspase 3 in classical Hodgkin's lymphomas. *Hum Pathol* 2007; 38:103-113.
8. Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT, et al. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11:1467-1473.
9. Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, et al. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2008; 93:193-200.
10. Steidl C, Lee T, Shah SP, et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2010; 362:875-885.
11. Kamper P, Bendix K, Hamilton-Dutoit S, et al. Tumor-infiltrating macrophages correlate with adverse prognosis and Epstein-Barr virus status in classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2011; 96:269-276.
12. Devilard E, Bertucci F, Trempat P, et al. Gene expression profiling

- defines molecular subtypes of classical Hodgkin's disease. *Oncogene* 2002; 21:3095-3102.
13. Chetaille B, Bertucci F, Finetti P, et al. Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome. *Blood* 2009; 113:2765-3775.
 14. Sanchez-Espiridion B, Montalban C, Lopez A, et al. A molecular risk score based on 4 functional pathways for advanced classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2010; 116:e12-17.
 15. Sanchez-Espiridion B, Martin-Moreno AM, Montalban C, et al. MicroRNA signatures and treatment response in patients with advanced classical Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 2013; 162:336-347.
 16. Nielsen J, Christiansen J, Lykke-Andersen J, et al. A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. *Mol Cell Biol* 1999; 19:1262-1270.
 17. Liao B, Hu Y, Herrick DJ, Brewer G. The RNA-binding protein IMP-3 is a translational activator of insulin-like growth factor II leader-3 mRNA during proliferation of human K562 leukemia cells. *J Biol Chem* 2005; 280:18517-18524.
 18. Vikesaa J, Hansen TV, Jonson L, et al. RNA-binding IMPs promote cell adhesion and invadopodia formation. *EMBO J* 2006; 25:1456-1468.
 19. Yaniv K, Fainsod A, Kalcheim C, Yisraeli JK. The RNA-binding protein Vg1 RBP is required for cell migration during early neural development. *Development* 2003; 130:5649-5661.
 20. Husain AN, Colby TV, Ordonez NG, et al. Guidelines for pathologic diagnosis of malignant mesothelioma: a consensus statement from the International Mesothelioma Interest Group. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133:1317-1331.
 21. Shi M, Fraire AE, Chu P, et al. Oncofetal protein IMP3, a new diagnostic biomarker to distinguish malignant mesothelioma from reactive mesothelial proliferation. *Am J Surg Pathol* 2011; 35:878-882.
 22. Lee AF, Gown AM, Churg A. IMP3 and GLUT-1 immunohistochemistry for distinguishing benign from malignant mesothelial proliferations. *Am J Surg Pathol* 2013; 37:421-426.
 23. Ikeda K, Tate G, Suzuki T, et al. IMP3/L523S, a novel immunocytochemical marker that distinguishes benign and malignant cells: the expression profiles of IMP3/L523S in effusion cytology. *Hum Pathol* 2010; 41:745-750.

24. Zheng W, Yi X, Fadare O, et al. The oncofetal protein IMP3: a novel biomarker for endometrial serous carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2008; 32:304-315.
25. Lu D, Vohra P, Chu PG, et al. An oncofetal protein IMP3: a new molecular marker for the detection of esophageal adenocarcinoma and high-grade dysplasia. *Am J Surg Pathol* 2009; 33:521-525.
26. Feng W, Zhou Z, Peters JH, et al. Expression of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 in human esophageal adenocarcinoma and its precursor lesions. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135:1024-1031.
27. Chen K, Cornejo KM, Ye W, et al. Oncofetal protein IMP3: a new diagnostic biomarker for laryngeal carcinoma. *Hum Pathol* 2013; 44:2126-2131.
28. Cornejo K, Shi M, Jiang Z. Oncofetal protein IMP3: a useful diagnostic biomarker for leiomyosarcoma. *Hum Pathol* 2012; 43:1567-1572.
29. Yantiss RK, Woda BA, Fanger GR, et al. KOC (K homology domain containing protein overexpressed in cancer): a novel molecular marker that distinguishes between benign and malignant lesions of the pancreas. *Am J Surg Pathol* 2005; 29:188-195.
30. Wachter DL, Schlabrakowski A, Hoegel J, et al. Diagnostic value of immunohistochemical IMP3 expression in core needle biopsies of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2011; 35:873-877.
31. Zhao H, Mandich D, Cartun RW, Ligato S. Expression of K homology domain containing protein overexpressed in cancer in pancreatic FNA for diagnosing adenocarcinoma of pancreas. *Diagn Cytopathol* 2007; 35:700-704.
32. Yu L, Xu H, Wasco MJ, et al. IMP-3 expression in melanocytic lesions. *J Cutan Pathol* 2010; 37:316-322.
33. Pryor JG, Bourne PA, Yang Q, et al. IMP-3 is a novel progression marker in malignant melanoma. *Mod Pathol* 2008; 21:431-437.
34. Mentrikoski MJ, Ma L, Pryor JG, et al. Diagnostic utility of IMP3 in segregating metastatic melanoma from benign nevi in lymph nodes. *Mod Pathol* 2009; 22:1582-1587.
35. Wachter DL, Kristiansen G, Soll C, et al. Insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 (IMP3) expression in hepatocellular carcinoma. A clinicopathological analysis with emphasis on diagnostic value. *Histopathology* 2012; 60:278-286.
36. Hoffmann NE, Sheinin Y, Lohse CM, et al. External validation of IMP3 expression as an independent prognostic marker for metastatic

- progression and death for patients with clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 2008; 112:1471-1479.
37. Jiang Z, Chu PG, Woda BA, et al. Analysis of RNA-binding protein IMP3 to predict metastasis and prognosis of renal-cell carcinoma: a retrospective study. *Lancet Oncol* 2006; 7:556-564.
 38. Jiang Z, Lohse CM, Chu PG, et al. Oncofetal protein IMP3: a novel molecular marker that predicts metastasis of papillary and chromophobe renal cell carcinomas. *Cancer* 2008; 112:2676-2682.
 39. Sitnikova L, Mendese G, Liu Q, et al. IMP3 predicts aggressive superficial urothelial carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res* 2008; 14:1701-1706.
 40. Szarvas T, vom Dorp F, Niedworok C, et al. High insulin-like growth factor mRNA-binding protein 3 (IMP3) protein expression is associated with poor survival in muscle-invasive bladder cancer. *BJU Int* 2012; 110:E308-317.
 41. Findeis-Hosey JJ, Yang Q, Spaulding BO, et al. IMP3 expression is correlated with histologic grade of lung adenocarcinoma. *Hum Pathol* 2010; 41:477-484.
 42. King RL, Pasha T, Roullet MR, et al. IMP-3 is differentially expressed in normal and neoplastic lymphoid tissue. *Hum Pathol* 2009; 40:1699-1705.
 43. Tang H, Wei Q, Ge J, et al. IMP3 as a supplemental diagnostic marker for Hodgkin lymphoma. *Hum Pathol* 2013; 44:2167-2172.
 44. Swerdlow SH CE, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and lymphoid tissues 4edn, IARC2008.
 45. Cox DR. Regression models and life-tables. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* 1972:187-220.
 46. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958:457-481.
 47. Gobbi PG, Ferreri AJ, Ponzoni M, Levis A. Hodgkin lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2013; 85:216-237.
 48. Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. *N Engl J Med* 1998; 339:1506-1514.
 49. King RL, Howard MT, Bagg A. Hodgkin lymphoma: pathology, pathogenesis, and a plethora of potential prognostic predictors. *Adv Anat Pathol* 2014; 21:12-25.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- A expressão forte (intensidade 3+) para IMP3 nas células de Hodgkin apresentou forte indicio de associação com melhor sobrevida livre de doença;
- Para a interpretação imuno-histoquímico do IMP3 deve ser utilizado um sistema de semiquantificação da intensidade de imunocoloração, com clivagem entre grupos de expressão de alta intensidade (3+) e expressão de baixa intensidade (1+, 2+) ou ausência de expressão (0);
- Não foi evidenciada diferença significativa para as curvas de sobrevida geral e sobrevida livre de doença nas seguintes variáveis: subtipo histológico, sintomas B, infiltração de medula óssea, estágio Ann Arbor, expressão de CD20, expressão de LMP1 e expressão de PAX5.

ANEXO 1: Termo de consentimento livre e esclarecido.

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa: Linfoma de Hodgkin: características anátomo-clínicas e análise do novo biomarcador IMP3

A JUSTIFICATIVA, OS OBJETIVOS E OS PROCEDIMENTOS: O motivo que nos leva a estudar o LINFOMA DE HODGKIN é que essa é uma neoplasia relativamente comum (alta prevalência) que se não tratada possui elevada mortalidade, mas com diagnóstico precoce e tratamento apropriado possui bom prognóstico. O objetivo desse projeto é avaliar a utilidade diagnóstica e prognóstica de um novo biomarcador imuno-histoquímico (IMP3). O material previamente coletado, armazenado em nossos arquivos e utilizado no diagnóstico de sua neoplasia, será novamente examinado sem qualquer necessidade de novas abordagens ou coletas.

DESCONFORTOS E RISCOS E BENEFÍCIOS: Tomaremos todos os cuidados para que não ocorra qualquer dano ao material de estudo (blocos de parafina contendo amostra da neoplasia), no entanto existe a possibilidade de desgaste parcial dessa amostragem, no momento da confecção de novos cortes histológicos. Esse risco é mínimo e se justifica, uma vez que a presente pesquisa poderá determinar um novo parâmetro prognóstico para sua doença.

FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSINTÊNCIA: Caso o presente estudo identifique algum fator prognóstico que possa determinar algum tipo de mudança ou readequação de seu tratamento, você e seu médico assistente serão avisados.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO: Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada junto ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) e outra será fornecida a você.

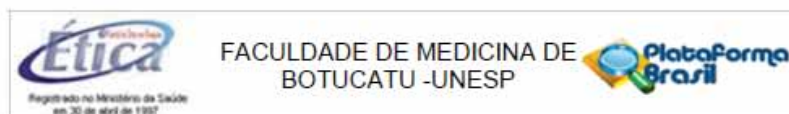
CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS: A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

DECLARAÇÃO DA PARTICIPANTE OU DO RESPONSÁVEL PELA PARTICIPANTE: Eu, _____ fui informada (o) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. A professora orientadora Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues certificou-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar o estudante Marcelo Padovani de Toledo Moraes ou a professora orientadora Dra Maria Aparecida Custódio Domingues no telefone (14) 38801658 ou o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) no telefone (14) 38801609.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome	Assinatura do Participante	Data
Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
Nome	Assinatura da Testemunha	Data

ANEXO 2: Parecer consubstanciado do CEP (versão resumida)**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Linfoma de Hodgkin: características anátomo-clínicas e análise do novo biomarcador IMP3

Pesquisador: Marcelo Padovani de Toledo Moraes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 38536814.2.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Patologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 837.530

Data da Relatoria: 19/10/2014

Considerações sobre os Temos de apresentação obrigatória:

Pendências:

Os autores solicitaram dispensa do TCLE entretanto, foi solicitado que redigissem um TCLE para os casos que ainda estivessem em seguimento no serviço. Pendência atendida, e TCLE adequado.

Recomendações:

Sugiro aprovação, sem necessidade de envio a CONEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de Pesquisa APROVADO, deliberado em reunião extraordinária do CEP de 20 de Outubro de 2.014, sem necessidade de envio à CONEP.

ANEXO 3: Tabela geral de casos

#	Sexo	EA	Idade	MO	OMS	Óbito	SG	SLD	Local	Sint B	Estadio	Terapia	HIV	CD20	CD30	CD15	LMP1	IMP3+	MUM1	PAX5
1	M	N	34	S	LHCEN	N	199	199	LN axilar	S	4	MOPP-ABV+RTX	N	-	+	-	+	3+	+	+
2	M	S	48	ND	LHCEN	N	171	100	LN suprac	ND	ND	ABVD+RTX	S	-	+	-	+	1+	ND	-
3	M	N	24	S	LHCEN	N	170	170	LN cervical	S	4	ABVD+RTX	N	I	I	I	I	I	I	I
4	F	N	22	N	LHCEN	N	162	162	LN cervical	S	2	ABVD	N	-	+	-	-	3+	+	+
5	M		21	ND	LHCEN	ND	ND	ND	LN inguinal	ND	ND	ND	ND	-	+	-	-	3+	+	+
6	F	S	22	N	LHCEN	N	139	139	LN cervical	S	3	ABVD	N	-	+	-	-	2+	+	+
7	M	N	42	N	LHCCM	N	148	148	LN axilar	N	3	ABVD	N	-	+	+	-	3+	+	+
8	M	N	34	N	LHCCM	N	141	141	LN cervical	S	1	ND	N	-	+	+	+	3+	+	-
9	F	N	42	S	LHCCM	N	144	144	LN cervical	N	4	ABVD	N	-	+	-	+	3+	+	+
10	M	N	40	N	LHPLN	N	139	139	LN cervical	N	2	ABVD+RTX	N	+	-	-	-	2+	-	+
11	M	N	18	ND	LHCCM	N	132	132	LN cervical	ND	ND	ND	N	-	+	+	+	1+	+	+
12	F	S	20	S	LHC	N	137	91	Coluna vert	N	4	ABVD	N	-	+	+	-	2+	+	-
13	M	N	31	ND	LHCCM	N	ND	119	LN cervical	ND	ND	ABVD	N	-	+	-	-	3+	+	+
14	F	N	25	N	LHCEN	N	117	117	LN cervical	N	2	ABVD	N	-	+	-	-	3+	+	+
15	M	N	20	N	LHCEN	N	120	120	LN mediast	S	2	ABVD+RTX	N	-	+	-	-	3+	+	+
16	F	N	40	N	LHCEN	N	118	118	LN inguinal	S	3	ABVD	N	-	+	+	-	3+	+	+
17	F	N	25	N	LHCEN	N	108	108	LN cervical	N	1	ABVD+RTX	N	-	+	+	-	3+	+	+
18	M		53	ND	LHCEN	S	1	ND	LN axilar	S	ND	ABVD	N	-	+	+	+	3+	+	+
19	M	N	22	ND	LHCEN	N	91	91	LN cervical	ND	ND	ND	N	-	+	+	-	3+	+	+
20	M	N	32	S	LHCEN	N	93	93	LN cervical	S	4	ABVD	N	-	+	-	-	2+	+	-
21	M	N	56	S	LHCCM	N	98	98	LN inguinal	S	4	ABVD	N	-	+	-	-	0	+	-
22	M	N	24	ND	LHCEN	N	56	ND	LN cervical	N	2	ABVD	N	-	+	+	+	3+	+	+
23	F	N	23	ND	LHCEN	N	33	ND	LN cervical	N	2	ABVD	N	-	+	+	-	3+	+	+
24	F	N	19	N	LHCEN	N	93	93	LN cervical	N	3	ABVD	N	-	+	+	+	3+	+	+

#	Sexo	EA	Idade	MO	OMS	Óbito	SG	SLD	Local	Sint B	Estadio	Terapia	HIV	CD20	CD30	CD15	LMP1	IMP3+	MUM1	PAX5
25	M		45	N	LHCEN	N	ND	94	LN axilar	S	3	ABVD	N	-	+	+	+	2+	+	+
26	M	S	21	N	LHCEN	N	93	39	LN cervical	S	2	ABVD+RTX	N	-	+	-	-	3+	+	+
27	M	N	43	N	LHCEN	N	ND	90	LN cervical	S	2	ABVD+RTX	N	-	+	-	+	3+	+	+
28	M		31	ND	LHCEN	ND	ND	ND	LN cervical	S	ND	ND	ND	-	+	+	-	3+	+	+
29	F		25	N	LHCEN	N	92	92	LN suprac	S	2	ABVD	N	+	+	+	-	2+	+	-
30	F	N	37	N	LHCEN	N	82	82	LN cervical	S	3	ABVD	N	-	+	+	+	3+	+	+
31	M	N	72	S	LHCEN	N	83	83	LN cervical	S	4	ABVD	N	-	+	-	-	2+	+	-
32	M	N	22	S	LHCEN	N	13	13	LN cervical	S	4	ABVD+BEACOPP	N	+	+	-	-	1+	+	+
33	F	N	22	N	LHCEN	N	13	ND	LN cervical	S	3	BEACOPP	N	-	+	+	-	3+	+	+
34	F		56	ND	LHCCM	ND	ND	ND	LN cervical	ND	ND	ND	ND	-	+	+	+	2+	+	+
35	F	S	44	S	LHCCM	S	40	18	LN cervical	N	4	ABVD	N	-	+	+	+	2+	+	-
36	M	N	16	ND	LHCEN	N	64	64	LN inguinal	ND	ND	ND	N	+	+	-	-	3+	+	+
37	M	N	29	N	LHCEN	N	72	72	LN mediast	S	2	BEACOPP+RTX	N	-	I	I	I	I	I	I
38	M	N	34	N	LHCCM	N	66	66	LN cervical	N	2	ABVD+RTX	N	-	+	-	+	2+	+	+
39	F	N	23	S	LHCCM	N	2	2	LN cervical	S	4	ABVD	N	-	+	-	-	2+	+	+
40	M	N	44	N	LHCEN	N	74	74	LN inguinal	S	2	ABVD	N	-	+	-	+	3+	+	-
41	F	S	34	N	LHCEN	S	47	35	LN cervical	S	3	ABVD+RTX	N	-	+	+	-	3+	+	+
42	M	N	28	N	LHCEN	N	52	52	LN cervical	N	1	ABVD+RTX	N	+	+	-	+	3+	+	+
43	F	N	24	N	LHCCM	N	46	46	LN suprac	N	2	ABVD+RTX	N	-	+	+	-	2+	+	+
44	F		64	ND	LHCEN	ND	ND	ND	LN axilar	ND	ND	ND	ND	I	I	I	I	I	I	I
45	M	N	16	N	LHCEN	N	49	49	LN suprac	S	2	ABVD+RTX	N	-	+	-	-	3+	+	+
46	M	S	17	N	LHCDL	S	18	18	LN cervical	S	3	ABVD	N	-	+	+	-	1+	+	+
47	M	N	26	N	LHCEN	N	39	39	LN suprac	N	2	ABVD	N	-	+	+	-	2+	+	-
48	M	N	20	N	LHCEN	N	28	28	LN axilar	S	2	ABVD	N	-	+	+	-	2+	+	+
49	F	N	15	N	LHCEN	N	34	34	LN cervical	S	4	ABVD	N	+	+	+	-	3+	+	+
50	F	N	25	N	LHCEN	N	34	34	LN suprac	S	2	ABVD+RTX	N	+	+	+	-	3+	+	+

#	Sexo	EA	Idade	MO	OMS	Óbito	SG	SLD	Local	Sint B	Estadio	Terapia	HIV	CD20	CD30	CD15	LMP1	IMP3+	MUM1	PAX5	
51	M	S	32	S	LHCEN	N	16	15	LN inguinal	S	4	ABVD	N	-	+	-	+	2+	+	+	
52	M	N	16	N	LHPLN	N	29	29	LN axilar	N	3	ABVD+RTX	N	+	-	-	-	0	-	-	+
53	M	S	47	N	LHCEN	N	23	16	LN mediast	S	2	ABVD+RTX	N	-	+	-	-	2+	+	+	
54	F	N	25	N	LHCCM	N	16	16	LN suprac	S	2	DHAP	N	+	+	+	-	3+	+	+	
55	F	S	44	S	LHCEN	N	19	ND	LN mediast	S	4	ABVD	N	-	+	-	-	2+	+	+	
56	M	N	38	ND	LHCDL	S	0	ND	LN axilar	ND	ND	ND	S	-	+	-	+	3+	+	+	
57	M	N	22	S	LHC	N	12	12	Coluna vert	S	4	ABVD	N	-	+	-	-	2+	+	+	
58	F	N	18	N	LHCEN	N	10	10	LN cervical	S	2	ABVD+RTX	N	-	+	+	-	3+	+	+	
59	M	N	62	ND	LHCEN	S	0	ND	LN cervical	S	ND	ABVD	N	-	+	+	-	3+	+	+	
60	M	N	25	N	LHCEN	N	8	8	LN cervical	S	2	ABVD	N	-	+	-	-	3+	+	+	
61	F	S	69	S	LHCCM	N	78	76	LN inguinal	S	4	DHAP	N	-	+	+	+	3+	+	+	