



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA



AMANDA OLIVEIRA DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO PARA DIAGNÓSTICO DE LINFOMA DE
HODGKIN POR CITOMETRIA DE FLUXO MULTIPARAMÉTRICA

Rio de Janeiro

2023

Amanda Oliveira dos Santos

DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO PARA DIAGNÓSTICO DE LINFOMA DE
HODGKIN POR CITOMETRIA DE FLUXO MULTIPARAMÉTRICA

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Clínica
Médica, Faculdade de Medicina,
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como parte dos requisitos necessários a
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadoras:

Profª Drª Elaine Sobral da Costa

Drª Cristiane de Sá Ferreira Facio

Profª Drª Daiana Lopes

CIP - Catalogação na Publicação

O48d Oliveira dos Santos, Amanda
Desenvolvimento de um protocolo para diagnóstico de linfoma de Hodgkin por citometria de fluxo multiparamétrica / Amanda Oliveira dos Santos. -- Rio de Janeiro, 2023.
70 f.

Orientadora: Elaine Sobral da Costa.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, 2023.

1. Linfoma de Hodgkin. 2. Citometria de Fluxo.
3. Diagnóstico. I. Sobral da Costa, Elaine , orient.
II. Título.

Amanda Oliveira dos Santos

DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO PARA DIAGNÓSTICO DE LINFOMA DE
HODGKIN POR CITOMETRIA DE FLUXO MULTIPARAMÉTRICA

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Clínica
Médica, Faculdade de Medicina,
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como parte dos requisitos necessários a
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em:

Prof. Dr. Marcelo Gerardin Poirot Land

Doutor em Saúde Coletiva pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (1997)

Professor titular da Universidade Federal do Rio de Janeiro

Membro Interno

Presidente da banca

Prof^ª. Dr^ª Maria Cláudia Santos da Silva

Doutora em Farmacologia pela Universidade Federal de Santa Catarina (2002)

Professora Titular da Universidade Federal de Santa Catarina

Membro Externo

Prof^ª Dr^ª Cristiane Bedran Milito

Doutora em Clínica Médica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (2004)

Professora Associada da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro

Membro Interno

AGRADECIMENTOS

Nenhum estudo é realizado sozinho. A ciência é construída, demanda debates, uma visão crítica e um coração que compreenda a complexidade das questões enfrentadas. E se um mestrado já não fosse complexo por si só, o período tão delicado que foi o da pandemia confirmou mais uma vez papel único e insubstituível das pessoas que contribuíram para o trabalho aqui apresentado.

Minha gratidão não cabe em simples parágrafos. Passei anos dentro do Laboratório Multidisciplinar do IPPMG e ele não só me permitiu descobrir minha vocação, mas encontrar pessoas maravilhosas, que se tornaram minha família.

Aqui agradeço a Professora Dr^a Cecília Menks que foi essencial para escrita e submissão do projeto para o Programa de Pós-Graduação. Agradeço imensamente as minhas orientadoras Professora Dr^a Elaine Sobral, Dr^a. Cristiane Facio e Professora Dr^a Daiana Lopes por terem me recebido de braços abertos, por me ensinarem todo o potencial da citometria de fluxo e pela oportunidade de explorar diferentes projetos.

Os últimos três anos me permitiram não só grande enriquecimento acadêmico, teórico e prático, como também minha primeira experiência em congresso internacional. Foi uma honra apresentar o trabalho do grupo e nada disso teria sido possível sem o apoio da minha família, de todo o corpo de funcionários do laboratório e o apoio de velhos e novos amigos. São tantos nomes que gostaria de mencionar, mas aqui registro meu carinho especial àqueles que me acompanharam nesses últimos anos, constituindo uma base cheia de amor. Agradeço a Antônia, Elen, Isabella, Jean, Lisis, Luciana, Monique, Rafael, Patrícia, Seu Assis, tia Vânia, Vitor assim como agradeço a cada uma das famílias dos pacientes e aos próprios pacientes, que são o propósito desse trabalho.

Por fim, gostaria de relembrar as pessoas que já partiram, mas marcaram imensamente minha jornada, a Professora Sandra Pellegrini, que me aceitou no ensino médio como sua aluna e abriu as portas da UFRJ. E aos meus queridos familiares, meu avô, Armando, e minha tia Maria Zenilda. Vocês sempre estarão no meu coração.

RESUMO

OLIVEIRA dos SANTOS, Amanda. **Desenvolvimento de um protocolo para diagnóstico de linfoma de Hodgkin por citometria de fluxo multiparamétrica.** Rio de Janeiro, 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências - Clínica Médica) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023

O linfoma de Hodgkin (LH) é o câncer mais comum entre adolescentes na faixa dos 15 aos 19 anos. De todos os casos, cerca de 95% correspondem a casos de linfoma de Hodgkin Clássico (LHC). Para o diagnóstico desta neoplasia, o método padrão ouro compreende a avaliação morfológica associada a avaliação imunohistoquímica, que demandam tempo. Embora a citometria de fluxo multiparamétrica (CFM) seja o método de escolha para o diagnóstico das leucemias e linfomas não-Hodgkin, sua utilidade no diagnóstico de LHC foi estabelecida somente nos anos 2000. Este estudo propõe a CFM como método auxiliar para acelerar a identificação das células Hodgkin/Reed-Sternberg (H/R-S) e tem como principal objetivo selecionar, dentre os anticorpos estudados, aqueles que apresentam maior poder de discriminação entre as células neoplásicas e as células do infiltrado imune. Foram analisadas 100 amostras de 79 pacientes com suspeita de linfoma, por meio da marcação de 12 anticorpos monoclonais, distribuídos em duas combinações distintas. A primeira combinação compreendeu os marcadores: CD3, CD5 ou HLADR, CD15, CD20, CD30, CD45, CD56 e CD123. Enquanto a segunda combinação compreendeu: CD15, CD30, CD40, CD45, CD56, CD95, nuPAX5 e FVS780. Após avaliação, foi possível estabelecer que os anticorpos que apresentam maior poder de discriminação foram: CD30, CD45, CD15, CD20, CD40, CD95 e nuPAX5. Quando comparada aos métodos padrão ouro de diagnóstico, a primeira combinação de anticorpos apresentou sensibilidade de 51%, especificidade de 100%, valor preditivo positivo de 100% e valor preditivo negativo de 90%, resultando na acurácia de 91%. Já na segunda combinação, a sensibilidade foi de 81%, especificidade de 100%, o valor preditivo positivo foi de 100% e valor preditivo negativo de 90%, o que resultou na acurácia de 93%. O número mínimo de eventos adquiridos para garantir diagnóstico por CFM também calculado e estimado em um milhão de eventos. Como desfecho adicional, este estudo se destaca como pioneiro na identificação de células H/R-S, por meio da CFM, em sítios como o sistema nervoso central, medula óssea, líquido e efusão pericárdica. Em conclusão, esse estudo corrobora que o diagnóstico de LHC por CFM é factível e destaca-se ao provar a utilidade da CFM na avaliação de infiltração em sítios raramente acometidos.

Palavras-Chave: Linfoma de Hodgkin Clássico. Citometria de Fluxo Multiparamétrica Diagnóstico

ABSTRACT

OLIVEIRA dos SANTOS, Amanda Oliveira. **Desenvolvimento de um protocolo para diagnóstico de linfoma de Hodgkin por citometria de fluxo multiparamétrica.** Rio de Janeiro, 2023. Dissertação (Mestrado Ciências - Clínica Médica) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023

Hodgkin lymphoma (HL) is the most common cancer among adolescents aged 15 to 19. Classical Hodgkin lymphoma (CHL) comprises approximately 95% of all cases of HL. Gold standard diagnosis of CHL requires morphological and immunohistochemical evaluation, which takes time. Although multiparametric flow cytometry (CFM) is the method of choice for the diagnosis of leukemias and non-Hodgkin's lymphomas, its usefulness in diagnosing CHL has only been established in the 2000s. This study proposes CFM as an auxiliary method to accelerate the identification of Hodgkin/Reed-Sternberg (H/R-S) cells. The main objective of this study is to determine, among the tested antibodies, those that have greater distinguishing power between neoplastic cells and cells of the immune infiltrate. A total of 100 samples from 79 patients with suspected lymphoma were evaluated through staining of 12 monoclonal antibodies, distributed between two antibody panels. The first panel comprised the antibodies: CD3, CD5 or HLADR, CD15, CD20, CD30, CD45, CD56 and CD123. While the second panel comprised: CD15, CD30, CD40, CD45, CD56, CD95, nuPAX5 and FVS780. After evaluation, CD30, CD45, CD15, CD20, CD40, CD95 and nuPAX5 were established as the antibody combination with the greatest distinguishing power. When compared to standard diagnostic methods, the first panel showed a sensitivity of 51%, specificity of 100%, positive predictive value of 100% and negative predictive value of 90%, leading to an accuracy of 91%. In the second combination, the sensitivity was 81%, the specificity was 100%, the positive predictive value was 100% and the negative predictive value was 90%, which resulted in an accuracy of 93%. The minimum number of events acquired to guarantee diagnosis by CFM was also calculated and estimated at one million events. As an additional outcome, this study is the first in our knowledge, to identify H/R-S cells through CFM in sites such as the central nervous system, bone marrow, cerebrospinal fluid and pericardial effusion. In conclusion, this study confirms that the diagnosis of LHC by CFM is feasible and stands out by proving its usefulness in evaluating infiltration in rarely affected sites.

Keywords: Classical Hodgkin Lymphoma, Flow Cytometry, Diagnosis

LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Taxas globais de incidência e mortalidade para linfoma de Hodgkin em 2020.	25
Figura 2 Ontogenia dos linfócitos B.....	30
Figura 3 Características morfológicas do linfoma de Hodgkin.....	33
Figura 4 Perfil imunohistoquímico das células H/R-S.	37
Figura 5 Representação esquemática do funcionamento do citômetro e geração de dados.	42
Figura 6 Representação da estratégia de seleção e doublets e debris na análise do primeiro tubo.	56
Figura 7 Representação da estratégia de seleção e células mortas e debris na análise do segundo tubo.....	56
Figura 8 Representação esquemática do fluxo de trabalho.	60
Figura 9 Análise da expressão dos marcadores CD15, CD30, CD45 nas células H/R-S, na primeira combinação de anticorpos.	67
Figura 10 Análise da expressão dos marcadores da linhagem linfóide na primeira combinação de anticorpos.....	68
Figura 11 Análise da expressão dos marcadores HLADR e smCD123 nas células H/R-S.....	69
Figura 12 Análise da expressão dos marcadores CD15, CD30 e CD45 nas células H/R-S na segunda combinação de anticorpos.	70
Figura 13 Análise da expressão dos marcadores dos marcadores CD40, CD56, CD95 e nuPAX5 nas células H/R-S.....	71
Figura 14 Análise do padrão imunofenotípico de linfócitos T/NK e linfócitos B, na primeira combinação de anticorpos.	73
Figura 15 Perfil imunofenotípico das populações de monócitos e neutrófilos na primeira combinação de anticorpos.	74
Figura 16 Perfil imunofenotípico das populações de monócitos e neutrófilos na primeira combinação de anticorpos (Continuação).....	75
Figura 17 Perfil imunofenotípico das populações de eosinófilos e células dendríticas e basófilos na primeira combinação de anticorpos.....	76
Figura 18 Perfil imunofenotípico das populações de eosinófilos e células dendríticas e basófilos na primeira combinação de anticorpos (Continuação).....	77
Figura 19 Análise do padrão imunofenotípico de linfócitos T/NK e linfócitos B, na segunda combinação de anticorpos.	78

Figura 20 Perfil imunofenotípico das populações de neutrófilos e monócitos na segunda combinação de anticorpos.....	79
Figura 21 Perfil imunofenotípico das populações de neutrófilos e monócitos na segunda combinação de anticorpos (Continuação)..	80
Figura 22 Perfil imunofenotípico das populações de eosinófilos na segunda combinação de anticorpos.....	81
Figura 23 Perfil imunofenotípico das populações de eosinófilos na segunda combinação de anticorpos (Continuação). Dot plots representando a expressão dos marcadores CD45.....	82
Figura 24 Análise Canônica para definição dos marcadores que melhor distinguem as populações avaliadas dentro da primeira combinação de anticorpos.	83
Figura 25 Análise Canônica para definição dos marcadores que melhor distinguem as populações avaliadas dentro da segunda combinação de anticorpos.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Combinações de anticorpos avaliadas para identificação das células Hodgkin/Reed-Sternberg	59
Tabela 2 Descritivo dos pacientes e amostras do estudo.	63
Tabela 3 Descritivo das amostras infiltradas por células H/R-S	65
Tabela 4 Perfil imunofenotípico das células H/R-S no tubo HD1	67
Tabela 5 Perfil imunofenotípico das células H/R-S no tubo HD2.....	70
Tabela 6 Descritivo do número de eventos e viabilidade por tipo de amostra, referente a primeira versão do tubo HD	85
Tabela 7 Descritivo do número de eventos e viabilidade por tipo de amostra, referente a segunda versão do tubo HD	86
Tabela 8 Comparação entre número de eventos adquiridos e o diagnóstico por CFM.	87
Tabela 9 Análises estatísticas referentes as duas versões do tubo HD.	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABVD	doxorrubicina, bleomicina, vimblastina e dacarbazina
BCR	do inglês, <i>B cell receptor</i>
BEACOPP	bleomicina, etoposídeo, adriamicina, ciclofosfamida, oncovin, procarbazona e prednisona
BSA	do inglês, <i>bovine serum albumin</i>
CA	do inglês, <i>Canonical Analysis</i>
CD	do inglês, <i>Cluster Differentiation</i>
CFM	citometria de fluxo multiparamétrica
EBV	do inglês, Epstein-Barr vírus
H/R-S	Hodgkin/Reed-Sternberg
HD	do inglês, <i>Hodgkin Disease</i>
HIV	do inglês, <i>human immunodeficiency virus</i>
ICCC-3*	do inglês, <i>Internacional Classification of Childhood Cancer version 3</i>
Ig	Imunoglobulina
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LDH	lactato desidrogenase
LGCB-M	linfoma de grandes células B do mediastino
LH	linfoma de Hodgkin
LHC	linfoma de Hodgkin clássico
LHCCM	linfoma de Hodgkin clássico subtipo celularidade mista
LHCDL	linfoma de Hodgkin clássico subtipo depleção linfocitária
LHCEN	linfoma de Hodgkin clássico subtipo esclerose nodular
LHCRL	linfoma de Hodgkin clássico subtipo rico em linfócitos
LHPLN	linfoma de Hodgkin predomínio linfocítico nodular
LNH	linfoma não Hodgkin
LST	do inglês, <i>Lymphoid Screening Tube</i>
MOPP	Mecloretamina, Oncovin, Procarbazona, Prednisona
OMS	Organização Mundial da Saúde

PBS	do inglês, <i>Phosphate buffered solution</i>
PCR	proteína C reativa
PET-CT	do inglês, <i>positron emission tomography</i>
REAL	do inglês, <i>Revised European-American lymphoma classification</i>
SLC	do inglês, <i>surrogate light chain</i>
SNC	sistema nervoso central
TACTH	transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas
TCR	do inglês, <i>T cell receptor</i>
VHS	velocidade de hemossedimentação
ZC	Zona clara
ZE	Zona escura

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	HISTÓRICO DO LINFOMA DE HODGKIN	21
2.2	EPIDEMIOLOGIA DO LINFOMA DE HODGKIN	23
2.3	FISIOPATOLOGIA DO LINFOMA DE HODGKIN.....	25
2.3.1	Um breve histórico da identificação da origem das células de Reed-Sternberg.....	26
2.4	MATURAÇÃO LINFÓIDE B E CORRELAÇÃO COM A CÉLULA H/R-S	27
2.5	APRESENTAÇÃO CLÍNICA DO LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO	30
2.6	DIAGNÓSTICO DO LINFOMA DE HODGKIN	32
2.6.1	Análise morfológica.....	32
2.6.2	Avaliação imunohistoquímica.....	34
2.7	DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LINFOMAS	37
2.8	CITOMETRIA DE FLUXO MULTIPARAMÉTRICA (CFM).....	40
2.9	CONTRIBUIÇÃO DA CFM NO DIAGNÓSTICO DE NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS	42
2.10	CITOMETRIA E LINFOMA DE HODGKIN.....	44
3	JUSTIFICATIVA.....	49
4	OBJETIVOS	50
4.1	OBJETIVO GERAL	50
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
5	METODOLOGIA.....	51
5.1	DESENHO DO ESTUDO	51
5.2	LOCAL DO ESTUDO.....	51
5.3	CRITÉRIOS DE SELEÇÃO AMOSTRAL.....	51
5.3.1	Critérios de Inclusão	51
5.3.2	Critérios de Exclusão	51
5.3.3	Considerações éticas	51
5.3.4	Coleta de dados clínicos	52
5.4	COLETA DAS AMOSTRAS.....	52

5.4.1	Procedimento inicial de coleta de amostras e encaminhamento ao laboratório de citometria	52
5.5	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DE BIÓPSIA DE LINFONODO OU TECIDO	53
5.6	<i>BULK LYSIS</i> PARA AMOSTRAS DE MEDULA ÓSSEA A SANGUE PERIFÉRICO 54	
5.7	PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE OUTROS FLUIDOS BIOLÓGICOS	55
5.8	ANÁLISE DE VIABILIDADE	55
5.9	MARCAÇÃO DA AMOSTRA COM ANTICORPOS MONOCLONAIS	57
5.10	CALIBRAÇÃO E COMPENSAÇÃO DO CITÔMETRO	58
5.11	PROCESSO DE AQUISIÇÃO DOS TUBOS	58
5.12	ESTRATÉGIA DE PROCESSAMENTO POR CITOMETRIA DE FLUXO	59
5.13	ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS E IMUNO-HISTOQUÍMICAS	60
5.14	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	61
6	RESULTADOS.....	62
6.1	DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO E AMOSTRAS ESTUDADAS.....	62
6.1.1	Descrição do total de amostras.....	62
6.1.2	Descrição das amostras infiltradas por células H/R-S	64
6.2	PERFIL IMUNOFENOTÍPICO DAS CÉLULAS H/R-S.....	66
6.3	IDENTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS H/R-S VERSUS INFILTRADO IMUNE.....	72
6.4	SELEÇÃO DOS MARCADORES MAIS IMPORTANTES PARA DISTINÇÃO DAS CÉLULAS H/R-S E OUTRAS POPULAÇÕES	83
6.5	ANÁLISE DO NÚMERO DE EVENTOS E VIABILIDADE CELULAR	84
6.5.1	Análise de total das amostras	84
6.5.2	Análise das amostras de pacientes com LHC.....	86
6.6	ANÁLISE DE CONCORDÂNCIA ENTRE AVALIAÇÃO IHQ VERSUS CFM.....	88
7	DISCUSSÃO.....	89
8	CONCLUSÃO.....	97
	APÊNDICE:	108
	ANEXOS.....	128

ANEXO A	128
ANEXO B	133
ANEXO C	138
ANEXO D	140

1 INTRODUÇÃO

O linfoma é responsável por cerca de 15% de todos os casos de câncer pediátrico no mundo, sendo o terceiro tipo mais comum de câncer nessa população, atrás apenas das leucemias e neoplasias do sistema nervoso central (STELIAROVA-FOUCHER et al., 2017). Eles são classificados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em dois grandes grupos, o linfoma de Hodgkin (LH) e o linfoma não-Hodgkin (LNH) (ALAGGIO et al., 2022). O linfoma de Hodgkin compreende cerca de 10-15% dos casos de linfomas, e embora seja incomum, é o câncer mais comum entre adolescentes na faixa dos 15-19 anos (JAMIL; MUKKAMALLA, 2023; MOMOTOW et al., 2021). No Brasil, o número estimado de novos casos de linfoma de Hodgkin para cada ano do triênio de 2023 a 2025, é de 3.080 casos, o que corresponde a um risco estimado de 1,41 por 100 mil habitantes (SANTOS et al., 2023).

Na infância e adolescência, o LH possui epidemiologia complexa e apresenta grande variabilidade em incidência de acordo com faixa etária, sexo e grupos socioeconômicos/localização geográfica (HUANG et al., 2022). A maior parte dos casos acontece entre 10 e 19 anos de vida, sendo que há predomínio do sexo masculino na infância e do sexo feminino na adolescência. Além disso, países em desenvolvimento apresentam maior frequência de LH em crianças menores. Apesar disso, apresenta as melhores taxas de cura entre as neoplasias, alcançando mais de 80% de sobrevida a longo prazo (BORCHMANN; EICHENAUER; ENGERT, 2012). Essa neoplasia compreende duas entidades patológicas distintas, que se diferenciam em morfologia e imunofenótipo: o linfoma de Hodgkin clássico (LHC) que corresponde a 95% dos casos, e o linfoma de Hodgkin predomínio linfocítico nodular (LHPLN) que corresponde aos 5% restantes (KÜPPERS; ENGERT; HANSMANN, 2012). O LHC pode ser classificado quatro subtipos : esclerose nodular, celularidade mista, depleção linfocítica e rico em linfócitos (ALAGGIO et al., 2022). Além do subtipo histopatológico, o perfil do infiltrado de células imunes presente no tumor tem sido estudado pela sua influência na redução a resposta imune antitumoral e como um possível fator prognóstico que pode direcionar a intensidade do tratamento (GEORGOULIS et al., 2023).

A linfadenopatia cervical é sua apresentação clínica mais recorrente, e ainda assim apenas 22% dos pacientes que apresentam linfonodomegalias são diagnosticados com linfoma (BOSCH et al., 2014). O diagnóstico precoce e preciso dessa neoplasia é essencial, pois células

com morfologia e imunofenótipo similares as células de Hodgkin/Reed-Sternberg (H/R-S) são identificadas em outros tipos de LNH, e cada linfoma demanda um esquema terapêutico distinto (AGGARWAL; LIMAIEM, 2022; PARENTE et al., 2020; O'MALLEY et al., 2019).

Atualmente, o método padrão-ouro para diagnóstico do LH inclui a identificação de células H/R-S por meio da análise morfológica associada à avaliação imunohistoquímica. Em casos de diagnóstico diferencial, é necessário a análise da expressão de um painel de anticorpos monoclonais que tenham capacidade de distinguir as células H/R-S de outras células do infiltrado imune, como também de outras neoplasias. Esse processo pode ser longo, atrasando o início do tratamento (AGGARWAL; LIMAIEM, 2022).

Desde o final dos anos 80, a citometria de fluxo multiparamétrica (CFM) é o método de escolha para a caracterização e classificação das leucemias agudas (ORFAO et al., 1999). No final dos anos 90 começou a ser utilizada também para seguimento de doença residual mensurável (CAMPANA; COUSTAN-SMITH, 1999; ORFAO et al., 1994), e já no século atual também foi incorporada ao fluxo de diagnóstico de LNH (STETLER-STEVENSON, 2003). A CFM permite a avaliação de milhares de células por segundo, com resultado em poucas horas, entretanto, exige a dissociação tecidual. Comparada a imunohistoquímica, tem a vantagem da rapidez e diagnóstico precoce e a desvantagem da perda da arquitetura tecidual. Apesar disso, a citometria de fluxo até as duas últimas décadas não era cogitada para o diagnóstico de linfoma. Apenas nos últimos anos a avaliação de LHC por citometria de fluxo vem ganhando força, com painéis sendo testados para a identificação das células neoplásicas (GREWAL et al., 2019). Como é necessária a avaliação do perfil do infiltrado de células imunes presente no tumor (GEORGOULIS et al., 2023), a citometria vem se apresentando como uma técnica interessante para essa finalidade adicional.

A importância do diagnóstico nos estágios iniciais da doença ainda é discutida, mas novas técnicas de detecção precoce podem acelerar o processo de estratificação de pacientes (LAMB et al., 2019), guiando a abordagem terapêutica e reduzindo o impacto dos efeitos adversos nos pacientes em longo prazo. No presente estudo desenhamos e testamos novas combinações de anticorpos para detecção e identificação das células H/R-S simultaneamente a identificação do perfil de células imunes que infiltram o tumor. Nosso objetivo foi identificar dentro desses painéis de anticorpos monoclonais, os marcadores que apresentam maior capacidade de discriminar as células neoplásicas do infiltrado imune característico do LHC.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRICO DO LINFOMA DE HODGKIN

O linfoma de Hodgkin foi descrito pela primeira vez em 1832, por Sir Thomas Hodgkin, por meio de uma série de sete estudos de casos publicados no artigo “*On some morbid cases of the absorbent glands and spleen*”. Neles, todos os pacientes apresentavam linfonodomegalias indolores associadas a esplenomegalias. A distinção dessa neoplasia para outras patologias comuns da época foi um desafio, já que sua descrição contava apenas com observações clínicas e avaliações obtidas por meio da autópsia de pacientes (HODGKIN, 1832). Após sua publicação, o trabalho de Hodgkin é revisitado apenas em 1865, quando Samuel Wilks publica suas observações acerca de casos similares aos descritos por Hodgkin, cunhando o termo “Doença de Hodgkin” (STONE, 2010).

Apesar de já caracterizada, as primeiras descrições microscópicas da doença foram feitas apenas em 1872 e 1878, seguidas pela identificação das células que viriam a ser centrais para o diagnóstico. As ilustrações e observações feitas por Carl Sternberg, em 1898, e Dorothy Reed, em 1902, foram essenciais para distinção do linfoma de Hodgkin de outras doenças comuns na época. Reed foi a responsável pela distinção de linfoma de Hodgkin e tuberculose, e contribuiu para a diferenciar de outras neoplasias, como carcinomas (LAKHTAKIA; BURNEY, 2015).

Várias classificações foram propostas para categorizar subgrupos de linfoma de Hodgkin ao longo dos anos. A primeira classificação histológica a ganhar reconhecimento acadêmico foi a proposta por Jackson e Parker em 1947, na qual o Linfoma de Hodgkin era dividido em paragranuloma, granuloma e sarcoma, de acordo com sua morfologia e agressividade. Em 1960, uma nova classificação foi proposta por Lukes e Butler, por meio da qual eram definidos seis subgrupos: linfocítico e/ou histiocítico, nodular; linfocítico ou histiocítico difuso; esclerose nodular; misto; fibrose difusa e reticular (LAKHTAKIA; BURNEY, 2015). Em 1966, a Conferência de Rye simplifica essa classificação em quatro subtipos, que se assemelham aos utilizados atualmente: esclerose nodular, celularidade mista, predominância linfocitária e depleção linfocítica. (Harris et al, 1994).

Em 1994, o *Revised European-American lymphoma (REAL) classification* propôs uma nova classificação das neoplasias hematológicas e linfóides, agora com base em seu imunofenótipo. Além disso, foi o primeiro a sistema a classificar o linfoma de Hodgkin em duas

entidades distintas: o linfoma de Hodgkin clássico e o linfoma de Hodgkin predomínio linfocítico nodular (LHPLN), e a incluir a entidade provisional “rico em linfócitos”, como um subtipo do linfoma de Hodgkin clássico. Desde 2001, a OMS assumiu a classificação internacional de tumores e transformou a entidade provisional em oficial. Assim, o linfoma de Hodgkin passou a ser classificado em duas entidades patológicas: o linfoma de Hodgkin clássico e o linfoma de Hodgkin predomínio linfocítico nodular. O linfoma de Hodgkin clássico, por sua vez, pode ser dividido em 4 subtipos : esclerose nodular, celularidade mista, rico em linfócitos, e depleção linfocitária (HARRIS et al., 2000; JAFFE et al., 2008).

A última atualização na classificação veio em 2022, quando a Associação Europeia de Hematopatologia propõe o Consenso Internacional de Classificação de Neoplasias Linfoides. Nela, a entidade predomínio linfocítico nodular é classificada como um linfoma de células B, devido às suas características patológicas, biológicas e clínicas distintas, o separando do linfoma de Hodgkin clássico (CAMPO et al., 2022). Atualmente, ambas classificações da OMS e do Consenso Internacional de Classificação de Neoplasias Linfoides são aceitas.

As terapias para linfoma de Hodgkin também passaram por mudanças expressivas ao longo dos anos. As primeiras tentativas de tratamento datam de 1832, mas é só em 1950 que a doença deixa de ser fatal e passa a ser curável. Isso se deu com a maior compreensão dos padrões de progressão da doença, descobertos pelos radioterapeutas Rene Gilbert e Vera Peters, em associação com o estabelecimento do esquema terapêutico por radioterapia. Com essa união, foi possível oferecer tratamento direcionado para os linfonodos infiltrados, curando aqueles pacientes que apresentavam doença em estadiamento limitado (JAFFE, KAUSHANSKY, 2008).

Em 1964 a combinação de 4 fármacos — Mecloretamina, Oncovin (nome comercial da vincristina), Procarbazina, Prednisona (MOPP) — revolucionou o tratamento de linfoma de Hodgkin. Em 1970, essa terapia já garantia taxas de cura de 70% entre pacientes, inclusive aqueles que apresentavam doença em estadiamento avançado (DEVITA; SERPICK; CARBONE, 1970). Devido ao maior tempo de sobrevida, os efeitos adversos associados à terapia começaram a aparecer, como por exemplo a esterilidade, o comprometimento do sistema cardiovascular e as neoplasias secundárias. Buscando um esquema terapêutico que tivesse menos efeitos adversos, a combinação de fármacos doxorubicina, bleomicina, vimblastina e dacarbazina (ABVD) foi proposta (BONADONNA et al., 1975). Esse novo esquema terapêutico não só apresentou menos efeitos adversos como aumentou a taxa de cura (CANELLOS et al., 1992). O maior desafio agora era propor uma intervenção aos 10-30% dos pacientes que não

apresentavam resposta ao tratamento. Essa intervenção veio com o estabelecimento do regime BEACOPP, a sigla composta pela primeira letra dos fármacos que incluem bleomicina, etoposídeo, adriamicina, ciclofosfamida, oncovin, procarbazina e prednisona (DIEHL et al., 1998).

Os últimos 30 anos foram marcados por inovações que culminaram no linfoma de Hodgkin como uma das neoplasias que apresentam a melhor taxa de cura do mundo. Na década de 90 houve o estabelecimento da aplicação rotineira de marcadores imunológicos no diagnóstico, melhorando assim a precisão diagnóstica (O'MALLEY et al., 2019). Outros avanços marcantes incluem o uso do PET-CT, um exame de imagem que utiliza das tecnologias de emissão de pósitron (do inglês, *positron emission tomography*) associado a tomografia computadorizada para avaliar o metabolismo celular, permitindo assim realizar o estadiamento da doença; a utilização do transplante autólogo (VON TRESCROW; MOSKOWITZ, 2016) de células tronco hematopoiéticas (TACTH) para casos de falha na resposta ao tratamento quimioterápico e o advento do Brentuximab (DENG; PAN; O'CONNOR, 2013), incorporado em casos de falha a resposta ao TACTH (DUARTE et al., 2023).

2.2 EPIDEMIOLOGIA DO LINFOMA DE HODGKIN

O linfoma de Hodgkin é uma neoplasia rara, que compreende cerca de 0,4% de todos os casos de câncer no mundo (Figura 1) (SUNG et al., 2021). Na classificação ICC3, essa neoplasia é classificada como uma entidade única e constitui junto com o linfoma não-Hodgkin, os dois principais grupos de linfomas e neoplasias reticuloendoteliais (ALAGGIO et al., 2022).

Em países desenvolvidos, o linfoma de Hodgkin apresenta distribuição etária bimodal, com o primeiro pico de casos ocorrendo próximo aos 20 anos e o segundo aos 50 anos (CONNORS et al., 2020; WARD et al., 2014). É o tipo mais prevalente de linfoma entre pacientes de 10 a 19 anos, representando 41% dos casos (STELIAROVA-FOUCHER et al., 2017). No começo da infância, o linfoma de Hodgkin é mais prevalente em pacientes do sexo masculino, os quais compreendem 85% dos indivíduos afetados, enquanto em adolescentes essa neoplasia é mais comum em pacientes do sexo feminino (KASEB; BABIKER, 2022). No Brasil, assim como em outros países em desenvolvimento, a prevalência de linfoma de Hodgkin é comparável à do linfoma não-Hodgkin (FERREIRA et al., 2012). Ao contrário, a mediana de frequência de casos no Brasil foi maior em pacientes no grupo de 15-19 anos, indo contra a

tendência de prevalência entre pacientes mais jovens (0-9 anos) que ocorre em outros países em desenvolvimento (BUHTOIAROV, 2017; FERREIRA et al., 2012).

A variação epidemiológica do linfoma de Hodgkin também é observada dentre os subtipos histológicos. Dos quatro, os subtipos esclerose nodular e celularidade mista compreendem a maior parte dos casos, com incidências de 70% e 25%, respectivamente (KASEB; BABIKER, 2022). Ambos obedecem a distribuição etária bimodal de casos já descrita para o linfoma de Hodgkin, embora com algumas distinções. O subtipo esclerose nodular é o mais frequente em países desenvolvidos, tem maior incidência em jovens adultos e está relacionado com doença em estadiamento limitado. Além disso, se difere dos outros subtipos por ser mais comum em pacientes do sexo feminino (MANI; JAFFE, 2009).

O subtipo celularidade mista é mais frequente entre crianças e idosos, está relacionado com doença em estadiamento avançado e infecção frequente por vírus Epstein-Barr (EBV) (ANSELL, 2022). O subtipo depleção linfocitária, por sua vez, representa cerca de 1% dos casos, apresentando maior incidência em idosos (ANSELL, 2022). Juntos, os subtipos celularidade mista e depleção linfocitária estão associados a status econômico mais baixo e maior prevalência em pacientes no sexo masculino (CAMPOS et al., 2018). O subtipo rico em linfócitos foi o último a ser identificado. Ele apresenta semelhanças morfológicas com o subtipo nodular de predomínio linfocítico, representando cerca de 5% dos casos. Esse subtipo é frequente em idosos e está associado a doença em estadiamento limitado (MANI; JAFFE, 2009).

Outras condições que podem influenciar a incidência de linfoma de Hodgkin envolvem fatores familiares e infecciosos. Embora ainda não esteja totalmente esclarecida a relação entre o vírus EBV e linfoma de Hodgkin, o risco de desenvolver essa neoplasia aumenta em 2,5% a 4% em indivíduos que tenham desenvolvido quadros de mononucleose (HJALGRIM; JARRETT, 2020). A correlação com o vírus EBV varia muito de acordo com a localização geográfica, chegando até 90-100% na América Latina (CHABAY et al., 2020), e cerca de 70-80% dos casos de linfoma de Hodgkin do subtipo celularidade mista são EBV+ (BUHTOIAROV, 2017). A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) também aumenta em 5 a 26 vezes mais chances de desenvolver LH do que a população geral (NAVARRO et al., 2021). Entretanto, com o estabelecimento da terapia antiretroviral combinada para HIV, a incidência de linfomas virtualmente desapareceu nestes pacientes (DUARTE et al., 2023).

Casos familiares correspondem a cerca de 4% dos casos, e indivíduos que possuam pais ou irmãos com linfoma de Hodgkin apresentam cerca de 7 vezes mais chance de desenvolver a doença em relação ao resto da população (MANI; JAFFE, 2009).

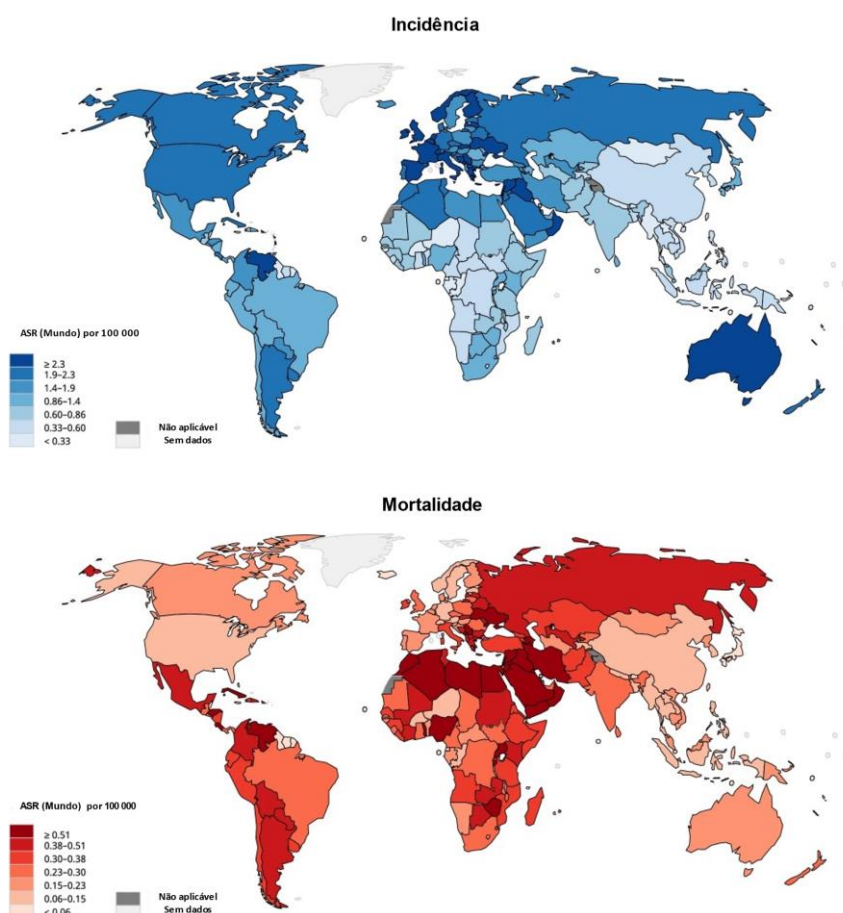


Figura 1: Taxas globais de incidência e mortalidade para linfoma de Hodgkin em 2020. Adaptado de HUANG et al., 2022.

2.3 FISIOPATOLOGIA DO LINFOMA DE HODGKIN

As células Hodgkin e/ou Reed-Sternberg (H/R-S) compreendem cerca de 1% de todo o tecido tumoral, são envoltas por um infiltrado inflamatório rico composto por linfócitos, eosinófilos, neutrófilos, histiócitos e plasmócitos (AGGARWAL; LIMAIEM, 2022).

A origem celular das células H/R-S foi durante muitos anos um enigma. Grande parte do desafio se deve à raridade das células neoplásicas, mas também à presença de expressão de marcadores que estão presentes em células hematopoiéticas distintas. Células H/R-S podem expressar marcadores de linfócitos T, marcadores de linfócitos B e marcadores mielóides.

(STAUDT, 2000). Posteriormente, o avanço nas análises moleculares de células únicas, revelaram a origem das células Reed-Sternberg na linhagem de linfócitos B do centro germinativo (MARAFIOTI et al., 2000).

2.3.1 Um breve histórico da identificação da origem das células de Reed-Sternberg

Os estudos imunofenotípicos realizados na década de 80, visando descobrir a origem das células H/R-S, já começavam a apontar para a origem linfocitária dessas células. No entanto, a expressão variável de antígenos presentes em linfócitos B, T e outras linhagens hematopoiéticas estabelecia um desafio para definição de uma linhagem única que pudesse originar as células neoplásicas (DREXLER; MINOWADA, 1992)

Outras abordagens experimentais incluíram o estudo da presença de rearranjos de genes de imunoglobulinas e receptor de células T (TCR) em extratos de tecidos, mas os resultados se mostraram inconclusivos (HALUSKA; CANELLOS, 1994). A resposta sobre a origem das células H/R-S veio apenas na década de 1990, quando as análises moleculares de extratos de tecidos foram substituídas pelo estudo baseado na análise de rearranjo de imunoglobulinas e TCR de células H/R-S individualmente.

Quando analisadas individualmente, a maioria das células H/R-S entre diferentes pacientes apresentava rearranjos dos segmentos V, D e J do *locus* de imunoglobulina (Ig) da cadeia pesada, e dos segmentos V, J do locus de Ig da cadeia leve, comprovando sua origem a partir de linfócitos B (STEIN; HUMMEL, 1999). Posteriormente, a análise dos rearranjos VDJ das células H/R-S demonstrou a presença de mutações somáticas, usualmente resultando em regiões Vh não funcionais, seja pela inserção de mutações *nonsense*, inserção de *stop codons*, ou outras alterações moleculares deletérias (KANZLER et al., 1996; KÜPPERS et al., 1994; MARAFIOTI et al., 2000).

Como o evento de hipermutação somática dos genes de imunoglobulina ocorre caracteristicamente nos centros germinativos de órgãos linfóides secundários, esses achados sugerem que as células H/R-S surgem a partir de células B do centro germinativo. A grande carga de mutações não funcionais que essas células carregam levam a teoria que são derivadas de células do centro germinativo que escaparam do processo de morte celular (MARAFIOTI et al., 2000).

Como essas células conseguem evadir a apoptose ainda não é esclarecido. É postulado que as células B que conseguiram escapar do programa de apoptose adquirem algumas características principais das células B CD30+, incluindo atividades das vias MYC, NF- κ B e JAK/STAT (WENIGER; KÜPPERS, 2021). Além disso, os processos de apoptose de linfócitos B no centro germinativo são controlados parcialmente por meio da sinalização de CD95. Embora as células H/R-S ainda expressem esse marcador, muitas linhagens são resistentes à apoptose devido a inibição desse receptor, seja por ligação cruzada ou outros mecanismos moleculares (AGGARWAL; LIMAIEM, 2022).

Com evidências acumuladas sobre as células H/R-S serem derivadas de células B do centro germinativo, a justificativa para expressão variável de marcadores T e mielóides em alguns casos continua sendo uma questão em aberto (MÜSCHEN et al., 2000; SEITZ et al., 2000).

2.4 MATURAÇÃO LINFÓIDE B E CORRELAÇÃO COM A CÉLULA H/R-S

Os linfócitos B são componentes centrais da imunidade adaptativa, sendo os responsáveis pela resposta imune humoral por meio da produção de anticorpos (LEBIEN; TEDDER, 2008). A maturação de linfócitos B é um processo complexo e pode ser dividido em duas fases, a maturação independente de antígeno e a maturação dependente de antígeno (LEBIEN; TEDDER, 2008).

A maturação independente de antígeno compreende os processos de rearranjo das cadeias pesadas, seguido pelo rearranjo das cadeias leves das imunoglobulinas, que se unem para formar um receptor de célula B (BCR) funcional (BRACK et al., 1978). O objetivo dessa fase maturativa é a produção de linfócitos que tenham a capacidade de reconhecimento de antígenos estranhos e que sejam tolerantes a antígenos próprios.

A maturação independente de antígeno é dividida em 5 estágios, que são: célula pró-B, pré-BI, pré-BII, linfócito B imaturo e linfócito B *naive*. No estágio mais inicial, o estágio pró-B, a célula expressa os fatores de transcrição E2A, EBF, e Pax5 (NUTT; KEE, 2007), que promovem a síntese de TdT, RAG1 e RAG2, enzimas responsáveis pelo rearranjo dos genes das imunoglobulinas (GELLERT, 2002). O processo de rearranjo tem início pelos segmentos D e J da cadeia pesada da imunoglobulina. Com a união desses segmentos, as células progridem

para o estágio pré-BI, onde ocorre o rearranjo do segmento V e associação ao segmento DJ já rearranjado (TONEGAWA, 1983), resultando na cadeia pesada de imunoglobulina.

No estágio seguinte, pré-BII, a cadeia pesada formada é associada a uma cadeia leve substituta, conhecida como *surrogate L chain* (SLC), um heterodímero composto de duas proteínas distintas $\lambda 5$ e VpreB, junto com os correceptores $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ (CD79a/ CD79b) (MELCHERS, 2005), formando o pré-BCR, que é expresso na membrana das células. A falha em expressar um pré-BCR funcional leva à eliminação dos precursores B por meio da seleção positiva (MELCHERS, 2005). Em paralelo, a sinalização via pré-BCR induz a exclusão alélica, bloqueando o reordenamento do segundo alelo da cadeia pesada de imunoglobulina.

Com isso, há início ao rearranjo das cadeias leves de imunoglobulina. A cadeia leve produzida é associada a cadeia pesada, formando uma molécula completa de IgM, e a célula alcança o estágio de célula B imatura. Nessa etapa, os linfócitos B imaturos são expostos a antígenos próprios, por meio do processo de seleção negativa. Em caso de serem auto reativos, eles podem ser eliminados por apoptose, passarem por mais etapas de edição ou ainda serem induzidos a anergia (HARDY; HAYAKAWA, 2001). Os linfócitos B imaturos selecionados se diferenciam em linfócitos B *naive* e deixam a medula óssea.

Na maturação dependente de antígeno aqueles linfócitos B que saíram da medula óssea são ativados por meio do reconhecimento de antígeno nos órgãos linfóides secundários (PEREZ-ANDRES et al., 2010). Esse processo é mediado por meio da interação com células T CD4⁺ (ALLEN; OKADA; CYSTER, 2007), que estimulam a proliferação dos linfócitos B, através de uma série de moléculas de membrana. Dentre elas, destaca-se a ligação entre as moléculas CD40L ou CD154, que está presente na membrana de linfócitos T, e CD40, presente na membrana de linfócitos B, responsável pela troca de isotipo de cadeia pesada de imunoglobulina. A ativação e sinalização por CD40 apresenta várias funções essenciais ao estabelecimento da resposta humoral eficaz. *In vivo*, a ativação de CD40 é necessária para a formação dos centros germinativos e promoção dos consequentes eventos, como a hipermutação somática e diferenciação dos linfócitos B em células de memória B e plasmócitos (CLARK, 2014; ELGUETA et al., 2009).

Os centros germinativos são estruturas formadas a partir da migração de linfócitos B ativados para o interior da rede de células dendríticas foliculares (GARSIDE et al., 1998). Nelas, ocorre a expansão clonal de linfócitos B e a segunda fase de geração de diversidade de

imunoglobulinas. Esses sítios são divididos em duas zonas distintas, a zona escura e a zona clara. Linfócitos B na zona escura, conhecidos como centroblastos, proliferam e passam por hipermutação somática, produzindo uma população de linfócitos com anticorpos de capacidades distintas de reconhecimento de antígenos (VICTORA; NUSSENZWEIG, 2022). A hipermutação somática é um evento restrito às células B que estão proliferando nos centros germinativos, seu objetivo é conferir maior diversidade ao repertório dos anticorpos. Isso é obtido por meio da introdução de mutações pontuais nas regiões V das cadeias da imunoglobulina pela enzima AID, expressa especificamente em linfócitos B (MURAMATSU et al., 2000).

Linfócitos B após passarem por edição, migram para a zona clara, progredindo para o estágio de centrócitos e tem sua afinidade de ligação a antígenos testada. Esse processo ocorre por meio das interações mediadas por células dendríticas foliculares e células T CD4+ foliculares que levam a seleção positiva de linfócitos que apresentam anticorpos de alta afinidade (VICTORA; NUSSENZWEIG, 2022). Caso os centrócitos falhem em reconhecer o antígeno, sofrem apoptose. Ainda assim, uma parcela das células migra dinamicamente entre a zona escura e clara, passando novamente pelo processo de hipermutação somática e avaliação de afinidade de ligação. Caso falhem, ingressam no processo de morte celular (VICTORA; NUSSENZWEIG, 2022).

Ao final desse processo, as células B com afinidade ao antígeno vão se diferenciar em plasmócitos ou células B de memória, deixando o centro germinativo em direção aos cordões medulares ou ainda, migram para a medula óssea. A seguir, demonstramos o perfil imunofenotípico dos linfócitos B em seus diferentes estágios de maturação (Figura 2).

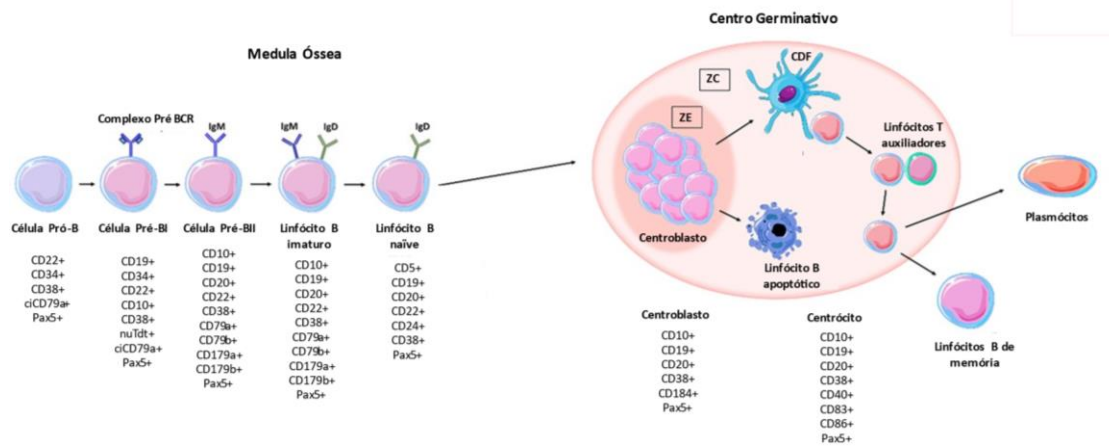


Figura 2: Ontogenia dos linfócitos B. Representação das cinco fases de diferenciação de linfócitos B independente de antígeno, acompanhada pelo seu perfil de expressão imunofenotípica seguida por desenho esquemático da maturação dependente de antígenos, também acompanhada pelo perfil imunofenotípico de cada célula. Adaptado de PATEL et al., 2021.

2.5 APRESENTAÇÃO CLÍNICA DO LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO

O diagnóstico de linfoma de Hodgkin no Brasil ainda é um desafio. A média de tempo que os pacientes experimentam do primeiro atendimento até o diagnóstico de linfoma varia entre 5 e 8 meses (BIASOLI et al., 2018a; SOUZA et al., 2019) comparado a média de 29 dias em um estudo realizado no Canadá (BROOKS et al., 2016). Esse intervalo de tempo não só impõe um grande atraso ao início do tratamento, mas também implica em um desafio adicional nos casos em que a neoplasia leva a condições que exigem intervenção imediata (BUHTOIAROV, 2017). O diagnóstico precoce é essencial para o controle da doença, possibilitando melhores desfechos, além de diminuir os gastos com tratamento no país (MANCINI, 2022).

Pacientes com LHC, em geral, apresentam linfonodomegalias supra diafragmáticas com comprometimento de uma ou mais cadeias linfonodais, comumente afetando as cadeias cervicais (KASEB; BABIKER, 2022). Tal sintoma, embora característico, é comum entre doenças comuns da infância e outras neoplasias, o que torna o diagnóstico diferencial um desafio na prática clínica. Por isso, é importante realizar um exame clínico cuidadoso, registrando a história do paciente, duração dos sintomas associados ao aparecimento de linfonodomegalias, esquema vacinal, história de febre, perda de peso acima de 10% nos últimos 6 meses e sudorese noturna. Isso sempre acompanhado de exame físico e exames adicionais para excluir a possibilidade de linfoma de Hodgkin (BUHTOIAROV, 2017).

Na evolução, o LHC se apresenta como uma doença nodal, de crescimento lento. Suas características palpatórias o diferem de outras doenças infecciosas ou metástases, pois apresentam consistência fibroelástica, firme e indolor (CONITEC, 2020). Após estabelecimento da doença em um órgão linfóide, a neoplasia infiltra progressivamente os tecidos linfóides adjacentes através das vias linfáticas e sangue periférico. Casos onde ocorre infiltração são incomuns, compreendendo cerca de 5-20%, sendo o pulmão e o mediastino os sítios mais afetados (GHARBARAN et al., 2014). Em estádios mais avançados, pode comprometer o baço, fígado, sistema nervoso central e inclusive outros sítios extranodais, mas sempre em associação com infiltração das cadeias linfáticas (GHARBARAN et al., 2014).

Cerca de 30% dos pacientes vão apresentar sintomas B, que incluem febre, suor noturno, e perda ponderal de mais de >10% nos últimos seis meses. Esse conjunto de sintomas está comumente associado aos subtipos celularidade mista e depleção linfocitária em estadiamento III ou IV (KASEB; BABIKER, 2022). Ocasionalmente, outros sintomas podem ser vistos. O prurido crônico é presente em cerca de 25% dos casos, e dependendo do nível de compressão gerado pelas massas, sintomas secundários podem surgir (HOFFBRAND, 2012).

Outros testes laboratoriais adicionais também devem ser empregados para triagem. Estes incluem hemograma completo, avaliação da velocidade de hemossedimentação (VHS), medição de proteína C reativa (PCR) e desidrogenase láctica (LDH), além da avaliação para presença de vírus, como hepatite B, hepatite C, HIV e EBV. No hemograma, é comum observar alterações como eosinofilia e anemia normocítica normocrômica. Um terço dos pacientes apresenta neutrofilia, enquanto linfopenia é vista em casos de doença avançada. A contagem de plaquetas usualmente varia de normal a alta durante a fase inicial da doença, e tornando-se baixa nas fases tardias. A proteína C reativa (PCR) e a velocidade de hemossedimentação (VHS), por sua vez, estão comumente aumentadas em pacientes sintomáticos, com doença avançada. Já a desidrogenase láctica (LDH), está aumentada em 30 a 40% dos casos, podendo estar presente em fases limitadas ou avançadas da doença. Na fase avançada, seu aumento é um indicador de infiltração e está correlacionada a presença de massas e mau prognóstico (HOFFBRAND, 2012).

Exames de imagem como radiografia e tomografia de tórax, abdome e pélvis, auxiliam no estadiamento da doença e ajudam a identificar organomegalias. Já o PET-CT se tornou o

teste *standard* para avaliação de resposta ao tratamento de Linfoma de Hodgkin (KASEB; BABIKER, 2022).

2.6 DIAGNÓSTICO DO LINFOMA DE HODGKIN

2.6.1 Análise morfológica

O primeiro passo para o diagnóstico de linfoma de Hodgkin consiste na biópsia de linfonodo com suspeita de infiltração, ou massa, para análise morfológica e imunofenotípica. Embora a biópsia seja o único método amplamente aceito em contextos clínicos, a biópsia por agulha vem ganhando popularidade no diagnóstico de linfomas. No caso do LHC, a coleta de material por pequenas biópsias ainda não é amplamente aceita. A raridade de células neoplásicas associada a baixa quantidade de material obtida por meio desse método pode levar a resultados falso-negativos (JAFFE; COOK, 2022; SYRYKH et al., 2022). Apesar disso, a punção aspirativa já vem demonstrando 90% de sensibilidade no diagnóstico por CFM da maioria dos linfomas (CHAN et al., 2022).

Para a realização da análise morfológica, o material coletado é submetido a um longo processo, que pode ser sumarizado nas etapas de fixação, seguido da inclusão em bloco de parafina que então é cortado para montagem em lâminas (BROWN, 2004). A análise é a última etapa e o diagnóstico é feito com base na identificação das células H/R-S e/ou suas variantes, associadas aos diferentes padrões de fibrose, necrose e composição do infiltrado imune típicos de cada subtipo (PILERI et al., 2002).

Morfológicamente, as células de H/R-S são células grandes, variando de 15 a 50 micrômetros em diâmetro, podendo até exceder em alguns casos (CHAN, 2001). Geralmente são definidas por serem células binucleadas, que apresentam nucléolos eosinofílicos, rodeados por um halo claro perinuclear e envoltos por citoplasma abundante (AGGARWAL; LIMAIEM, 2022). As variantes mononucleares são denominadas células de Hodgkin, enquanto as variantes binucleadas são denominadas células Reed-Sternberg.

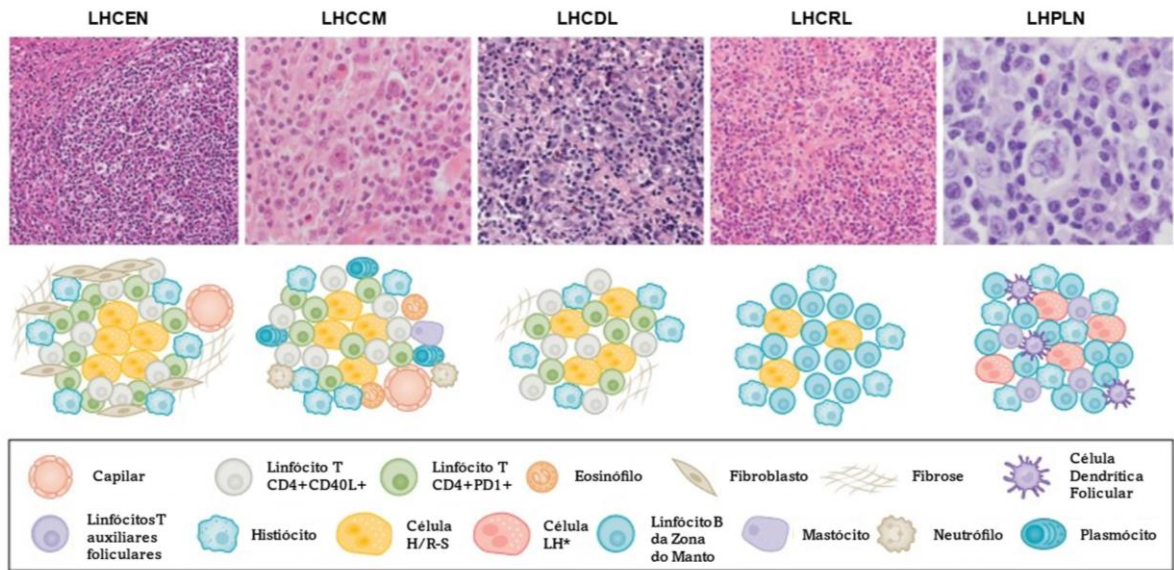


Figura 3 Características morfológicas do linfoma de Hodgkin. Na primeira linha é possível observar imagens histológicas dos quatro subtipos de linfoma de Hodgkin Clássico (LHC), seguido pelo linfoma de Hodgkin de predomínio linfocítico nodular (LHPLN). Cada uma das imagens histológicas é acompanhada, na linha abaixo, por desenho ilustrativo acerca das diferenças morfológicas entre subtipos. Da esquerda para direita estão representados o LHC esclerose nodular, LHC celularidade mista, LHC depleção linfocitária, LHC rico em linfócitos e por último LHPLN. Adaptado de CONNORS et al.,2020.

O subtipo esclerose nodular é caracterizado pelo acometimento extenso de linfonodos causado por fibras colágenas que levam a formação dos nódulos. Tais fibras são refringentes e exibem coloração esverdeada típica quando expostas a microscopia polarizada. Essa característica permite a diferenciação desse subtipo do subtipo celularidade mista, principalmente quando apresenta infiltrado imune proeminente (PILERI et al., 2002). Os nódulos são compostos por células H/R-S, pequenos linfócitos, eosinófilos, neutrófilos e histiócitos (Figura 3). Nesse subtipo, a variante lacunar das células H/R-S é comum. As células lacunares são grandes, apresentam pleomorfismo e podem se apresentar como unilobulares ou multilobulares, além de possuírem nucléolos de diversos tamanhos. Células H/R-S da variante mumificada também podem estar presentes (SHANBHAG; AMBINDER, 2018; TZANKOV; DIRNHOFER, 2006).

O subtipo celularidade mista tem como principal característica a composição celular rica do seu infiltrado imune, que consiste em plasmócitos, histiócitos epitelióides, eosinófilos e células T (Figura 3). Ele apresenta grande variabilidade morfológica, incluindo desde envolvimento focal a difuso e pode estar associado a fibrose e diferentes porcentagens de células H/R-S, embora não curse com variantes celulares. Acomete principalmente a região

paracortical do linfonodo e necrose é vista ocasionalmente (KASEB; BABIKER, 2022; TZANKOV; DIRNHOFER, 2006).

O subtipo depleção linfocitária é caracterizado pela baixa infiltração linfóide associada a baixa frequência de células H/R-S, acometimento extenso do linfonodo e presença variável de fibrose (Figura 3). Pode ser dividido ainda nas variedades de fibrose difusa, caracterizado por *background* hipocelular e fibras conectivas birrefringentes abundantes misturadas a histiócitos abundantes e poucos plasmócitos e eosinófilos. E reticular, caracterizado por maior infiltração de células H/R-S e características pleomórficas e anaplásicas (THIDA; TUN, 2023).

O último subtipo, rico em linfócitos, pode ser dividido entre os padrões difuso e nodular. O padrão difuso está associado a alargamento da zona do manto, regressão do centro germinativo e infiltrado imune é rico em células T. O padrão nodular apresenta infiltrado imune rico em linfócitos B IgM e IgD, associados a zona do manto alargada e centros germinativos em regressão (Figura 3) (PILERI et al., 2002; TZANKOV; DIRNHOFER, 2006).

Embora a presença de células H/R-S seja a principal característica diagnóstica de linfoma de Hodgkin, células similares podem ser encontradas em outras condições como mononucleose infecciosa e linfomas T e B maduros, além de carcinomas, melanomas e sarcomas. Assim, o diagnóstico adequado só pode ocorrer a partir dos resultados da análise morfológica em conjunto a análises imunofenotípica (GRU; LU, 2013; LIU; AUDINO, 2020; MONTGOMERY et al., 1998; PARENTE et al., 2020).

2.6.2 Avaliação imunohistoquímica

O exame histopatológico associado a análise imunohistoquímica é preconizado como procedimento padrão para diagnóstico de linfoma de Hodgkin pelo Ministério da Saúde (CONITEC, 2020). A avaliação imunohistoquímica tem como objetivo a identificação e classificação de diferentes células e componentes teciduais por meio do reconhecimento de antígenos específicos, obtida pela marcação com anticorpos (análise imunofenotípica) (RAMOS-VARA, 2011).

Assim como a avaliação microscópica, possui diversas etapas. Os tecidos já fixados são submetidos ao processo de recuperação antigênica para tornar possível a ligação dos anticorpos aos epítomos. A interação anticorpo-antígeno produz um sinal luminoso ou colorimétrico, por método enzimático, que permitem análise dos diferentes componentes celulares e teciduais. A visualização dessa ligação pode ser feita por meio da detecção direta ou indireta. Na detecção

direta o anticorpo é conjugado a enzima ou fluoróforo que produzem cor, já na detecção indireta a amostra é marcada com um anticorpo primário não conjugado, seguida por anticorpo secundário conjugado para a produção de sinal (MAGAKI et al., 2019).

Atualmente, o perfil imunohistoquímico mais conhecido das células H/R-S é o: CD30+/CD15+ e CD45- (Figura 4), mas essa abordagem apresenta algumas limitações. A primeira delas é que a expressão de CD15 está presente em aproximadamente 65% dos casos, e mesmo dentro destes não é uniformemente expresso (ALAGGIO et al., 2022). Além disso, a expressão de CD45 pode ser de difícil interpretação devido a diferenças de padrões de marcação entre diferentes clones, ou ainda, devido a formação de rosetas de linfócitos T ao redor das células H/R-S, típicas dessa doença. Visando estabelecer um painel mínimo para diagnóstico de LHC o *American Registry of Pathology* propôs a combinação dos marcadores CD3, CD20, CD15, CD30 e PAX5 (O'MALLEY et al., 2019).

Desses, a combinação CD30 e CD15 é a mais utilizada para o reconhecimento de células H/R-S. O CD30, também conhecido como Ki-1, foi identificado em 1982 por meio de experimentos para identificação de antígenos específicos a linfoma de Hodgkin. Com o avanço da imunologia, o CD30 foi caracterizado como um receptor transmembrana de glicoproteínas da família de receptores de necrose tumoral (SMITH et al., 1993). Sua expressão é reconhecida desde células linfoides normais a malignas compreendendo desde subgrupos de linfócitos B, T e NK ativados a casos de linfoma anaplásico, linfoma difuso de grandes células B, o linfoma de células T periférico, dentre outras neoplasias (PIERCE; MEHTA, 2017; WEYDEN et al., 2017).

Na avaliação imunohistoquímica para diagnóstico de LHC seu padrão de marcação está associado à expressão forte na membrana das células com acentuação nos complexos de Golgi (O'MALLEY et al., 2019). A detecção deste antígeno é essencial ao diagnóstico de LHC, que está presente em todos os casos. Já o antígeno CD15, também denominado antígeno Lewis X, está presente em cerca de dois terços dos casos de LHC. Originalmente reconhecido como um marcador mielóide, hoje já é reconhecidamente expresso entre diversos tipos celulares, como histiócitos, granulócitos, mastócitos, precursores mieloides e vários tipos de carcinomas, está presente também nas células H/R-S. Nelas, apresenta padrão de marcação de membrana e acentuação nas regiões perinucleares e no complexo de Golgi em células H/R-S, assim como o CD30. (O'MALLEY et al., 2019). Além disso, em crianças, a negatividade para CD15 foi

considerada um fator independente de prognóstico negativo, com reduções da sobrevida global e da sobrevida livre de eventos (DINAND et al., 2008).

O fator transcricional PAX5 também é importante no diagnóstico imunohistoquímico, já que está presente em cerca 80-98% dos casos de LHC, o que corrobora com a teoria da origem B dessas células. Na marcação imunohistoquímica, apresenta padrão nuclear menos intenso quando comparado com as células B normais (Figura 4). O padrão nuclear distingue as células H/R-S de outros componentes do microambiente inflamatório, como células multinucleadas gigantes, histiócitos, células dendríticas e endoteliais (O'MALLEY et al., 2019).

Os marcadores CD20 e CD3 possuem papel importante no estabelecimento de diagnóstico diferencial e estudo do infiltrado imune. O CD20 é expresso em cerca de 30% dos casos de Hodgkin, com padrão de expressão fraco e variável entre células H/R-S quando comparadas a linfócitos B (Figura 4). O marcador CD3, por sua vez, é essencial para a identificação da distribuição e reatividade de linfócitos T (Figura 4). Ele não é comumente encontrado em células H/R-S, embora algumas publicações reportem a presença de antígenos T em até 20% dos casos de linfoma de Hodgkin clássico. Nessa neoplasia, sua expressão está mais associada à formação de rosetas, estruturas formadas por linfócitos T rodeando as células H/R-S (O'MALLEY et al., 2019; VENKATARAMAN et al., 2013).

Além desses marcadores, outros antígenos apresentam importância no diagnóstico de LHC por IHQ. São eles o CD40 e o CD95, presentes em 93% e 90% dos casos, respectivamente (KIM et al., 2003). Esses dois marcadores, assim como o CD30, pertencem a superfamília de fatores de necrose tumoral. O antígeno CD40 é caracterizado pelo padrão de expressão de membrana e ocasionalmente citoplasmático e perinuclear, usualmente mais intenso nas células H/R-S do que outros componentes do infiltrado imune (GRUSS et al., 1994; O'GRADY et al., 1994). O antígeno CD95 também apresenta padrão de marcação de membrana forte, embora com maior variabilidade de intensidade de marcação entre casos, apesar disso, sua expressão em células H/R-S ainda é maior que de outras populações do infiltrado imune (KIM et al., 2003; NGUYEN et al., 1996)

Outros diagnósticos diferenciais devem ser considerados, caso haja expressão de CD30 e ou outros marcadores característicos de LHC, entretanto sem o perfil completo descrito acima. No diagnóstico diferencial de LHC, o linfoma difuso de grandes células expressa fortemente CD20 com expressão mais fraca de CD30, os linfomas T e anaplásico costumam expressar CD3 simultaneamente ao CD30. Além dos linfomas não Hodgkin, há duas condições que fazem

diagnóstico diferencial com LHC, o LH não clássico, chamado linfoma de Hodgkin predominantemente linfocítico nodular e um terceiro tipo de linfoma que fica entre o linfoma de grandes células B do Mediastino (LGCB-M) e o LHC, por esta razão chamado linfoma de “zona cinzenta” ou linfoma *Grey Zone* de mediastino (ALAGGIO et al., 2022).

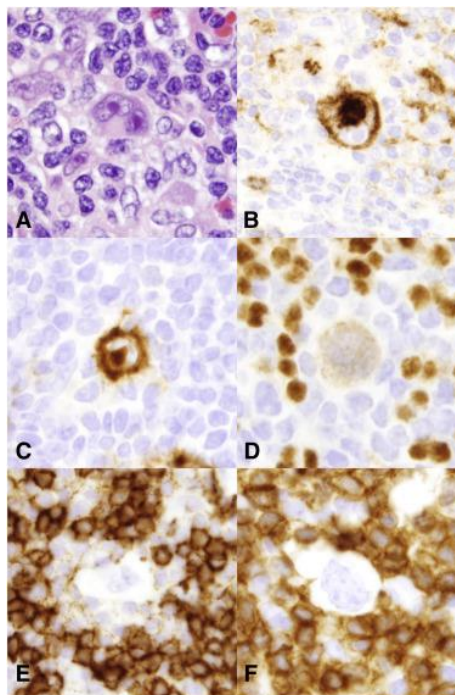


Figura 4 Perfil imunohistoquímico das células H/R-S. A) Representação da célula de H/R-S em corada com hematoxilina-eosina. B) Padrão de marcação por CD15; C) Padrão de marcação por CD30; D) Padrão de marcação por PAX5, onde nota-se a menor intensidade de marcação das células H/R-S em comparação aos linfócitos B; E) Padrão de marcação de CD20; F) Padrão de marcação de CD3. Adaptado de O'MALLEY et al., 2019.

2.7 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LINFOMAS

Na prática clínica uma ampla variedade de doenças pode apresentar morfologia e imunofenótipo similar ao linfoma de Hodgkin. Historicamente, células similares às células Reed-Sternberg são descritas em muitas condições associadas à infecção por EBV, o que torna o diagnóstico um desafio. Dentro do grupo doenças que imitam linfoma de Hodgkin morfológicamente e imunofenotipicamente, existem desde condições infecciosas até neoplasias. Entre as neoplasias, alguns linfomas não Hodgkin se destacam, como o linfoma *Grey Zone* de mediastino, o linfoma difuso de grandes células B, o linfoma periférico de células T, linfoma Anaplásico, entre outros (KASEB; BABIKER, 2022).

O exemplo mais clássico de sobreposição entre características clínicas, morfológicas e fenotípicas é o linfoma *Grey Zone* de mediastino. Ele é reconhecido pela OMS como um subtipo de linfoma de células B que fica entre o linfoma de grandes células B do Mediastino (LGCB-M) e o LHC (SARKOZY et al., 2019). O linfoma *Grey Zone* de mediastino apresenta maior incidência no sexo masculino e clinicamente cursa com o aparecimento de massas em mediastino. No aspecto morfológico, é caracterizado pela presença de células neoplásicas grandes e pleomórficas, que se organizam de forma difusa em um estroma fibróide. A maioria das células neoplásicas lembram células H/R-S e são envoltas por um infiltrado inflamatório esparso, composto por eosinófilos, linfócitos e histiócitos. O imunofenótipo é variável, por vezes mais compatível com LHC e em outros casos compatível com LGCB-M, com expressão CD30+ e CD15+ e CD20 variáveis (GRANT et al., 2011).

Outro caso é o linfoma difuso de grandes células B, ele é o subtipo mais frequente de linfoma não Hodgkin e compreende um grupo heterogêneo de neoplasias resultantes da expansão clonal anormal de células B do centro germinativo ou pós centro germinativo (SUSANIBAR-ADANIYA; BARTA, 2021). Apresenta predominância no sexo masculino e clinicamente é uma doença de crescimento rápido, com acometimento de um ou mais linfonodos e sítios extranodais pela formação de massas. Alguns casos de linfoma de grandes células B EBV+ podem apresentar similaridades morfológicas e imunofenotípicas com LHC. As células neoplásicas apresentam tamanho variável, com um padrão de crescimento difuso associado a fibrose fina, esclerótica por vezes combinado a necrose. Ele se distingue morfológicamente pelas altas taxas de apoptose e taxa mitótica alta. Esse tipo de linfoma expressa CD30 em apenas 10-15% dos casos e seu perfil imunofenotípico mais comum inclui marcadores típicos de linfócitos B como CD19, CD20, CD22 e PAX5, mas em casos que cursa com EBV pode apresentar imunofenótipo CD30+ e CD15+ (O'MALLEY et al., 2019).

Um aspecto interessante é que aproximadamente 20% dos casos de linfoma difuso de grandes células B se apresentam como linfoma de grandes células B primário do Mediastino (ALLEN; OKADA; CYSTER, 2007). A sobreposição entre o linfoma primário de grandes células B do Mediastino e o LHC já é bem estabelecida. Ambos podem ocorrer de forma sequencial ou ainda simultânea no mesmo sítio e há indícios que guardam relação molecular entre si. Clinicamente ambas neoplasias compartilham maior incidência entre jovens adultos, são associadas massas de mediastino e apresentam células grandes associadas a padrão esclerótico na análise morfológica (JAFFE et al., 2008; TAKAHARA et al., 2022). Para

distinção entre as duas neoplasias é essencial realizar a avaliação imunofenotípica incluindo os marcadores CD23, CD79A, CD45, P63 e avaliação para EBV (O'MALLEY et al., 2019).

Dentre os linfomas B, o linfoma de Burkitt também teve destaque nesse trabalho, embora não seja um diagnóstico diferencial de linfoma de Hodgkin. Ele é um linfoma não Hodgkin agressivo que é comumente associado a infecção do vírus EBV ou HIV e translocação cromossômica, que leva a expressão de C-MYC (GRAHAM; LYNCH, 2023). Clinicamente apresenta-se como uma massa abdominal de crescimento rápido e morfológicamente é caracterizado pelo aspecto de “céu estrelado”, devido aos macrófagos de corpos tingíveis que fagocitam células tumorais apoptóticas, além disso, apresenta uma população monomórfica de linfócitos maduros como infiltrado imune (JAFFE et al., 2008; MOLYNEUX et al., 2012). O linfoma de Burkitt expressa CD10, CD19, CD20, CD79a, PAX5 e Bcl-6, sendo assim, é facilmente distinguível de LHC (FERRY, 2006; O'MALLEY et al., 2019).

Linfomas T também compõem o grupo de diagnósticos diferenciais. O Linfoma Anaplásico é um tipo de Linfoma T que compreende 10 a 15% dos casos de Linfoma Não Hodgkin entre crianças e adolescentes. Ele afeta principalmente crianças a jovens adultos e apresenta predominância no sexo masculino. Assim como no linfoma de Hodgkin cursa com envolvimento nodal, embora envolvimento extranodal também seja relativamente comum, é visto em cerca de 60% dos casos. A morfologia de um linfonodo infiltrado por linfoma Anaplásico é caracterizado por conglomerados de grandes células tumorais com sinusóides na zona paracortical associado a necrose, mas podem também apresentar um padrão semelhante a Hodgkin subtipo esclerose nodular com as células que se organizam de forma difusa dentro do infiltrado imune contendo eosinófilos e neutrófilos (SHARMA et al., 2017). As células neoplásicas típicas apresentam núcleo em forma de ferradura com citoplasma abundante, com baixa taxa mitótica. Seu perfil imunofenotípico é caracterizado pela expressão forte de CD30, que podem ser facilmente distinguidas do linfoma de Hodgkin por meio de sua marcação para ALK+, PAX5- associado a expressão de outros marcadores de linfócitos T, como CD2 e CD4 (DÖRING et al., 2014).

2.8 CITOMETRIA DE FLUXO MULTIPARAMÉTRICA (CFM)

A citometria de fluxomultiparamétrica (CFM) é uma metodologia amplamente utilizada na rotina diagnóstica e pesquisa que tem aplicação em diversas áreas, como imunologia, virologia, biologia molecular e do câncer. Ela permite a análise das características físicas, químicas e biológicas de diversos tipos celulares de forma rápida, sensível e objetiva, desde que suspensos em solução (ROBINSON; ROEDERER, 2015; ADAN *et al.*, 2017).

Os citômetros de fluxo são compostos por 3 sistemas: o de fluidos, o óptico e o eletrônico. O sistema de fluidos conduz as células individuais em suspensão a serem lidas pelo sistema óptico, que gera e capta sinais a partir de *lasers*. Conforme as células marcadas são interceptadas pelo conjunto de *lasers*, a medida de dispersão de luz e sinais fluorescentes são produzidos por meio da excitação dos fluorocromos conjugados a anticorpos monoclonais (PICOT *et al.*, 2012). A dispersão de luz é medida em duas direções, o *forward scatter*, que indica o tamanho relativo da célula e o *side scatter*, que indica a complexidade interna ou a granulidade da célula. Enquanto isso, as diferentes ondas de emissão dos fluorocromos, traduzidas em cores distintas, permitem que diversas características imunofenotípicas das células sejam medidas ao mesmo tempo (ADAN *et al.*, 2017).

Os sinais fluorescentes são filtrados no sistema óptico por espelhos dicróicos que têm como função selecionar, refletir e transmitir uma onda de luz específica para o sistema eletrônico, composto por detectores. Nele, os detectores (fotodiodos e tubos fotomultiplicadores) convertem e amplificam os sinais luminosos (Figura 5). O pulso é digitalizado, e enviado a um computador onde a aquisição dos eventos ocorre por meio de um *software* específico (MCKINNON, 2018). Tais *softwares* permitem ao usuário controlar as funções e calibrar o aparelho. Atualmente, esse componente já é capaz de medir milhares de eventos por segundo, limitado somente pelo *dead time* de cada aparelho, geralmente inferior a 5 milissegundos (PICOT *et al.*, 2012).

Os anticorpos aplicados na rotina diagnóstica usualmente reconhecem moléculas que são específicas a uma linhagem celular ou estágio específico da diferenciação hematopoiética. Cada um dos anticorpos é indicado com um número de “*cluster* de diferenciação” específico, comumente abreviado CD. Os anticorpos, também conhecidos como marcadores, podem ter afinidade por moléculas de membrana, citoplasmáticas ou nucleares. Nos últimos anos, houve um aumento expressivo na disponibilidade de anticorpos monoclonais e em fluorocromos disponíveis a serem conjugados. Além disso, que a maioria das células do sistema imune já

possuem marcadores específicos conhecidos e empregados na rotina clínica/diagnóstica (MCKINNON, 2018; ADAN et al., 2017; JAFFE et al., 2008).

Além dos anticorpos linhagem específicos, existem também marcadores associados a componentes celulares, marcadores de proliferação celular, ciclo celular e morte celular. A viabilidade celular pode ser mensurada por meio de marcadores de exclusão como iodeto de propídeo, ou por meio de marcadores que se ligam componentes amins para detecção de integridade de membrana celular (ADAN et al., 2017). Os marcadores com base em quantificação de amins apresentam vantagens sobre os marcadores de exclusão porque podem ser fixados e utilizados em células infecciosas, além de não influenciarem na marcação por anticorpos intracelulares (MCKINNON, 2018). Um dos marcadores de viabilidade com base em quantificação de amins que se pode destacar é o “*fixable viability stain*” FVS780, utilizado neste trabalho, pois além de oferecer as vantagens que outros marcadores dessa classe possuem, também apresenta pouca superposição em canais de fluorescência (BUV737, BD Horizon™ BV786 e PE-Cy™7). No caso do presente trabalho, o único canal potencialmente afetado seria o detector de PE-Cy7.

Para a análise, os dados são exportados e representados dentro de softwares em forma de gráficos biparamétricos, como histogramas e *dot plots* (Figura 5). Nos últimos anos, com o aumento do número de parâmetros e sua complexidade, novos métodos de análise por *clusters* têm sido propostas, como análise supervisionada, que inclui a análise de componentes principais (COSTA et al., 2010), a análise completamente automatizada (LINSKENS et al., 2020), entre outros. Dentre os métodos de análise por *clusters*, destaca-se a ferramenta de análise canônica de correlação (CA), presente no software *Infinicyt (Euroflow)*. Com a CA, é possível separar as populações identificadas, com base na análise sucessiva dos marcadores (componentes) em que são mais bem discriminadas, levando em consideração a variação interna a cada uma das populações identificadas. Esse cálculo é realizado de forma automatizada, utilizando como base os métodos de análise de variância (ANOVA), associados a análise de componentes principais (PEDREIRA et al., 2019; PELTIER; VISALLI; SCHLICH, 2015).

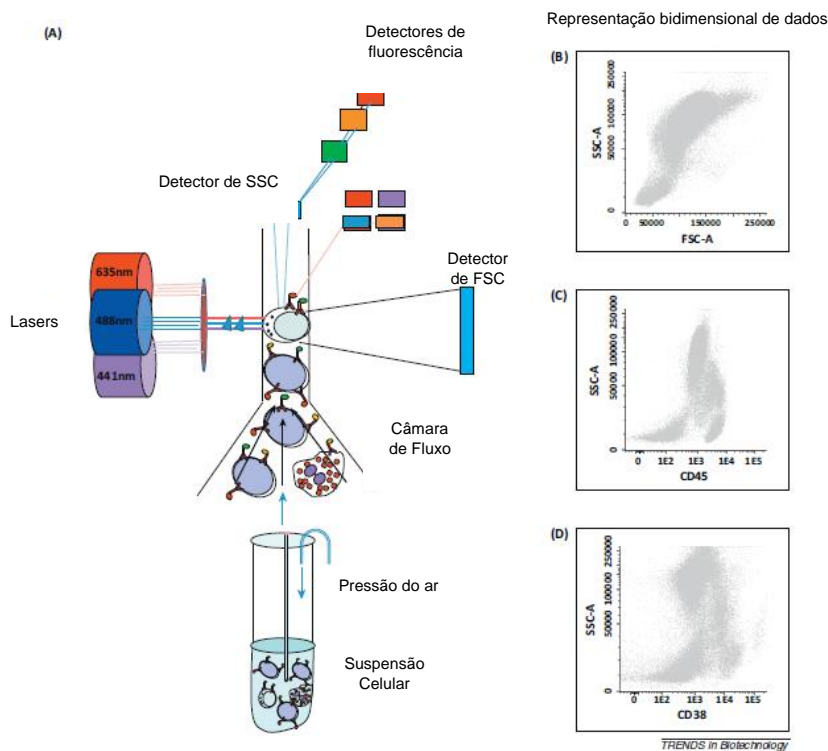


Figura 5 Representação esquemática do funcionamento do citômetro e geração de dados. Células individuais em uma suspensão passam uma a uma através da câmara de fluxo, onde são interceptadas por lasers. Um detector de dispersão de luz frontal é posicionado na frente dos lasers e coleta os sinais de luz, enquanto o detector de dispersão de luz a 90° e os detectores de fluorescência captam os sinais de luz a um ângulo de 90°. A) Os sinais de luz são convertidos em sinais digitais e processados por software, que os traduz em parâmetros de tamanho, granulidade e expressão de marcadores. Os dados são apresentados por meio de gráficos bidimensionais, como demonstrado nos painéis B-D. B) Gráfico de dispersão frontal versus dispersão lateral; C) Gráfico da dispersão lateral versus CD45; D) Gráfico da dispersão lateral versus CD38. Adaptado de PEDREIRA et al., 2013.

2.9 CONTRIBUIÇÃO DA CFM NO DIAGNÓSTICO DE NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

As neoplasias hematológicas são classificadas pela OMS a partir da avaliação conjunta de seus aspectos morfológicos, imunofenotípicos e genéticos. A análise imunofenotípica junto com a morfologia são as primeiras etapas a serem realizadas frente a uma suspeita diagnóstica. Elas têm como objetivo comum confirmar ou afastar a presença de blastos e, além disso, identificar a qual linhagem estão associados (ALAGGIO et al., 2022).

Desde 1980 a CFM se estabeleceu como o método mais eficaz para avaliação imunofenotípica e identificação de populações neoplásicas (ORFAO et al., 1999). Por meio dela é possível a avaliação de um amplo painel de anticorpos monoclonais de forma simultânea, e gerar dados objetivos e semiquantitativos até em amostras pequenas, em um curto período. Outras vantagens são que é amplamente distribuída em países desenvolvidos e em desenvolvimento, apresenta grande variedade de plataformas e reagentes além de ser capaz de

alcançar grande precisão e sensibilidade diagnóstica (SOMMER et al., 2021). A limitação da CFM é a perda das informações sobre morfologia e arquitetura do tecido, importante para o diagnóstico das neoplasias, mas que pode ser facilmente contornada com a associação dessa técnica a análise morfológica (HEEL et al., 2013).

A identificação de células fenotipicamente aberrantes é um passo essencial no diagnóstico de neoplasias hematológicas. O padrão aberrante pode ser definido como níveis alterados de expressão antigênica, reduzido ou aumentado, quando comparado às células normais no mesmo estadiamento de diferenciação, ou ainda, a expressão inapropriada de antígenos que não são comumente expressos por células daquela linhagem ou naquele estágio de diferenciação (ERBER, 2010).

Dependendo do imunofenótipo das células, doenças podem ser diferenciadas em relação a sua linhagem, como monocítica, megacariocítica, eritroide ou linfóide de origem B ou T. E em alguns casos podem ainda serem subclassificadas a partir da avaliação da clonalidade, tomando como base a razão entre as cadeias leves κ e λ (WOO; BAUMANN; ARGUELLO, 2014).

O painel de anticorpos a ser utilizado é determinado pela história clínica do paciente, associado a suspeita diagnóstica obtida por meio da avaliação morfológica, a pergunta clínica sendo investigada (diagnóstico, estadiamento, monitoramento, prognóstico ou identificação de um alvo terapêutico) e ao tipo da amostra sendo analisado. Por fim, serão selecionados painéis de anticorpos que possam discriminar entre diagnósticos diferenciais comuns (CRAIG; FOON, 2008).

Diversas tentativas foram feitas para o estabelecimento de painéis de anticorpos para diagnóstico de neoplasias hematológicas por grupos consenso. A conferência de Bethesda em 2006 inovou ao optar pela avaliação imunofenotípica com base na apresentação clínica da doença. Suas recomendações preconizavam a utilização de um painel primário de poucos anticorpos seguido por um painel secundário com foco em caracterizar mais especificamente as populações anormais identificadas (WOOD et al., 2007).

O consórcio *Euroflow* foi outro grupo que publicou seu próprio guia com painéis de anticorpos para triagem diagnóstica de leucemias e linfomas. Criado em 2006, o consórcio *Euroflow* é composto por mais de 20 grupos de pesquisa que tem como objetivo o desenvolvimento e a standardização de testes rápidos, acurados e sensíveis por CFM para

diagnóstico, prognóstico e subclassificação de neoplasias hematológicas. Dentre os testes, o "*Lymphoid screening tube*" (LST) compreende a combinação de anticorpos utilizada para guiar o diagnóstico de neoplasias linfóides. A combinação de 12 anticorpos em 8 cores tem como objetivo dissecar as diferentes subpopulações de células linfóides entre as células normais e detectar populações aberrantes derivadas de linfócitos B, T maduros, e células NK no sangue periférico, medula óssea, linfonodos e fluidos (VAN DONGEN et al., 2012). Isso é feito a partir da análise de diferentes combinações que incluem os anticorpos CD45, essencial para a definição dos compartimentos de linfócitos maduros e imaturos; CD3 para a classificação de células T ; CD19 e CD20 para seleção de células B; CD56 para classificação de células NK; Junto aos marcadores adicionais para subclassificação, que são smIgκ, smIgλ, CD4 e CD8 (VAN DONGEN et al., 2012). Além do caráter diagnóstico, a CFM também tem tido papel crescente na identificação de antígenos úteis para avaliação prognóstica, no estabelecimento de terapias, na identificação de alvos terapêuticos para estabelecimento de novos fármacos e no monitoramento de doença residual mensurável (WOO; BAUMANN; ARGUELLO, 2014).

Historicamente, a CFM se estabeleceu como ferramenta essencial no diagnóstico, estratificação e estudo de doença residual mensurável em neoplasias hematológicas. Por sua celeridade em fornecer resultados, constitui uma ferramenta essencial para integrar processos de triagem, sendo útil na orientação para análise morfológicas e moleculares adicionais necessárias, conferindo vantagens custo-efetivas aos serviços de saúde (FROMM; THOMAS; WOOD, 2009).

2.10 CITOMETRIA E LINFOMA DE HODGKIN

Apesar da utilidade da CFM já ter sido comprovada na detecção de populações raras dentro de amostras complexas, a sua utilização para o diagnóstico de LHC ainda não está amplamente estabelecida em contextos clínicos (FROMM; THOMAS; WOOD, 2009). Estudos utilizando essa técnica vem sendo realizados desde 1980, visando principalmente avaliar taxa mitótica, ploidia e o índice de DNA de células H/R-S, com o objetivo de estabelecer o potencial prognóstico e diagnóstico desses parâmetros (DIAMOND; NATHWANI; RAPPAPORT, 1982; OSBORNE et al., 1990; MORGAN et al., 1988; ERDKAMP et al., 1993). Estudos de caracterização do infiltrado imune também foram realizados, buscando potenciais fatores prognósticos nas alterações das linhagens linfóide e mieloide (DE MULDER et al., 1983; POPPEMA et al., 1982).

As primeiras tentativas de identificação das células H/R-S por meio da citometria de fluxo ocorreram nas décadas de 80 e 90 (GLASSMAN; SELF; CHRISTOPHER, 1987) mas o primeiro diagnóstico de linfoma de Hodgkin por CFM foi realizado apenas em 2004. Nesse estudo, Ravoet e colaboradores, utilizaram um painel de oito tubos com combinações de quatro anticorpos cada para avaliar uma coorte de 118 biópsias de linfonodos. Dentro do painel, os marcadores CD15 e CD30 foram utilizados para identificar as células H/R-S. Do total de 15 casos de Linfoma de Hodgkin confirmados por análise morfológica, 12 casos foram considerados como “prováveis” ou “muito prováveis” para linfoma de Hodgkin por meio da CFM (RAVOET et al., 2004).

Em 2006, Fromm e colaboradores, apontam a necessidade de uma segunda demonstração de diagnóstico de linfoma de Hodgkin por CFM. Eles defenderam que, no estudo publicado por Ravoet, não era possível distinguir a população identificada como H/R-S de outras populações, como macrófagos. Utilizando um painel expandido, eles buscaram a melhor caracterização das células H/R-S por meio da combinação de 10 anticorpos em 2 tubos distintos: o primeiro (CD64, CD86, HLA-DR, CD40, CD3, CD19, CD15, CD71, CD45, DAPI) e o segundo (CD64, CD30, CD3, CD40, CD20, CD19, CD95, CD71, CD45, DAPI). Em uma amostra de 79 espécimes, onde 27 eram compatíveis com LHC por análise morfológica e imunohistoquímica, o teste alcançou 89% de sensibilidade ao diagnóstico e nenhum falso positivo foi reportado (FROMM; KUSSICK; WOOD, 2006).

Posteriormente, Fromm e colaboradores ampliaram seu estudo. Eles publicaram a análise da combinação de nove anticorpos (CD5, CD15, CD20, CD30, CD40, CD45, CD64, CD71, CD95) em duas coortes distintas. A primeira compreendendo 279 biópsias analisadas de forma cega; enquanto a segunda coorte compreendendo 141 casos de amostras que tinham suspeita clínica definida para Linfoma de Hodgkin, apresentavam infiltrado imune apropriado e/ou que apresentavam células grandes atípicas. Nesse estudo, os resultados obtidos foram igualmente promissores, com valores de especificidade de 100% e sensibilidade de 80%, obtidas para primeira coorte e sensibilidade de 91% e especificidade de 100%, obtidas para segunda coorte. No total de 420 amostras, 53 eram compatíveis morfolologicamente com linfoma de Hodgkin, sendo que a sensibilidade e especificidade diagnóstica alcançada por CFM foram de 88,7% e 100%, respectivamente. (FROMM; THOMAS; WOOD, 2009).

Confrontados com a dificuldade de aplicar um painel de nove a dez marcadores em contexto clínico, Fromm publicou em 2014 uma versão do tubo para diagnóstico de Linfoma de Hodgkin com apenas seis anticorpos (CD64 , CD30 , CD40 , CD20 , CD95, CD3). Um total de 408 amostras foi avaliada de forma cega, dos 55 casos compatíveis morfológicamente com linfoma de Hodgkin, as taxas de sensibilidade e especificidade obtidas para diagnóstico por meio da CFM foram 85,4% e 99,7%, respectivamente. A partir disso, o grupo concluiu que a versão de 9 cores, apesar de ser mais extensa, apresentava melhor sensibilidade e especificidade, sendo mais compatível com contextos clínicos. (FROMM; WOOD, 2014).

Outro desafio relacionado ao diagnóstico de linfoma de Hodgkin é a necessidade de biópsias incisionais devido a raridade das células neoplásicas. A avaliação por meio de métodos menos invasivos, como a biópsia por agulha fina, ainda não é amplamente aceita, mas vem ganhando popularidade por ser uma alternativa quando a cirurgia não é possível. Em 2022, Chan e colaboradores, publicaram um estudo avaliando casos de pequenas biópsias com suspeita de linfoma. Dentro do estudo foram avaliados um total de 590 amostras, das quais 131 correspondiam a amostras obtidas de pacientes com LHC. O grupo era composto por amostras obtidas por meio de biópsia de agulha grossa, biópsia de agulha fina e outros espécimes citológicos. Todas as amostras foram avaliadas com a combinação de nove anticorpos (CD5, CD15, CD20, CD30, CD40, CD45, CD64, CD71, CD95). Do total de amostras avaliadas por citometria de fluxo, o diagnóstico foi concordante com LHC em 87 casos, 83 que correspondiam morfológicamente a Linfoma de Hodgkin, 4 falsos negativos e 7 falsos positivos, apresentando sensibilidade de 95,4% e especificidade de 98,2% (CHAN et al., 2022).

Atualmente, estudos por CFM ainda buscam novos marcadores que possam melhorar a sensibilidade do diagnóstico e sejam marcadores prognósticos. Destaca-se aqui o estudo liderado por Fromm e colaboradores, onde a expressão de CD123 foi avaliada em 59 casos de LHC. O marcador CD123 é um membro da superfamília de receptores de citocina, capaz de regular a sobrevivência, proliferação e morte celular, e sua expressão já é bem estabelecida em células hematopoiéticas normais, como basófilos e células dendríticas, assim como em células neoplásicas de linfomas não-Hodgkin (ACHI et al., 2020).

As amostras foram avaliadas por um painel de quatro combinações de anticorpos dos quais duas tinham como objetivo a identificação de células H/R-S e a avaliação de expressão de CD123, sendo elas, (CD95 / CD64 / CD30 / CD45 / CD40 / CD20 / CD15 / CD71 / CD5) e (CD95 / CD64 / CD30 / CD45 / CD40 / CD20 / CD123 / CD71 / CD5) . Dentre os casos

analisados a expressão de CD123 foi presente em 35/59 (59%) dos casos. Apesar de sua expressão ser limitada a um pouco mais de 50% dos casos de LHC, esse antígeno consolida sua importância clínica por apresentar grande especificidade para identificação de células H/R-S, sendo raramente expresso em outras neoplasias que são diagnósticos diferenciais comuns, como o linfoma de grandes células B (FROMM, 2011b).

O último estudo publicado com objetivo de estabelecer novos marcadores para diagnóstico de LHC por CFM propõe a utilização do cálculo da razão de expressão de CD71 em associação a marcação de um painel de sete anticorpos monoclonais (CD3, CD4, CD8, CD15, CD30, CD45, CD71). Os autores sugerem que o aumento da população de células T CD4+, associado à sua maior expressão de CD71 em amostras infiltradas por LHC, poderiam ser parâmetros úteis para diagnóstico. A partir da análise conjunta dos dados, obtiveram sensibilidade de 82% e especificidade de 87%, com a ocorrência de 10 falsos positivos e 12 falsos negativos para o total de 65 amostras infiltradas por LHC (FLORES et al., 2023).

Apesar do avanço no diagnóstico de LHC por CFM, a adesão a essa técnica permaneceu limitada no âmbito clínico. Fromm e colaboradores sugeriram que o conhecimento necessário para realizar o teste e analisar os dados obtidos poderiam estabelecer uma barreira a sua aplicação por outros grupos. Assim, desenvolveram um método computacional que pudesse auxiliar na interpretação dos dados de CFM para diagnóstico de LHC. Nesse trabalho foram avaliadas 144 amostras, dentre elas 60 casos infiltrados por LHC por meio da marcação de um painel de nove cores, já previamente abordado. Idealmente, 0,5 a 1 milhão de células foram adquiridas por tubo. A classificação dos dados obtidos foi realizada por meio de *machine learning* por vezes associados a análise de componentes principais (PCA).

O resultado obtido pelo grupo estabeleceu que os principais parâmetros para discriminação das células H/R-S estavam associados a populações positivas para o marcador CD5, com expressão intermediária a alta de CD15 e CD71 e expressão baixa de CD30, CD40 e CD64. Interessantemente, os autores reconhecem que esses parâmetros não selecionam células H/R-S, e apontam que esse resultado pode guardar analogia a casos histopatológicos em que a composição do infiltrado imune levanta suspeita de LHC apesar da ausência de células neoplásicas em si (FROMM; KUSSICK; WOOD, 2006; NG et al., 2015).

Posteriormente Simonson e colaboradores publicaram estudo com o objetivo de estabelecer análise automatizada dos casos infiltrados por LHC por meio de métodos de *machine learning*. No total 1222 amostras foram analisadas, das quais 321 foram consideradas compatíveis com LHC pelos autores. Assim como no estudo anterior, foram adquiridas entre 0,5 a 1 milhão de células por tubo. As combinações que tiveram maior relevância para a classificação das células H/R-S: CD40/CD15, CD20/CD71, SSC-H/CD20, CD5/CD15 e SSC-A/CD20. Embora tenham alcançado maior similaridade as combinações de marcadores utilizadas em abordagens manuais a sensibilidade e acurácia do teste foram 67% e 88%, respectivamente (SIMONSON et al., 2021).

Devido a isso, nós propomos o presente trabalho para selecionar marcadores que possam vir a integrar uma nova combinação de anticorpos para futuramente aumentar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico diferencial de linfomas por citometria de fluxo.

3 JUSTIFICATIVA

O câncer é a primeira causa de morte no mundo, apesar disso algumas neoplasias possuem alta taxa de cura se detectadas precocemente e se forem adequadamente tratadas. O LHC é uma delas, e apresenta uma das melhores taxas de cura entre neoplasias, chegando a ultrapassar 80% de cura a longo prazo (ANSELL, 2022).

Embora as altas taxas de cura, o diagnóstico e tratamento de LHC enfrentam obstáculos dentro do cenário da saúde pública brasileira. Os desafios iniciam já a partir da disparidade socioeconômica encontrada na população. Indivíduos que apresentam menor escolaridade tendem a demorar mais para procurar serviços de saúde para investigação dos sintomas, e quando se consultam podem enfrentar demora para o estabelecimento de suspeita correta devido aos sintomas compartilhados entre LHC e outras doenças comuns (BIASOLI et al., 2018a). O atraso no encaminhamento do indivíduo ao especialista também é reportado e a falta de estrutura para biópsia contribuem com o cenário (BUCCHERI et al., 2018). No setor público, a mediana em dias para o recebimento dos resultados histopatológicos é de 30 dias enquanto o intervalo do início dos sintomas até o início do tratamento para LHC é de cerca de 30 a 60 dias, o que é aprofundado em pacientes que apresentam menor poder socioeconômico, chegando até 5 anos (BIASOLI et al., 2018b).

Atualmente cerca de 52% dos pacientes diagnosticados com LHC pelo Sistema Único de Saúde apresentam estadiamento III e IV (BIASOLI et al., 2018b). Embora não haja estudos definitivos em LHC, a literatura aponta que o atraso no diagnóstico de neoplasias está associado a pior prognóstico e maior mortalidade (HANNA et al., 2020). Com base nisso, este trabalho tem como objetivo avaliar uma nova combinação de anticorpos para futuramente contribuir com o estabelecimento de diagnóstico rápido e aumentar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico diferencial de linfomas por citometria de fluxo.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar quais marcadores discriminam com maior sensibilidade as células H/R-S das células do infiltrado imune intratumoral, através citometria de fluxo multiparamétrica.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar dentre os marcadores estudados, os que tem maior poder discriminatório entre as células Reed-Sternberg das células do setor linfocítico e o setor mieloide.
- Estimar o número mínimo de eventos adquiridos necessário para garantir a detecção de células neoplásicas.
- Calcular a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo da citometria de fluxo para o diagnóstico de linfoma de Hodgkin utilizando como padrão-ouro a histopatologia e imunohistoquímica.

5 METODOLOGIA

5.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo prospectivo, observacional, descritivo, transversal.

5.2 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado nos centros de oncologia pediátrica e hematologia pediátrica do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG), Hospital Federal dos Servidores do Estado, Hospital da Lagoa, Hospital da Criança, e hospitais pertencentes a Rede D'or São Luiz.

5.3 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO AMOSTRAL

5.3.1 Critérios de Inclusão

Pacientes com idade entre 0 e 19 anos, matriculados no setor de oncologia e hematologia do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira, Hospital Federal dos Servidores do Estado, Hospital da Lagoa, Hospital da Criança, e Rede D'or São Luiz, com suspeita de Linfoma, como presença de massa mediastinal, massa abdominal, ou que apresentavam adenomegalias sem causa específica e que foram submetidos a procedimento cirúrgico entre outubro de 2011 a outubro de 2022.

5.3.2 Critérios de Exclusão

Biópsias de amostras supurativas ou de pacientes em uso de corticoides.

5.3.3 Considerações éticas

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira – UFRJ, assim como nos comitês de ética de cada um dos hospitais participantes (CAAE: 35130014.6.0000.5264, 35130014.6.3003.5249, 000286). Os pesquisadores têm conhecimento e se comprometem com a adequação da pesquisa à Resolução do Conselho Nacional de Saúde 466 de 12 de dezembro de 2012 e suas complementares. Os pacientes e seus responsáveis legais foram informados sobre a pesquisa antes do procedimento, dos seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e incômodos que esta possa

acarretar, e caso tenham concordado com a doação do material, assinavam o termo de consentimento e assentimento livre e esclarecido (ANEXOS A e B).

Foram utilizadas amostras de massa tumoral e/ou linfonodo obtidos durante procedimento cirúrgico diagnóstico ou de seguimento, bem como investigação em fluidos corporais (líquido ascítico, líquido pleural, líquido cefalorraquidiano, líquido pericárdico, medula óssea e sangue periférico) de pacientes com suspeita de Linfoma de Hodgkin, apenas quando houve excedente de material biológico dos procedimentos realizados, não contemplando, dessa forma, a obtenção desses materiais apenas para fins de pesquisa ou implicando em prejuízos ao diagnóstico do paciente. Além disso, dados do registro médico foram coletados, analisados, e as informações foram armazenadas em um banco de dados, respeitando-se o sigilo de acesso à informação.

5.3.4 Coleta de dados clínicos

As informações clínicas foram obtidas por meio da consulta ao prontuário médico dos hospitais envolvidos no estudo. Um formulário (ANEXO D) foi desenvolvido para orientar e armazenar as informações dos pacientes, que incluem dados demográficos (idade ao diagnóstico, gênero, nacionalidade, raça), dados clínicos e laboratoriais (hemograma ao diagnóstico, localização do tumor primário, presença de infiltração em outros sítios, resultado anatomopatológico).

A análise histopatológica foi realizada no Hospital de origem do paciente e, alguns casos, revistos no Serviço de Anatomia Patológica do HUCFF, INCA e MicroImagem. A avaliação morfológica do material enviado guiou os estudos imunohistoquímicos. Os marcadores utilizados no painel imunohistoquímico compreenderam combinações distintas dos marcadores : CD3, CD5, CD15, CD20, CD30, CD68, CD163, nuPAX5, LMP1/EBV, AKL1.

5.4 COLETA DAS AMOSTRAS

5.4.1 Procedimento inicial de coleta de amostras e encaminhamento ao laboratório de citometria

A coleta e identificação das diferentes amostras foi norteada pelo protocolo de orientações sobre coleta, identificação, armazenamento e envio de amostras, informado ao médico responsável pelo procedimento (ANEXO C). O material, junto com a ficha de identificação da amostra e os termos de consentimento e/ou assentimento, foi encaminhado ao laboratório de citometria de fluxo do IPPMG/UFRJ. O encaminhamento foi realizado

preferencialmente dentro das primeiras 6 horas após o procedimento cirúrgico e/ou diagnóstico, ocorreu em maleta específica e destinada ao transporte, corretamente identificada, resfriada, com o objetivo de manter a temperatura entre 2-4°C. A seguir, discriminamos as orientações sobre a coleta, armazenamento e encaminhamento especificamente para cada tipo de amostra.

5.4.1.1 Linfonodos e Tecidos

As amostras de tecidos encaminhados ao laboratório de citometria de fluxo do IPPMG/UFRJ foram coletadas durante o procedimento cirúrgico, preferencialmente pelo patologista responsável. Imediatamente após a coleta, o material foi armazenado em recipiente estéril contendo soro fisiológico 0,9%, a temperatura ambiente e em volume suficiente para imersão do fragmento. Como já referido acima, todas as amostras foram transportadas em temperatura entre 2-4°C até o laboratório de citometria de fluxo.

5.4.1.2 Amostras de medula óssea e sangue periférico

Em caso de aspiração de medula óssea e/ou coleta de sangue periférico, para avaliação de infiltração, o material era coletado em tubo de EDTA, idealmente em um volume de 2ml.

5.4.1.3 Amostras de outros líquidos corporais

Amostras de fluidos corporais (líquido ascítico, líquido pleural, efusão pericárdica, entre outros) foram coletadas em ambiente estéril e armazenadas em tubo próprio sem adição de líquidos ou conservantes. As amostras de líquido, especificamente, foram coletadas em *Transfix* (Caltag, Bristol, UK) para estabilizar a membrana plasmática das células. Um volume mínimo de 1ml foi a recomendação estabelecida para o processamento adequado da amostra por citometria.

5.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DE BIÓPSIA DE LINFONODO OU TECIDO

Ao chegar no laboratório de citometria de fluxo do IPPMG/UFRJ, o tecido ou fragmento eram sempre devidamente registrados antes do início do protocolo de processamento. Em seguida, a amostra era transferida para placa de *Petri* e pesada em balança analítica digital (*A&D Weighing; A&D GF Balances GF-200 Toshima Japão*). Em caso de o fragmento ter peso superior a 100 mg, ele era dividido em fragmentos menores, de cerca de 2-4mm, com auxílio de um bisturi antes da desagregação.

A etapa de desagregação mecânica foi realizada com o fragmento na placa de *Petri*. O tecido era imerso em soro fisiológico e/ou tampão fosfato-salino (em inglês, *phosphate-buffered saline*, PBS) albuminado, na proporção PBS + 0,09% de NaN₃ + 0.2 % de albumina (em inglês, *bovine serum albumin*, BSA). A individualização das células foi realizada com auxílio de duas agulhas hipodérmicas 21G estéreis (*SOLIDOR, Tianchang Anhui China*). Todo o processo foi feito sobre placa de gelo, para manutenção de temperatura entre 4-8°C e evitar a morte das células neoplásicas. Após a dissociação, a suspensão de células foi filtrada através de filtro *Filcon*, de 200 µmm estéril (BD Bioscience), e transferida para um tubo tipo Falcon de 50 ml, com auxílio de seringa.

Depois, foi realizada uma sequência de 3 lavagens, conforme descrito a seguir. Na primeira, completou-se o volume da amostra para 50 ml com adição de solução PBS + 0,09% de NaN₃ + 0.2 % BSA. A amostra foi centrifugada a 800g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado com auxílio de pipeta *Pasteur*, e o *pellet* ressuspensionado. Na segunda lavagem, o tubo cônico tipo Falcon foi preenchido até o volume de 10 ml com solução PBS + 0,09% de NaN₃ + 0,2% de BSA. A amostra foi centrifugada a 800g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado, com auxílio de pipeta *Pasteur*, e o *pellet* ressuspensionado. Na terceira e última lavagem, a amostra foi transferida para um tubo de FACS de 5 ml. Adicionalmente, a parede do tubo tipo Falcon de 50 ml que continha a amostra, foi lavada com 2 ml de solução de PBS + 0,9% de NaN₃, para recuperação células presas à parede do tubo. O volume foi adicionado ao tubo de FACS, contendo o restante da amostra. A seguir, a amostra foi centrifugada a 540g por 5 minutos, e o sobrenadante foi descartado com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*.

Por fim, a amostra foi ressuspensionada em volume suficiente para que em 100 µl de amostra tenham idealmente cerca de 1×10^7 células. Em caso de amostras com baixa celularidade, concentrações menores tiveram que ser utilizadas.

5.6 BULK LYSIS PARA AMOSTRAS DE MEDULA ÓSSEA A SANGUE PERIFÉRICO

Em caso de amostras de medula óssea ou sangue periférico, estas foram deixadas em homogeneizador de tubos por 10 minutos antes do início do protocolo de processamento, e na sequência foram passadas pelo contador hematológico YUMIZEN P8000 (HORIBA Medical, California, EUA) para aferir a quantidade de células nucleadas. Em seguida, 2 ml de amostra foram transferidos à um tubo cônico tipo Falcon de 50 ml, que foi preenchido até o volume de 50ml por solução de lise, NH₄Cl, feita "*in house*". Caso fosse necessário a lise de mais de 2 ml de amostra, mais de um tubo de 50 ml eram feitos (máximo de 2mL de amostra para 48 ml de

lisante). A seguir, a sequência de lavagens e contagem de células foi realizada tal como descrito na seção 5.5 “Processamento das amostras de biópsia de linfonodo ou tecido”.

5.7 PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE OUTROS FLUIDOS BIOLÓGICOS

Em caso de outros fluidos biológicos, como efusão pleural, efusão pericárdica, líquido ascítico, entre outros, a amostra foi transferida em sua totalidade para um tubo cônico tipo Falcon de 50ml. O volume do tubo foi preenchido até 50ml com PBS+ 0,09% de NaN₃ + 0,2% de BSA.

No caso do líquido (líquido cefalorraquidiano, LCR), em específico, a amostra foi avolumada com auxílio de uma pipeta de precisão, para exclusão do volume de *TransFix* da amostra (1:5, vol:vol *TransFix*:amostra). O líquido foi transferido para tubo cônico tipo Falcon 15ml, que foi completado em volume com solução de PBS filtrado + 0,09% de NaN₃ + 0,2% de BSA.

Todas as amostras, exceto LCR, passaram por uma sequência de três lavagens, como descrito na seção “Processamento das amostras de biópsia de linfonodo ou tecido”. Nas amostras de LCR, realizaram-se apenas duas lavagens com PBS filtrado + 0,09% de NaN₃ + 0,2% de BSA. No fim, as amostras foram ressuspensas para que em 100µl tivessem aproximadamente 1×10^4 células.

5.8 ANÁLISE DE VIABILIDADE

A viabilidade celular das amostras foi verificada por duas técnicas distintas. Na primeira versão do tubo, os *doublets* e *debris* foram retirados com base nos parâmetros de SSC/ FSC-A/ FSC-H (Figura 6).

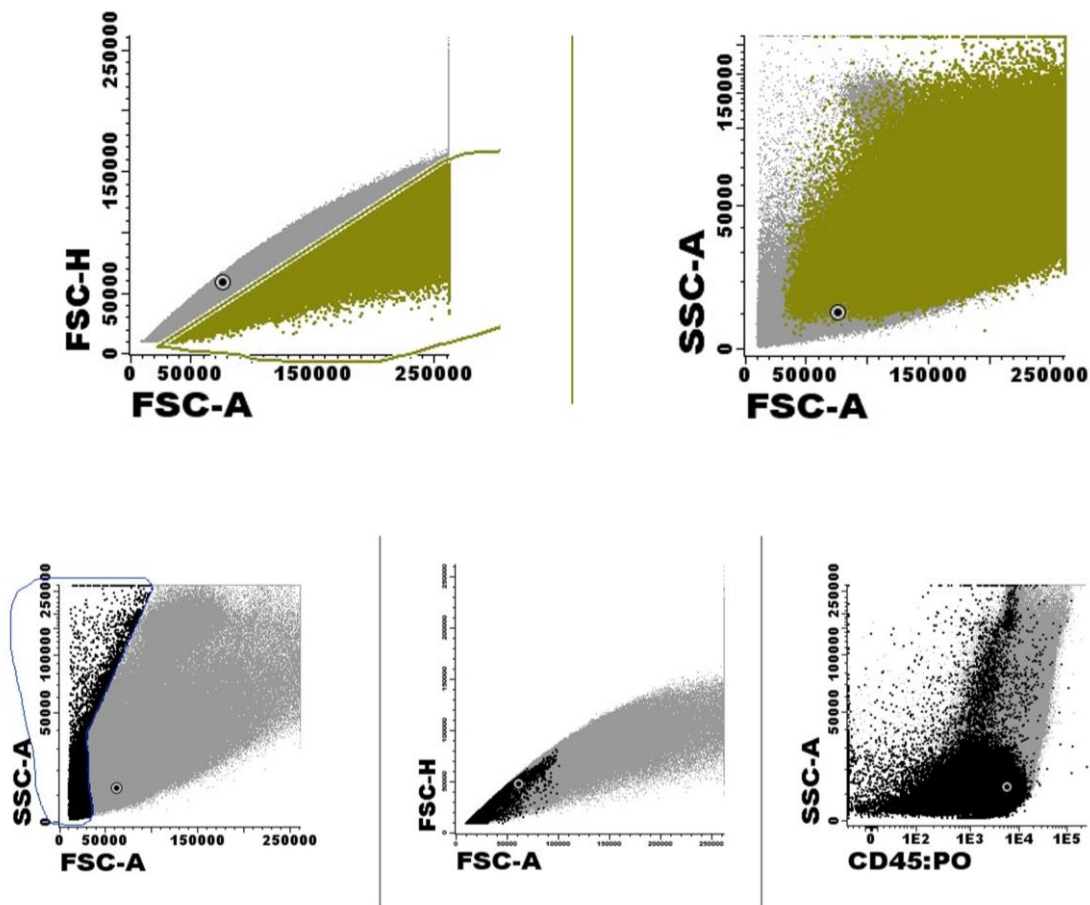


Figura 6 Representação da estratégia de seleção e *doublets* e *debris* na análise do primeiro tubo. Na primeira combinação de anticorpos estudada os agregados e restos celulares foram excluídos com base na análise dos parâmetros área versus altura. A estratégia para exclusão dos *doublets* está representada na primeira coluna, em verde, e a representação da exclusão de *debris* está representada na coluna abaixo, em preto.

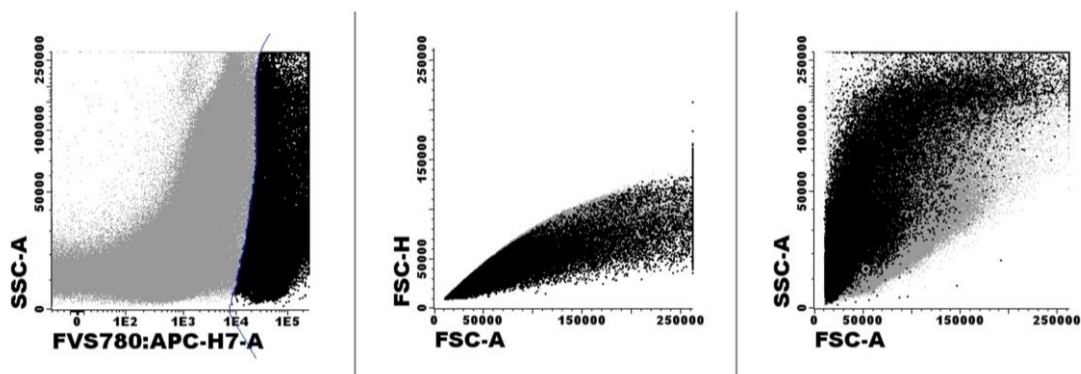


Figura 7 Representação da estratégia de seleção e células mortas e *debris* na análise do segundo tubo. Na segunda combinação de anticorpos foi adicionado um marcador de viabilidade, FVS780, que tem como base a marcação de aminas. Ele é capaz de diferenciar células viáveis e não viáveis pela intensidade de marcação, as células em processo de morte celular apresentam maior intensidade de marcação e por isso foram excluídas da análise.

Na segunda versão do tubo, foi utilizado o marcador de viabilidade celular FVS780 (BD Biosciences, San José, CA) (Figura 7). Para preparar o marcador FVS780, o pó liofilizado foi transferido um microtubo de 1,5ml e dissolvido em 180µl dimetilsulfóxido (DMSO, e.g., Sigma D2650), estéril a temperatura ambiente. A solução foi dividida em diversas alíquotas de 10µl e armazenadas a -20°C até a utilização.

A marcação com FVS780 foi realizada sempre antes da etapa de marcação com anticorpos, exceto nas amostras de LCR, onde não foi utilizado. Para tal, em um tubo de FACS, adicionou-se 1µl de FVS780, solução estoque, a qual foi adicionado 900µl de PBS. O tubo foi levado ao vórtex, e em seguida 100 µl de suspensão celular foram adicionados. A amostra, devidamente homogeneizada, foi incubada por 15 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Ao final desse tempo, 2 ml de PBS+ 0,09% de NaN₃ foram adicionados a amostra, que foi homogeneizada novamente, e centrifugada a 540g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*, o *pellet* foi ressuscitado em 2 ml de PBS + 0,09% de azida sódica, e a amostra foi homogeneizada para em seguida ser centrifugada a 540g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado com o auxílio de uma pipeta *pasteur* e seguiu-se com a marcação com anticorpos.

5.9 MARCAÇÃO DA AMOSTRA COM ANTICORPOS MONOCLONAIS

O volume de anticorpos utilizado está descrito na (Tabela 1). As titulações dos anticorpos CD3 / CD5 / CD15 / CD20 / CD45 / CD56 / CD95 / CD123 / HLADR foram obtidas a partir dos protocolos estabelecidos pelo consórcio europeu de citometria EUROFLOW, enquanto os volumes utilizados dos anticorpos CD30, CD40 e _mPAX5 foram seguidos conforme recomendação das bulas dos fabricantes.

Em cada tubo foi adicionado 100µl de amostra, que foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente, protegida da luz. Ao final desse período, para amostras cuja marcação era apenas para marcadores de membrana, o *pellet* foi ressuscitado, homogeneizado manualmente e 2ml de *Facs Lysing* (BD Biosciences 2350 San Jose, CA) foram adicionados a amostra. Em seguida, o tubo foi homogeneizado e incubado, ao abrigo da luz, durante 10 minutos. Por fim, o tubo passou pelo processo de lavagem duas vezes com PBS + 0,09% de NaN₃, e era adquirido no citômetro.

Para amostras cuja marcação envolvia também marcadores intracelulares, ao final do período de marcação dos anticorpos de membrana, 2mL de PBS + 0,09% de NaN₃ foram

adicionados, o *pellet* foi ressuspensionado e o tubo centrifugado a 540g por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 100µl de Solução A (fixador, Fix&Perm™, Vienna, Áustria) foram adicionados à amostra, que foi então homogeneizada suavemente. Em seguida, a amostra foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após este período, 2mL de PBS + 0,09% de NaN₃ foram adicionados ao pellet, que foi homogeneizado e centrifugado a 540g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*, o *pellet* ressuspensionado em 100 µl de Solução B (solução permeabilizante; Fix&Perm™, Vienna, Áustria) e os anticorpos intracelulares (Tabela 1), foram adicionados à amostra, que foi posteriormente ressuspensionada utilizando-se o vórtex. O tubo foi então incubado a temperatura ambiente e protegido da luz por 15 minutos. Ao final desse período, 2 ml de PBS + 0,09% de NaN₃ foi adicionado à amostra, a qual foi centrifugada a 540g por 5 minutos. O sobrenadante era então descartado e o *pellet* ressuspensionado, para posterior leitura em citômetro. No caso de amostras de LCR, foram adicionados *Perfect-Count™ Microspheres* (Cytognos, S.L, Espanha) com uma relação 1:1 com o volume final da amostra antes da aquisição.

5.10 CALIBRAÇÃO E COMPENSAÇÃO DO CITÔMETRO

A calibração e compensação do citômetro foram realizadas seguindo rigorosamente os protocolos desenvolvidos pelo consórcio europeu de citometria EUROFLOW (KALINA et al., 2012) a cada 3 meses ou em intervalo menores, quando necessário, de acordo com a verificação diária do equipamento. A verificação diária da calibração do aparelho era realizada utilizando-se as esferas CST (BD Biosciences, San José, CA) de verificação do *status* do equipamento, e as esferas *Rainbow* (BD Biosciences, San José, CA) para avaliação em cada canal de fluorescência (KALINA et al., 2012).

5.11 PROCESSO DE AQUISIÇÃO DOS TUBOS

Todas as amostras foram adquiridas utilizando o equipamento FACs Canto II (BD Biosciences, San José, CA), com auxílio do *software* FACs Diva (BD Biosciences, San José, CA). Para garantir a comparabilidade entre as amostras, a voltagem foi ajustada para que a população de linfócitos (identificada por meio dos parâmetros SSCxFSC e SSCxCD3, primeira versão, e SSCxFSC e SSCxCD45, segunda versão) tivessem sempre um valor de FSC entre 50000-60000 e SSC entre 11000-15000. A velocidade de aquisição foi sempre definida como “Média” dentro do programa, e a concentração de células foi ajustada para que não ultrapassasse 10000 eventos por segundo.

5.12 ESTRATÉGIA DE PROCESSAMENTO POR CITOMETRIA DE FLUXO

Nas amostras recebidas, realizamos a marcação das seguintes combinações de anticorpos monoclonais: *Lymphoid Screening Tube* (LST) e *Hodgkin Disease Tube* (HD) - versões 1 ou 2 (HD1 ou HD2), (Tabela 1). As combinações de anticorpos referentes a cada uma das versões do tubo HD foram testadas em diferentes períodos. Seguindo os fluxogramas de trabalho (Figura 8), a primeira versão do tubo foi aplicada as amostras que deram entrada no laboratório entre novembro de 2011 a abril de 2021, enquanto a segunda combinação está sendo testada desde abril de 2021 até os dias atuais.

O objetivo dessa estratégia foi distinguir as amostras que apresentavam processo inflamatório ou reacional, daquelas que eram compatíveis com Linfoma de Hodgkin, identificadas pelo tubo HD, e outros Linfomas, caracterizados pelo tubo LST. Em caso de linfomas não Hodgkin, painéis específicos para linhagem linfóide B ou T foram utilizados para complementar o diagnóstico. Todas as análises foram realizadas utilizando o *software Infinicyt versão 2.0* (Cytognos SL, Salamanca, Espanha).

Tabela 1 Combinações de anticorpos avaliadas para identificação das células Hodgkin/Reed-Sternberg.

Marcadores conjugados a fluorocromos									
Painel de Anticorpos	PB/BV421	PO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC/AF647	APCH7	
HD1	CD20 2H7 Biolegend	CD45 HI30 Invitrogen	CD15 MMA BD	CD30 BerH8 BD	CD5 L17F12 BD	HLADR L243 BioLegend	CD56 N901 Beckman Coulter	CD123 AC145 MitenylBiotec	CD3 SK7 BD
HD2	nuPAX5 HI9 BD	CD45 HI30 Invitrogen	CD15 MMA BD	CD30 BerH8 BD	CD40 5C3 Biolegend	CD56 N901 Beckman Coulter	CD95 DX2 BD	FVS780 BD	

Abreviações (em ordem alfabética): AF: do inglês, *Alexa Fluor*; APC: alofocianina; APCH7: alofocianina/hilita 7; BD: do inglês, *Becton/Dickinson Biosciences*; BV: Violeta brilhante; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PB do inglês, pacific blue ou “azul do pacífico”; PerCPCy5.5: peridinina-clorofila-proteína/cianina 5.5; PE: ficoeritrina; PE-Cy7: ficoeritrina-cianina 7; PO: do inglês, Pacific Orange ou “laranja do pacífico”

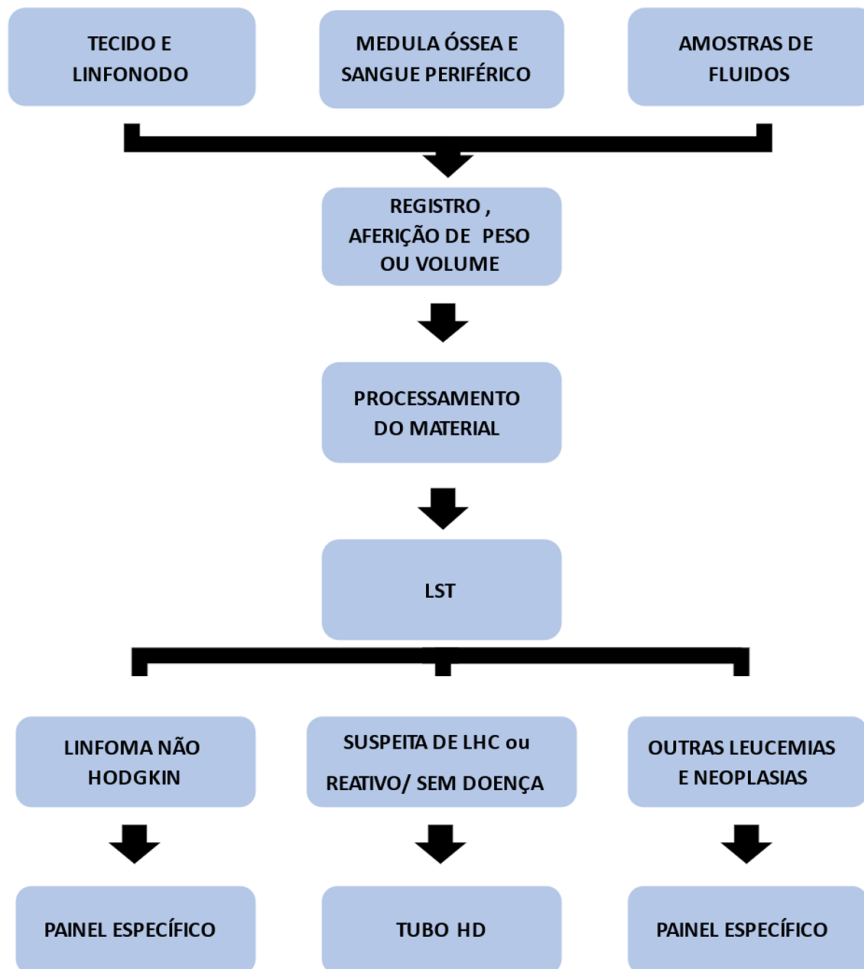


Figura 8 Representação esquemática do fluxo de trabalho.

5.13 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS E IMUNO-HISTOQUÍMICAS

Todas as amostras recebidas para análise por citometria de fluxo multiparamétrica foram encaminhadas em paralelo ao Serviço de Patologia do Hospital de referência. O exame histopatológico foi realizado em lâminas de 3 mm coradas com hematoxilina/eosina. Em (17/23) de todas as amostras com suspeita de infiltração por células de Hodgkin, sessões de tecido foram submetidas ainda a imunohistoquímica.

As informações da avaliação histopatológica e imunohistoquímica foram utilizadas como padrão-ouro para cálculo dos parâmetros de sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da citometria de fluxo multiparamétrica.

5.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a avaliação de dados colhidos dos pacientes, foram obtidos os valores de média, mediana, desvio padrão, intervalo de confiança, máximo e mínima das variáveis contínuas. Todos esses parâmetros foram calculados utilizando o programa SPSS (versão 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Para dados que correspondem a variáveis categóricas, utilizamos frequência.

Na avaliação de performance dos tubos construídos, foram calculadas a sensibilidade, a especificidade, a acurácia, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo, sempre utilizando como referência o método padrão-ouro para diagnóstico, que é a avaliação anatomopatológica, e complementando com a análise imunohistoquímica, quando disponível.

A sensibilidade, ou verdadeiro positivo, foi definida como a probabilidade de detecção de células H/R-S por citometria em fluxo multiparamétrica em amostras com diagnóstico de linfoma de Hodgkin por avaliação da anatomopatológica. A especificidade, ou verdadeiro negativo, foi definida como a probabilidade da ausência de detecção de células H/R-S em amostras que não receberam diagnóstico de linfoma de Hodgkin por avaliação anatomopatológica. A acurácia foi definida como a capacidade da avaliação por CFM de obter resultados concordantes com a avaliação pela anatomia patológica, ou seja, ser capaz de detectar a presença de células H/R-S em amostras de linfoma de Hodgkin e demonstrar a ausência de tais células em amostras com outros diagnósticos dentro do número total de amostras. O valor preditivo positivo foi definido como a probabilidade da presença de células H/R-S quando a amostra é dada como positiva para linfoma de Hodgkin por CFM e o valor preditivo negativo como probabilidade da ausência de células H/R-S quando a amostra é negativa para linfoma de Hodgkin por CFM. O Teste Exato de Fisher foi usado para variáveis contínuas, respectivamente, de forma a estabelecer se havia diferença estatisticamente significativa entre as diferenças observadas nos grupos avaliados.

Resumidamente, os resultados foram classificados como verdadeiros positivos (VP), falsos positivos (FP), verdadeiros negativos (VN) e falsos negativos (FN). Para os cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo foram aplicadas as respectivas fórmulas: $VP/(FN+VP)$; $VN/(FP+VN)$; $VP/(VP+FP)$ e $VN/(VN+FN)$.

6 RESULTADOS

6.1 DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO E AMOSTRAS ESTUDADAS

6.1.1 Descrição do total de amostras

Neste estudo foram analisadas 100 amostras de 79 pacientes, 30 do sexo feminino e 49 do sexo masculino, com mediana de idade de 10 anos. Do total de 100 amostras 38 (38%) correspondiam a amostras provenientes de pacientes com o diagnóstico de linfoma de Hodgkin e estavam distribuídas entre 18 linfonodos, 9 aspirados de medula óssea, 5 massas, 3 LCRs, 2 amostras de efusão pericárdica e 1 amostra de efusão pleural. Dessas, a análise anatomopatológica identificou infiltração por células H/R-S em 23/38 (60%) amostras, provenientes de 21 pacientes e livre de doença em 15/38 (40%). Dessas 15 amostras, 11 foram consideradas livre de doença, 3 amostras não foram encaminhadas a análise citológica (2 amostras de efusão pericárdica e 1 amostra de líquido) e 1 amostra de medula óssea foi considerada inconclusiva (Tabela 2).

Além das amostras supracitadas, as 62 amostras restantes foram distribuídas da seguinte forma: 38/62 (56%) amostras foram classificadas como reacionais pela avaliação anatomopatológica. As amostras reacionais estavam distribuídas em 29 linfonodos, 2 biópsias de massas e 2 SP e 1 BM. As outras 22/62 (35%) amostras foram provenientes de pacientes com diagnóstico prévio de câncer (6 - linfoma anaplásicos, 3 – linfomas de Burkitt, 3 – linfomas de grandes células B, 2 – linfomas linfoblásticos T, 2 – tumores de células germinativas, 1 – carcinoma de nasofarínge, 3 – neuroblastomas, 2 – tumores de Wilms), (Tabela 2).

Tabela 2: Descritivo dos pacientes e amostras do estudo.

Parâmetro	Distribuição de Pacientes (n= 79)	N. de amostras / total (%) (n=100)
Idade ao Diagnóstico (Anos)*	10	
Sexo (Feminino – Masculino)	30-49	
Diagnóstico Final	Pacientes (n=79)	Amostras (n=100)
<i>Linfomas e neoplasias do Sistema reticuloendotelial</i>	33/79 (42%)	39/100 (39%)
Linfoma de Hodgkin Clássico	21/79 (26%)	25/100 (25*%)
Linfoma Não Hodgkin	12/79 (16%)	14/100 (14%)
Linfoma de Burkitt	3/79 (4%)	3/100 (3%)
Linfoma de Grandes Células B	3/79 (4%)	3/100 (3%)
Linfoma Anaplásico	4/79 (5%)	6/100 (6%)
Leucemia/Linfoma Linfoblástico T	2/79 (3%)	2/100 (2%)
<i>Neoplasias não-hematopoiéticas</i>	8/79 (10%)	8/100 (8%)
Carcinoma Nasofaríngeo	1/79 (1%)	1/100 (1%)
Neuroblastoma e outros tumores do sistema nervoso periférico	3/79 (4%)	3/100 (3%)
Tumores Renais	2/79 (2%)	2/100 (2%)
Tumores de Células Germinativas	2/79 (3%)	2/100 (2%)
<i>Amostras inflamatórias, controle ou não infiltradas.</i>	38/79 (48%)	53/100 (49%)
Amostras	Amostras LHC + por CFM (n=25*)	Total (n=100)
Linfonodos	17/25 (68%)	51/100(51%)
 Massa Tumoral	5/25 (20%)	13/100 (13%)
Sistema Nervoso Central	01/05 (20%)	01/13 (8%)
Cabeça e Pescoço	0	01/13 (8%)
Torácica	03/05 (60%)	04/13 (30%)
Axilar	01/05(20%)	01/13 (8%)
Abdominal	0	03/13 (23%)
Pélvica	0	02/13 (15%)
Inguinal	0	01/13 (8%)
 Medula óssea	1/25 (4%)	19/100 (19%)
 Sangue Periférico	0	04/100 (4%)
 Outros fluidos	2/25 (8%)**	13/100 (13%)
Total	25	100

* O número de amostras compatíveis com diagnóstico de LHC por avaliação anatomopatológica somadas as duas amostras de fluidos que não passaram por avaliação citológica; ** Amostras de LCR e efusão pericárdica que foram diagnosticadas como infiltradas por células H/R-S por meio da CFM e não passaram por avaliação citológica.

6.1.2 Descrição das amostras infiltradas por células H/R-S

Do total de 38 amostras coletadas de 26 pacientes com diagnóstico de LHC, 25/38 (66%) apresentavam a célula de H/R-S (14 pelo histopatológico/citometria de fluxo, 9 por histopatológico apenas e 2 por citometria de fluxo). Desses pacientes a mediana de idade foi de 11 anos e a distribuição por sexo foi de 0,6:1 (F:M).

Das amostras avaliadas pelo laboratório de Patologia como compatíveis com LHC, 60% (14/23) obtiveram resultado concordante por CFM. Essas amostras incluíam dez biópsias de linfonodos, três biópsias de massas e uma amostra de medula óssea. Com a consulta aos dados clínicos foi possível aferir que 15 pacientes apresentaram LHC subtipo esclerose nodular enquanto 4 pacientes apresentaram LHC subtipo celularidade mista e em 2 pacientes não foi possível obter o subtipo histopatológico. O intervalo entre o início dos sintomas e o diagnóstico histopatológico, registrado para 16 pacientes, teve mediana de 60 dias (12 dias – 365 dias), (Tabela 3).

Tabela 3: Descritivo das amostras infiltradas por células H/R-S

Nº	Idade, anos	Sexo	Espécime	Subtipo	Versão do tubo	CFM	% células HRS por CFM
1	12	M	Massa torácica	LHCEN	1	-	NA
2	12	F	Linfonodo	LHCEN	1	-	NA
3	14	F	Linfonodo	LHCEN	1	-	NA
4	14	F	Linfonodo	LHCEN	1	-	NA
5	10	M	Linfonodo	LHCEN	1	+	1,4
6	6	F	Linfonodo	LHCCM	1	+	0,19
7	14	M	Massa torácica	LHCEN	1	+	0,004
8	7	F	Linfonodo	LHCEN	1	+	0,04
9	11	M	Massa torácica	LHC	1	-	NA
10	7	F	Linfonodo	LHCEN	1	+	0,02
11	6	F	Linfonodo	LHCEN	1	+	0,009
12	8	M	Linfonodo	LHCEN	1	+	1,27
13	11	F	Linfonodo	LHCCM	1	-	NA
14	9	M	Linfonodo	LHCCM	1	+	0,03
15	16	F	Linfonodo	LHCEN	2	-	NA
16	19	M	Linfonodo	LHC	2	+	0,01
17	12	F	Massa Axilar	LHCEN	2	+	0,04
18	5	F	Linfonodo	LHCCM	2	+	0,01
19	5	F	Medula óssea	LHCCM	2	+	0,02
20	16	M	Efusão Pericárdica*	LHCEN	2	+	1,6
21	16	M	Linfonodo	LHCEN	2	+	0,4
22	5	F	LCR*	LHCCM	2	+	0,01
23	16	F	Linfonodo	LHCEN	2	+	0,02
24	6	F	Biópsia de SNC	LHCCM	2	+	0,01
25	10	M	Linfonodo	LHCEN	2	-	NA

6.2 PERFIL IMUNOFENOTÍPICO DAS CÉLULAS H/R-S

Para a análise de expressão dos marcadores, os dados de fluorescência das populações identificadas foram avaliados por meio de três gráficos distintos. O primeiro foi o *dot plot*, ou gráfico de pontos, onde cada uma das células é representada como um ponto no gráfico e seu deslocamento entre os eixos nos permite inferir a positividade ou negatividade para o marcador estudado. Em seguida, geramos o gráfico *box-plot*, ou diagrama de caixas, onde por meio da representação de medianas e do primeiro e terceiro quartil avaliamos a variação da fluorescência de células H/R-S em cada um dos casos e entre casos distintos. Pelo *box-plot* foi possível comparar também as medianas de fluorescência das células neoplásicas às medianas de fluorescência das populações do infiltrado imune. O último gráfico avaliado foi o histograma, pelo qual visualizamos a distribuição da mediana de fluorescência dos marcadores entre populações de todos os casos avaliados. Na análise das nossas amostras a presença ou ausência de expressão de cada um dos marcadores foi realizada a partir da comparação com uma população de referência do infiltrado imune e que, preferencialmente, fosse caracterizada na literatura pela expressão daquele antígeno. A exceção foi o marcador CD30, típico das células H/R-S.

Durante o período em que a primeira combinação de anticorpos foi testada, um total de 72 amostras foram avaliadas no momento do diagnóstico. Dessas, 19% (14/72) foram diagnosticadas como infiltradas por células H/R-S por histopatológico/IHQ. Quando comparamos os resultados obtidos por CFM e IHQ temos que apenas 8/14 (57%) foram identificadas corretamente como infiltradas por células H/R-S por CFM. Elas compreendiam 7 amostras de biópsia de linfonodo e 1 amostra de biópsia de massa. Nesses 8 casos, o estudo fenotípico das células H/R-S evidenciou que o marcador CD30 foi presente em todos os casos 100% (8/8) (Figura 9). Dentre os outros antígenos estudados, CD15 foi expresso em 50% (4/8) dos casos (Figura 9), CD20 foi presente em 50% (4/8) dos casos (Figura 10) e CD123 foi presente em 25% (2/8) (Figura 11). O marcador HLADR foi positivo nos casos estudados (2/2) (Figura 11). Excepcionalmente, na avaliação de CD3, CD5 e CD45, identificamos um pequeno deslocamento de fluorescência em um subgrupo de células, provavelmente pela formação de rosetas (Figura 10). Por fim, o marcador CD56 não foi presente em nenhuma das amostras (0/8) (Figura 11). O resumo dessa avaliação é encontrado na (Tabela 4), onde a segunda linha apresenta o padrão de expressão de cada marcador estudado, nas células H/R-S, enquanto na

terceira linha é apresentada a frequência absoluta e porcentual dos casos que apresentaram a expressão desses marcadores nas células H/R-S.

Tabela 4: Perfil imunofenotípico das células H/R-S no tubo HD1

Marcadores	CD3	CD5	CD15	CD20	CD30	CD45	CD56	CD123	HLADR
Perfil de marcação nas células H/R-S	NEG	NEG	POS	HET	POS	NEG	NEG	HET	POS
Frequência de marcação entre os casos	(0/8)	(0/6)	(8/8)	(4/8)	(8/8)	(0/8)	(8/8)	(2/8)	(2/2)
	0%	0%	100%	50%	100%	0%	0%	25%	100%

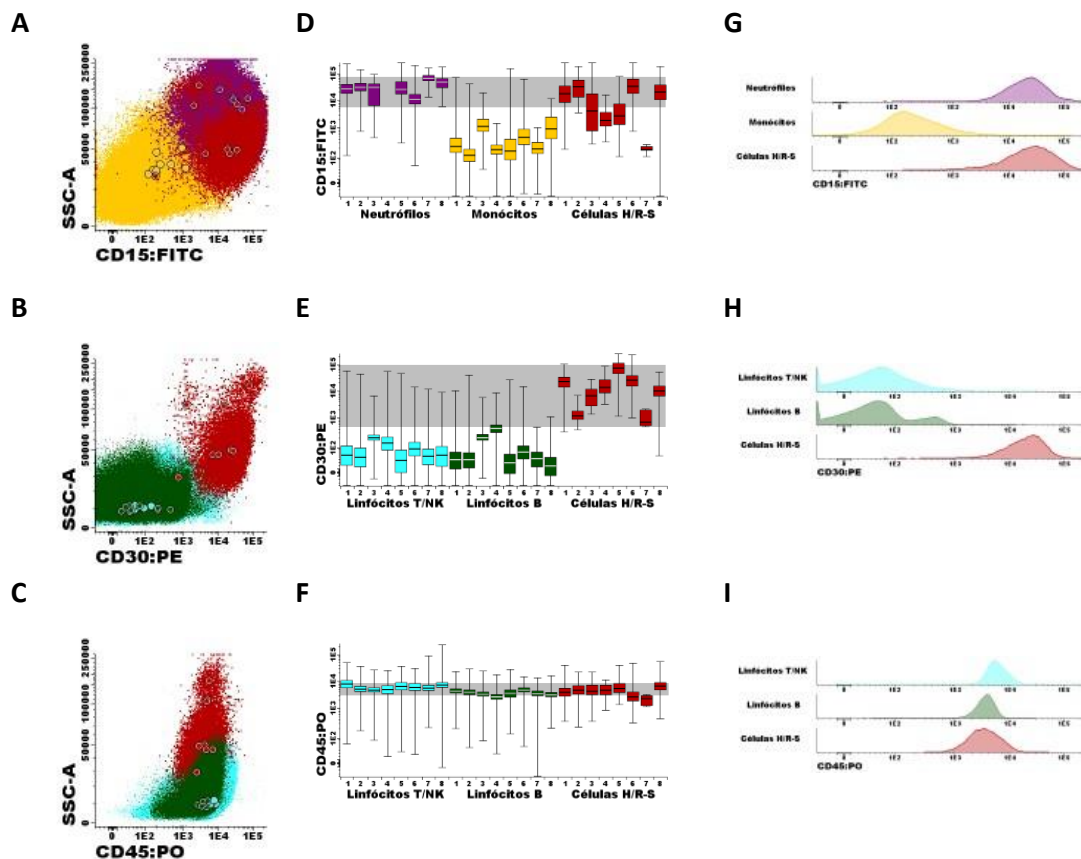


Figura 9 Análise da expressão dos marcadores CD15, CD30, CD45 nas células H/R-S, na primeira combinação de anticorpos. Para avaliação de expressão do marcador CD15 nas células H/R-S (vermelho), elas foram comparadas as populações de neutrófilos (roxo) e monócitos (amarelo). Na avaliação da expressão de CD30 e CD45 as células H/R-S foram comparadas as populações de linfócitos B (verde escuro) e linfócitos T/NK (azul claro). Por meio da interpretação conjunta dos *dot plots* representando a expressão dos marcadores CD15 (A), CD30 (B) e CD45 (C) nas células H/R-S; *Box plots* destacando as diferenças na intensidade média de intensidade de marcação de CD15 (D), CD30 (E) e CD45 (F) nas células H/R-S; E histogramas evidenciam a expressão média dos marcadores CD15 (G), CD30 (H) e CD45 (I) nas células H/R-S; As células neoplásicas foram identificadas a partir de expressão forte de CD30 e expressão variável de CD15, levando em consideração seu deslocamento em CD45.

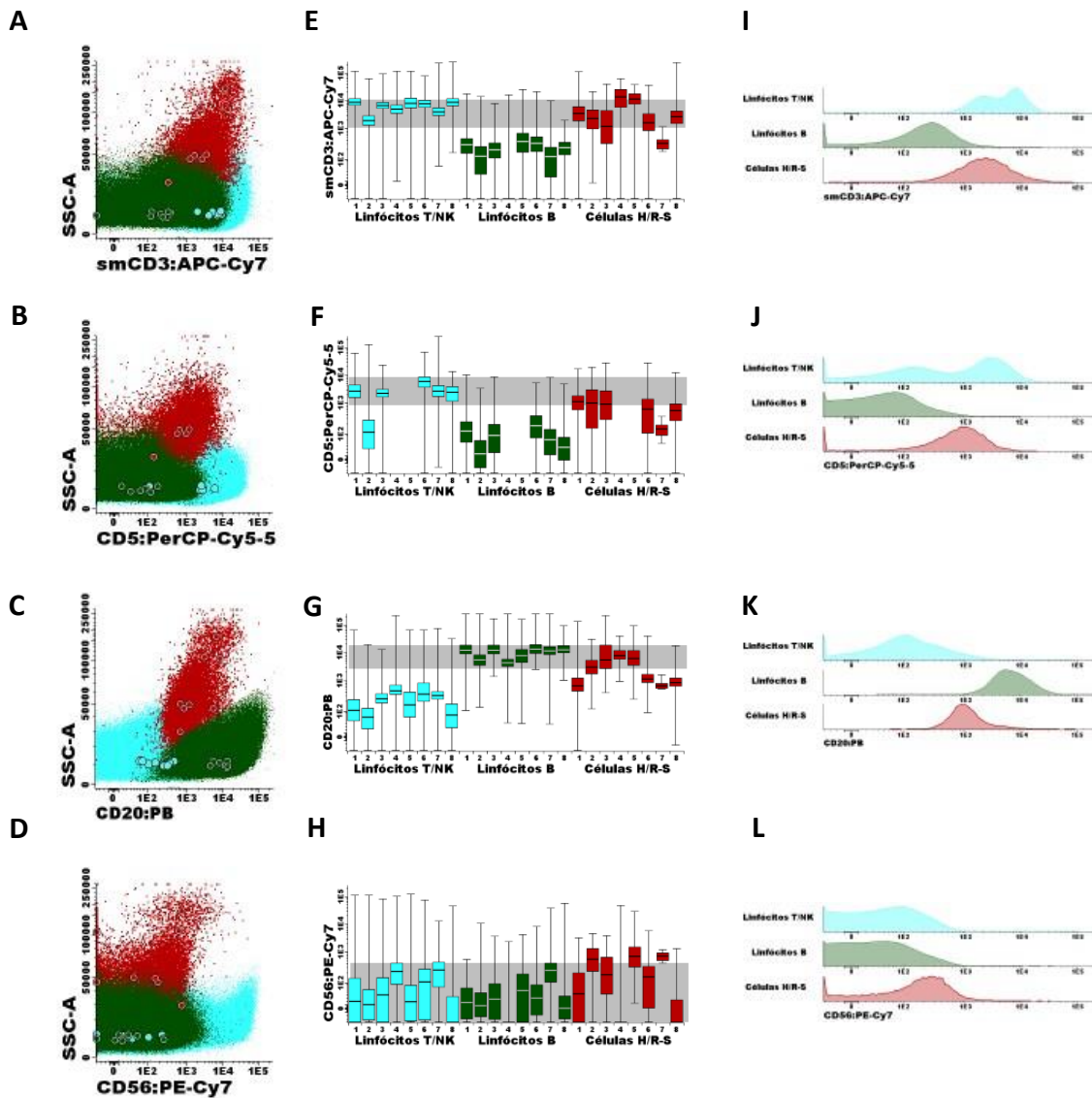


Figura 10 Análise da expressão dos marcadores da linhagem linfóide na primeira combinação de anticorpos. Para avaliação de expressão dos marcadores CD3, CD5, CD20 e CD56 as células H/R-S (vermelho) foram comparadas as populações de linfócitos B (verde escuro) e linfócitos T/NK (azul claro). Por meio da interpretação conjunta dos *dot plots* representando a expressão dos marcadores CD3 (A), CD5 (B), CD20(C) e CD56 (D) nas células H/R-S; *Box plots* destacando as diferenças na intensidade média de intensidade de marcação de CD3 (E), CD5 (F), CD20(G) e CD56 (H) nas células H/R-S; Os histogramas evidenciam a expressão média dos marcadores CD3 (I), CD5 (J), CD20 (K) e CD56 (L) nas células H/R-S; As células neoplásicas demonstraram ausência de expressão para CD3, CD5, embora deslocamento e foram negativas também para expressão de CD56. Quando avaliadas para expressão de CD20, foram positivas em 50% dos casos.

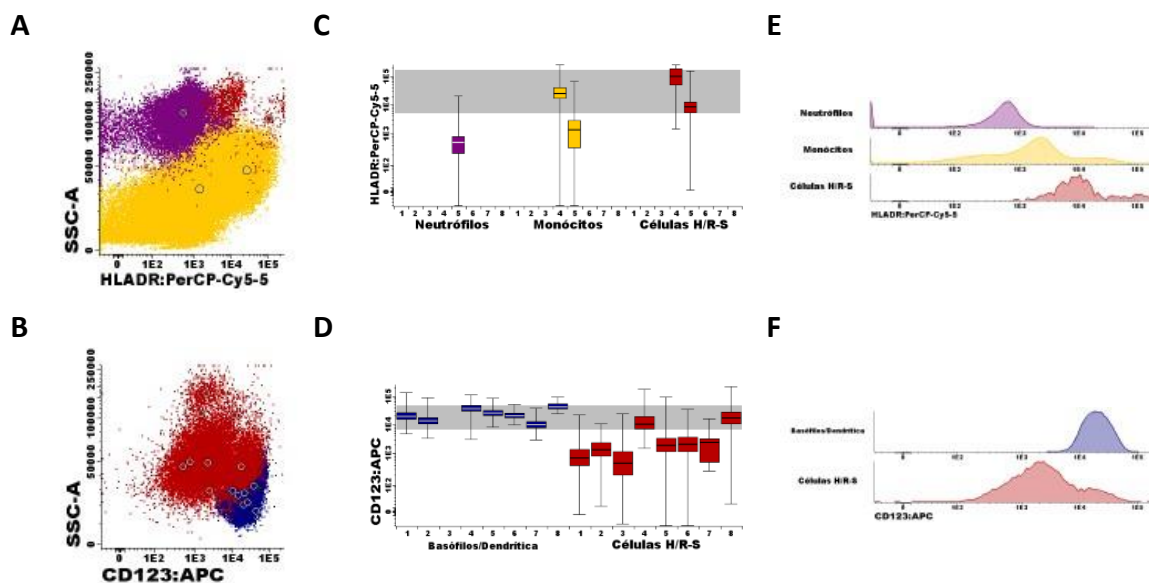


Figura 11 Análise da expressão dos marcadores HLADR e smCD123 nas células H/R-S. Na avaliação de expressão do marcador HLADR as células H/R-S (vermelho) foram comparadas as populações de monócitos (amarelo) e neutrófilos (roxo), já na avaliação da expressão do marcador de CD123 as células H/R-S foram comparadas as populações de basófilos e células dendríticas (azul escuro); Por meio da avaliação conjunta dos *dot plots* representando a expressão dos marcadores CD123 (A) e HLADR (B) nas células H/R-S; *Box plots* destacando as diferenças na intensidade média de intensidade de marcação de CD123 (C) e HLADR (D) nas células H/R-S; E histogramas evidenciando a expressão média dos marcadores CD123 (E) e HLADR (F) nas células H/R-S. As células neoplásicas apresentaram expressão forte para HLADR em dois dos casos, e a expressão de CD123 comparável a expressão de células dendríticas e basófilos em dois dos casos.

Durante o período em que a segunda combinação de anticorpos foi testada, um total de 28 amostras foram avaliadas. Dessas, 11 amostras foram compatíveis com LHC por avaliação anatomopatológica foram encaminhadas para o laboratório de CFM no momento do diagnóstico. Dessas, em posterior comparação com os resultados do laudo patológico, 81% (9/11) das amostras foram identificadas como infiltradas por células H/R-S por CFM. As 9 amostras compreendiam 5 amostras de biópsia de linfonodo, 2 massas, 1 amostra de aspirado de medula, 1 amostra de LCR e 1 amostra de efusão pericárdica. Das 9 amostras uma amostra (1 biópsia de linfonodo) não foi incluída nos gráficos devido a erro técnico no momento de sua aquisição.

Nas amostras analisadas com a segunda combinação de anticorpos, o estudo fenotípico da célula H/R-S evidenciou que os marcadores com maior incidência foram CD30, CD40, nuPAX5 e CD95, pois estavam presentes em 100% (8/8) casos (Figuras 12 e 13). Nessas amostras, o marcador CD15 foi presente em 50% (4/8) dos casos e CD45 manteve o leve deslocamento entre as células Hodgkin/Reed-Sternberg (Figura 12). O marcador CD56 foi negativo em 100% (8/8) dos casos, por isso não apresentou grande relevância nesse grupo

(Figura 13). O resumo dessa avaliação pode ser observado na (Tabela 5), onde a segunda linha apresenta o padrão de expressão de cada marcador estudado, nas células H/R-S, enquanto na terceira linha é apresentada a frequência absoluta e percentual dos casos que apresentaram a expressão desses marcadores nas células H/R-S.

Tabela 5: Perfil imunofenotípico das células H/R-S no Tubo HD2

<i>Marcadores</i>	CD15	CD30	CD40	CD45	CD56	CD95	nuPAX5
<i>Perfil de marcação nas células H/R-S</i>	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	POS
<i>Frequência de marcação entre os casos</i>	(8/8) 100%	(8/8) 100%	(8/8) 100%	(0/8) 0%	(0/8) 0%	(8/8) 100%	(8/8) 100%

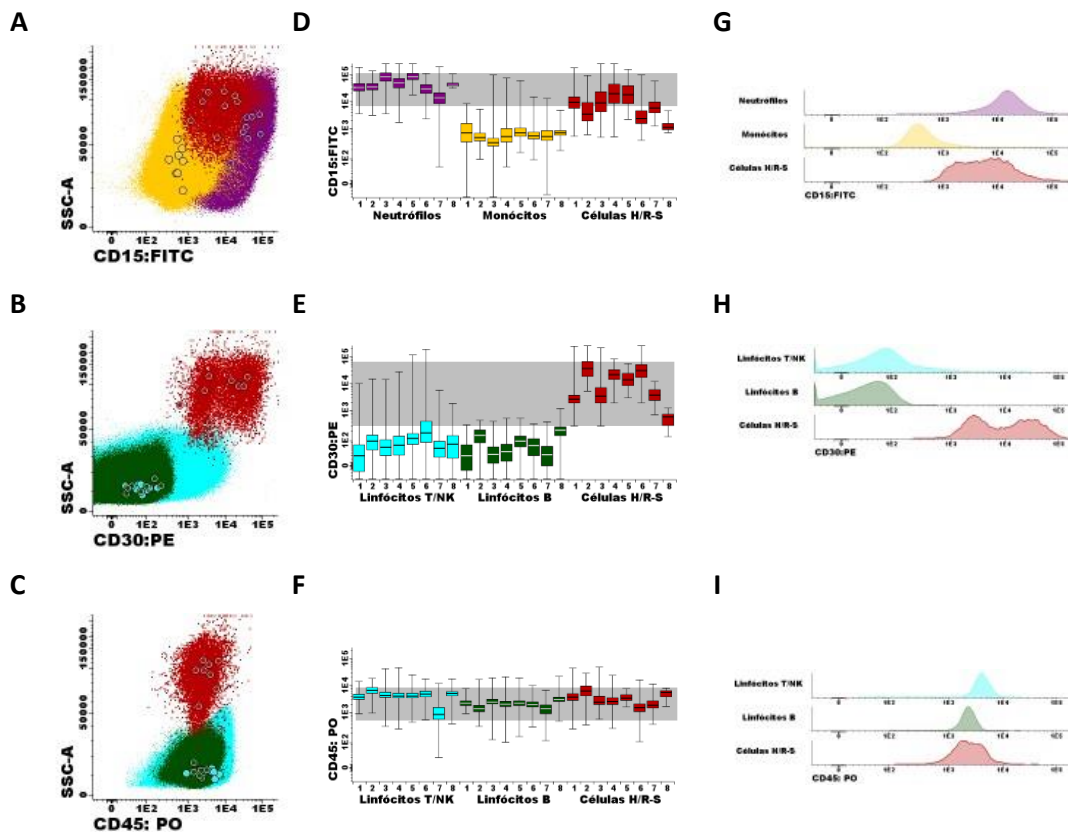


Figura 12 Análise da expressão dos marcadores CD15, CD30 e CD45 nas células H/R-S na segunda combinação de anticorpos. Na avaliação da expressão do marcador CD15 as células H/R-S (vermelho) foram comparadas a população de monócitos (amarelo) e neutrófilos (roxo), já na análise de expressão dos marcadores CD30 e CD45, as células H/R-S foram comparadas as populações de linfócitos B (verde escuro) e linfócitos T/NK (azul claro). Por meio da avaliação conjunta dos *dot plots* representando a expressão dos marcadores CD15 (A), CD30 (B) e CD45 (C) nas células H/R-S; *Box plots* destacando as diferenças na intensidade média de intensidade de marcação de CD15 (D), CD30 (E) e CD45 (F) nas células H/R-S; E histogramas evidenciando a expressão média dos marcadores CD15 (G), CD30 (H) e CD45 (I) nas células H/R-S. As células neoplásicas foram identificadas a partir de expressão forte de CD30 e expressão variável de CD15, levando em consideração o deslocamento em CD45.

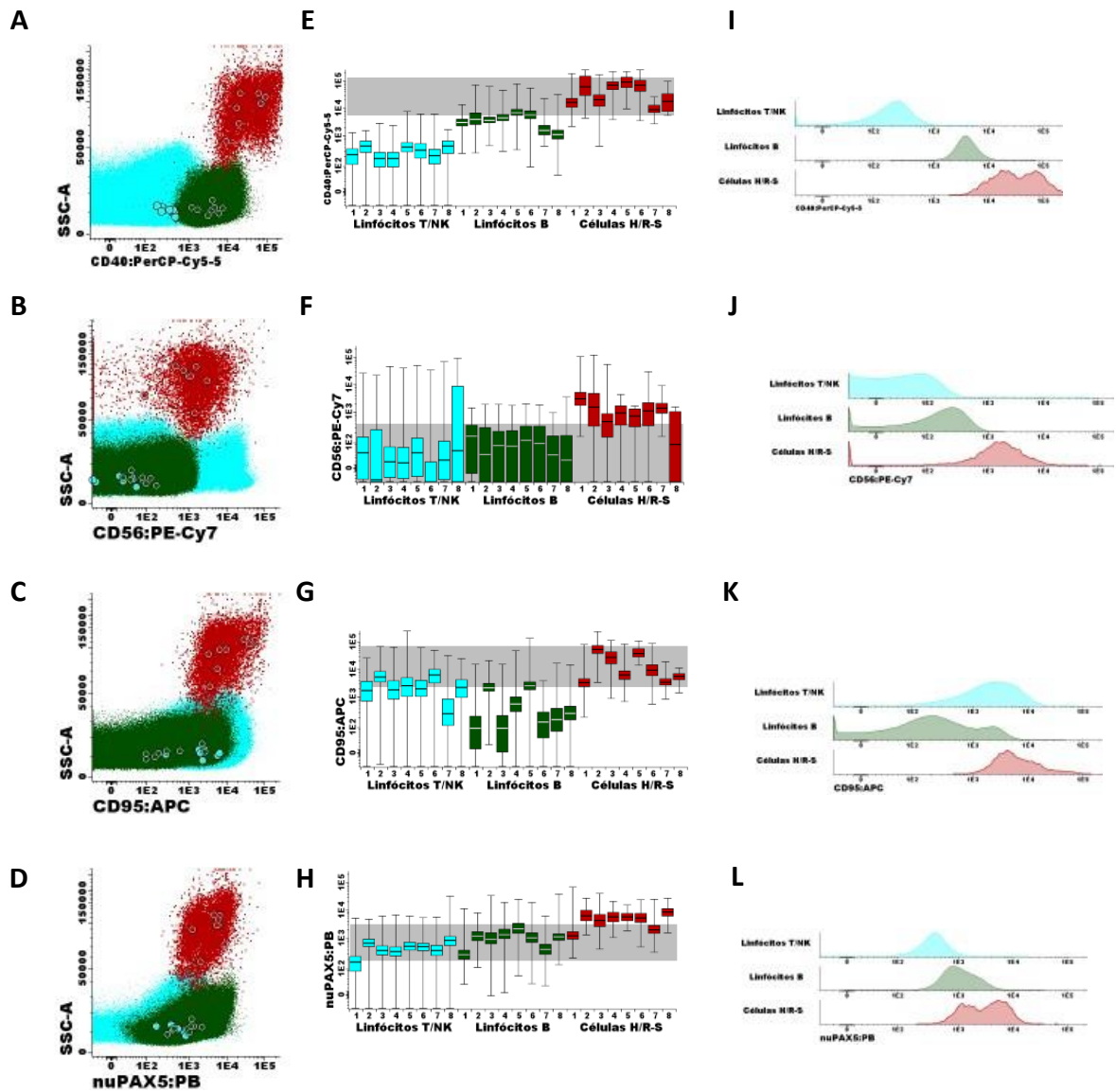


Figura 13 Análise da expressão dos marcadores CD40, CD56, CD95 e nuPAX5 nas células H/R-S. Na avaliação de expressão dos marcadores CD40, CD56, CD95 e nuPAX5 as células H/R-S (vermelho) foram comparadas as populações de linfócitos B (verde escuro) e linfócitos T/NK (azul claro). Por meio da avaliação conjunta dos *dot plots* representando a expressão dos marcadores CD40 (A), CD56 (B), CD95 (C) e nuPAX5 (D) nas células H/R-S; *Box plots* destacando as diferenças na intensidade média de intensidade de marcação de CD40 (E), CD56 (F), CD95 (G), nuPAX5 (H) nas células H/R-S; E histogramas evidenciando a expressão média dos marcadores CD40 (I), CD56 (J), CD95 (K) e nuPAX5 (L) nas células H/R-S. As células H/R-S foram identificadas por meio de sua expressão forte para CD40, CD95 quando comparadas às populações linfóides do infiltrado imune. Já o fator transcricional PAX5 foi positivo nas células H/R-S em intensidade comparável a sua marcação em linfócitos B. Como nos casos anteriores, CD56 não foi expresso nas células neoplásicas.

6.3 IDENTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS H/R-S VERSUS INFILTRADO IMUNE

Na análise fenotípica do infiltrado imune em amostras diagnosticadas com linfoma de Hodgkin foi possível a classificação das principais populações de linfócitos (B,T e NK) e populações do setor mieloide, que incluíram monócitos, neutrófilos e eosinófilos.

As análises foram realizadas nas duas combinações de anticorpos. Na primeira combinação, o estudo fenotípico dos linfócitos T e NK evidenciou que os marcadores com maior incidência nessas populações foram CD3 e CD45, presentes em 100% (8/8) das amostras. O marcador CD56, em específico, foi heterogêneo em 100% (8/8) dos casos. Outros marcadores estudados incluíram o marcador CD5, que foi presente em 83% (5/6) das amostras. As populações de linfócitos T/NK não apresentaram expressão de CD15, CD20, CD30, CD123 e HLADR (Figura 14).

Na população de linfócitos B os marcadores que apresentaram maior incidência foram CD20 e CD45, expressos em 100% das amostras (8/8). Outro marcador estudado foi o HLADR presente em todas as amostras (2/2) em que foi estudado. As populações de linfócitos B não apresentaram expressão de CD3, CD5, CD15, CD30, CD56 e CD123 (Figura 14).

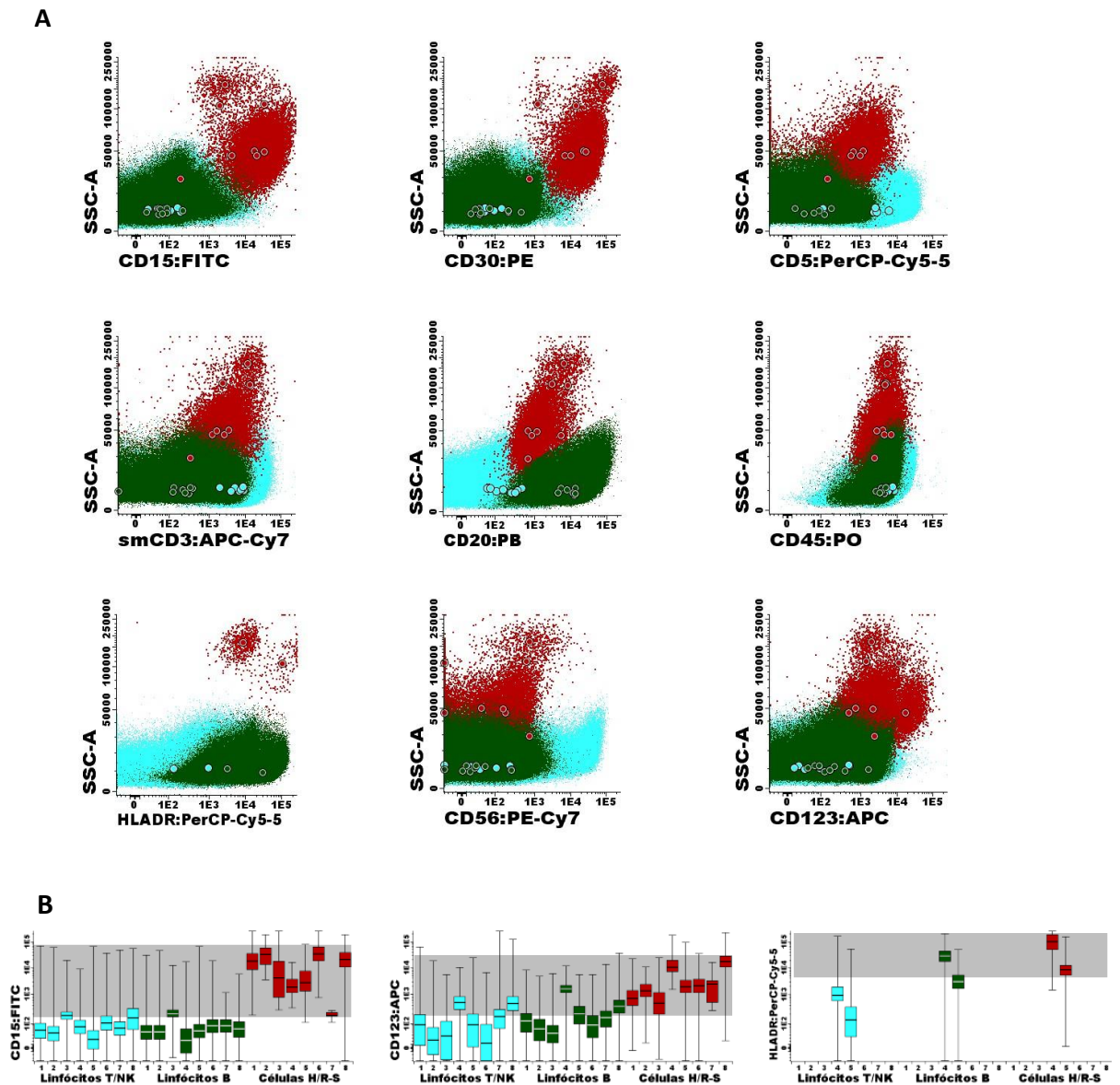


Figura 14 Análise do padrão imunofenotípico de linfócitos T/NK e linfócitos B, na primeira combinação de anticorpos. (A) *Dot plots* representando a expressão imunofenotípica das populações de linfócitos T/NK (azul claro) e linfócitos B (verde escuro) das oito amostras analisadas em cada um dos anticorpos versus sua granulocidade (SSC). Abaixo, os histogramas (B) comparativos entre as populações de linfócitos T/NK, linfócitos B e células H/R-S, demonstram a diferença do deslocamento nos marcadores CD15, CD123 e HLADR, respectivamente.

O estudo fenotípico dos monócitos evidenciou que os marcadores com maior incidência foi CD45 e CD15 expressos em 100% (8/8) das amostras, já o marcador HLADR foi presente em 50% (1/2) dos casos em que foi avaliado. Os outros marcadores estudados, CD3, CD5, CD20, CD30, CD56, CD123 não foram presentes na população de monócitos (Figuras 15 e 16).

A população de neutrófilos foi identificada em 7/8 casos, neles os marcadores com maior incidência foram CD15 e CD45 presentes em 100% (7/7) das amostras. Já os marcadores, CD3, CD5, CD20, CD30, CD56, CD123 e HLADR não foram expressos em nenhum dos casos (Figuras 15 e 16).

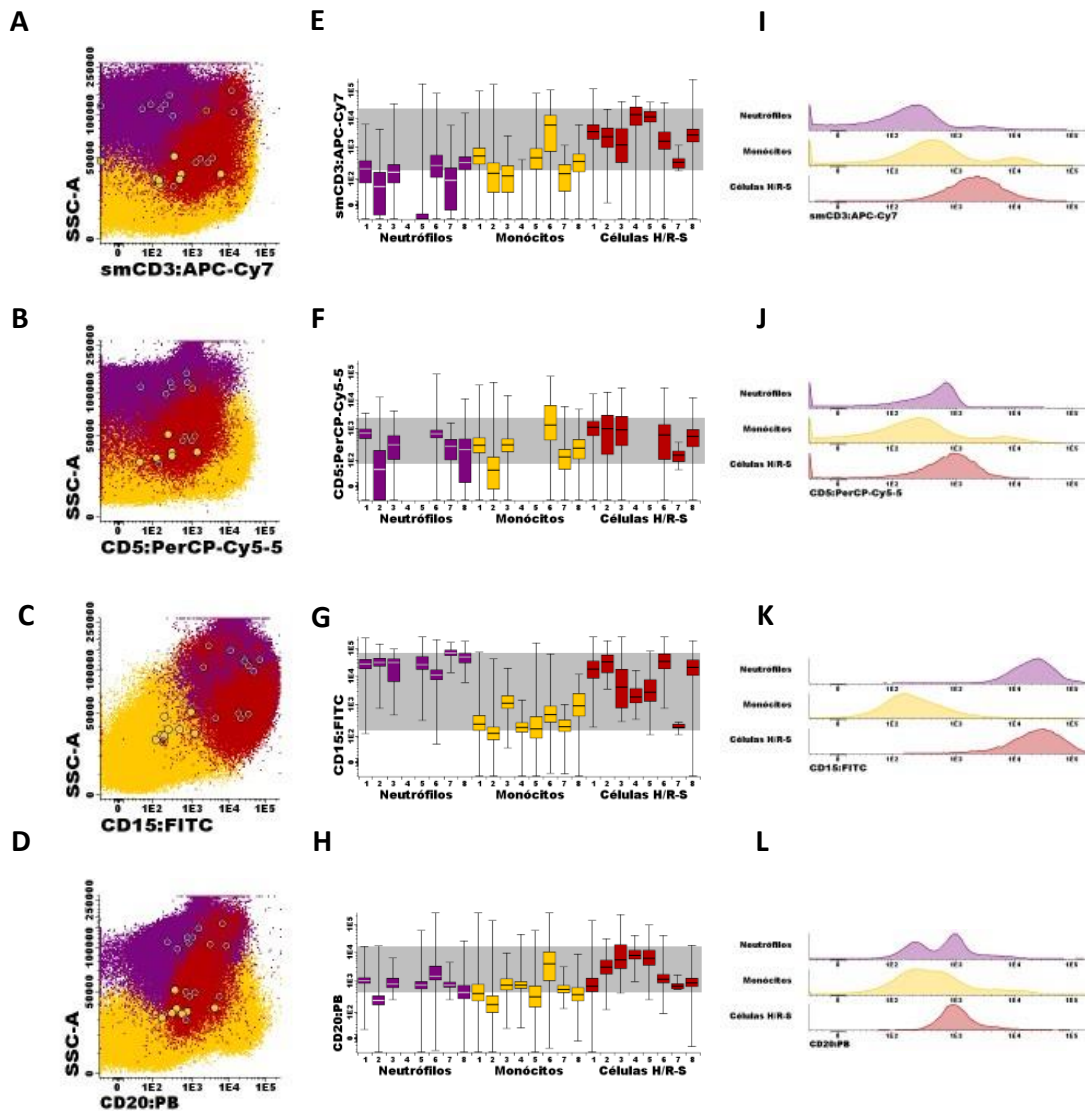


Figura 15 Perfil imunofenotípico das populações de monócitos e neutrófilos na primeira combinação de anticorpos. *Dot plots* representando a expressão dos marcadores CD3 (A), CD5 (B), CD15 (C) e CD20 (D) nas populações de monócitos e neutrófilos; *Box plots* destacando as diferenças na intensidade média de intensidade de marcação de CD3 (E), CD5 (F), CD15 (G) e CD20 (H) nas populações de monócitos e neutrófilos; E histogramas evidenciando a expressão média dos marcadores CD3 (I), CD5 (J), CD15 (K) e CD20 (L) nas populações de monócitos e neutrófilos. A população de monócitos apresentou expressão fraca de CD15 na ausência de expressão de CD3, CD5 e CD20. A população de neutrófilos foi caracterizada a partir da expressão forte e uniforme de CD15 na ausência de CD3, CD5 ou CD20.

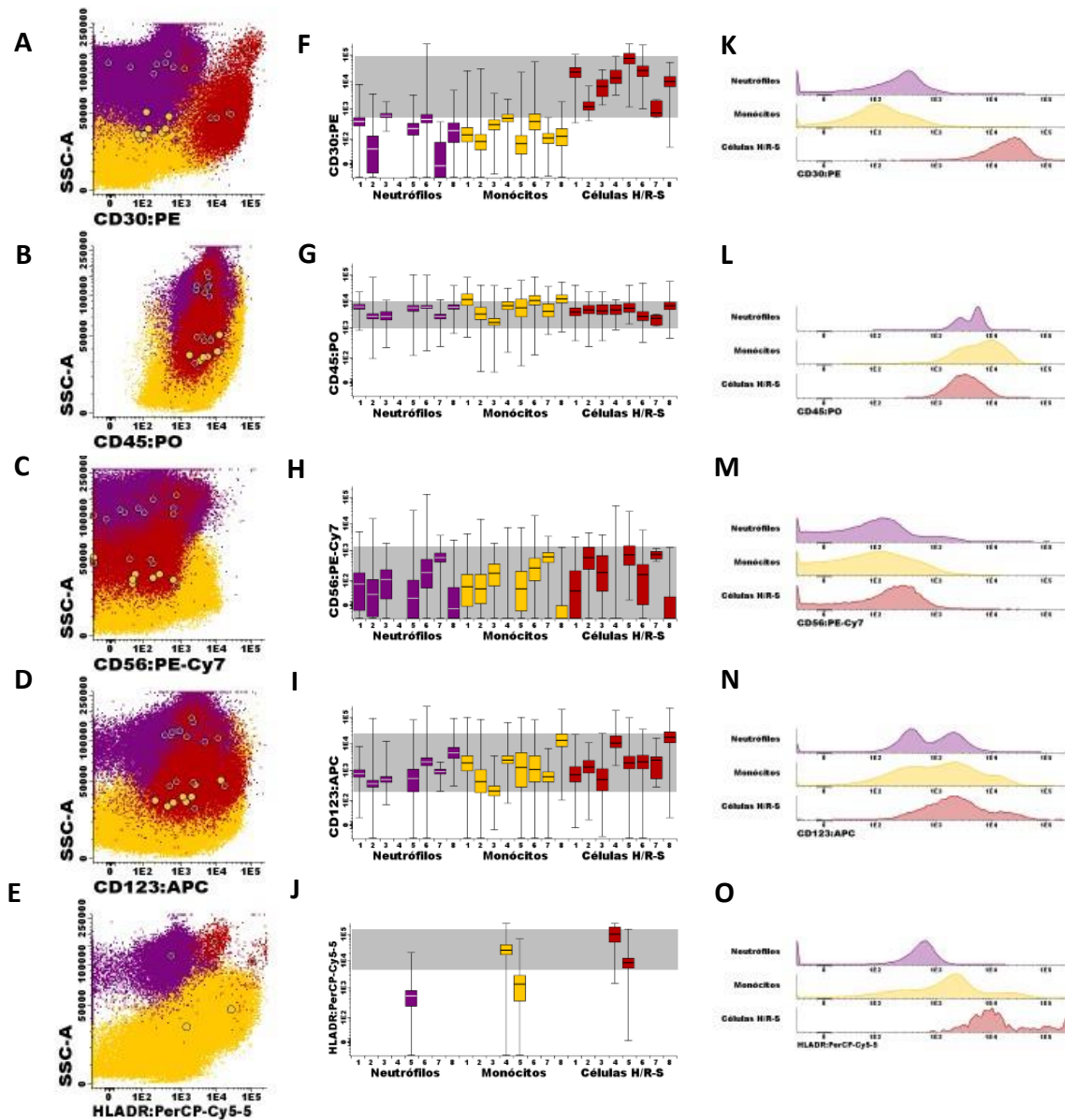


Figura 16 Perfil imunofenotípico das populações de monócitos e neutrófilos na primeira combinação de anticorpos (Continuação). *Dot plots* representando a expressão dos marcadores CD30 (A), CD45 (B), CD56 (C), CD123 (D) e HLADR (E) nas populações de monócitos (amarelo) e neutrófilos (roxo); *Box plots* destacando as diferenças na intensidade média de intensidade de marcação de CD30 (F), CD45 (G), CD56 (H), CD123 (I) e HLADR (J) nas populações de monócitos e neutrófilos. Histogramas evidenciando a expressão média dos marcadores CD30 (K), CD45 (L), CD56 (M), CD123 (N) e HLADR (O) nas populações de monócitos e neutrófilos. A população de monócitos apresentou expressão uniforme de CD45. O antígeno HLADR foi avaliado excepcionalmente em dois casos e foi positivo em um deles, já o marcador CD123 não foi expresso em monócitos. Já a população de neutrófilos foi identificada em 7/8 casos analisados e apresentou expressão forte e uniforme de CD45 em ausência de expressão de CD56 e CD123. A expressão de HLADR em neutrófilos foi ausente no único caso em que foi avaliada.

A população de eosinófilos foi identificada em 50% dos casos (4/8). Quando avaliamos essa população, os marcadores com maior incidência foram CD15 e CD45, presentes em 100%

(4/4) das amostras (Figuras 17 e 18). Os marcadores CD3, CD5, CD20, CD30, CD56, CD123 e HLADR não foram presentes em nenhum dos casos (Figuras 17 e 18). Por fim, as células dendríticas e os basófilos foram identificados em 7/8 casos e demonstraram maior incidência de expressão de CD123 e CD45, presente em 100% (7/7) dos casos (Figuras 17 e 18). O marcador HLADR foi expresso em 50% (1/2) dos casos estudados. Outros marcadores como CD3, CD5, CD15, CD20, CD30, CD56 não foram detectados nessa população (Figuras 17 e 18).

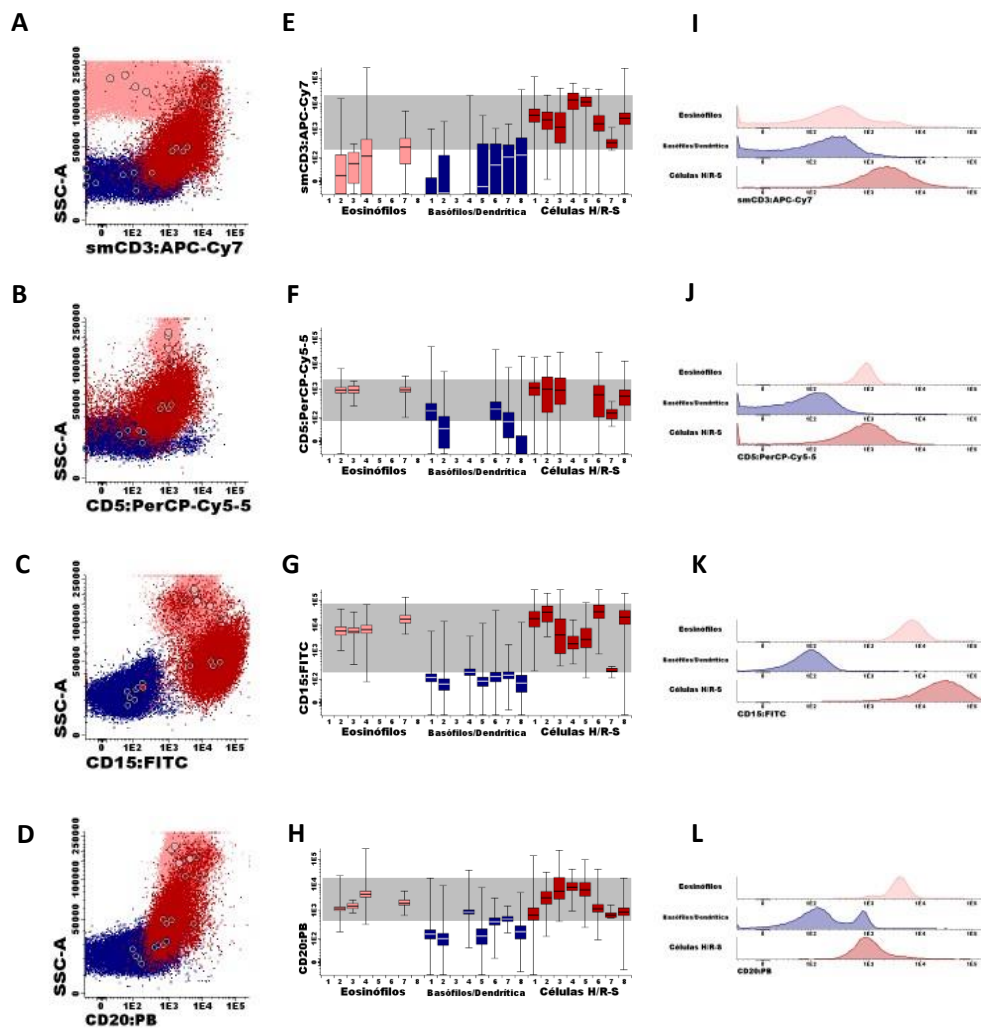


Figura 17 Perfil imunofenotípico das populações de eosinófilo e células dendríticas e basófilos na primeira combinação de anticorpos. *Dot plots* representando a expressão dos marcadores CD3 (A), CD5 (B), CD15 (C) e CD20 (D) nas populações de eosinófilos (rosa), células dendríticas/basófilos (azul escuro); *Box plots* destacando as diferenças na intensidade média de intensidade de marcação de CD3 (E), CD5 (F), CD15 (G) e CD20 (H) nas populações de eosinófilos, células dendríticas/basófilos. Histogramas evidenciando a expressão média dos marcadores CD3 (I), CD5 (J), CD15 (K) e CD20 (L) nas populações de eosinófilos, células dendríticas/basófilos. Os eosinófilos foram identificados em 4/8 dos casos e apresentaram expressão de CD15 forte, na ausência de expressão de CD3, CD5 e CD20. Os basófilos e células dendríticas foram identificados em 7/8 dos casos e não apresentaram expressão para CD3, CD5, CD15 ou CD20.

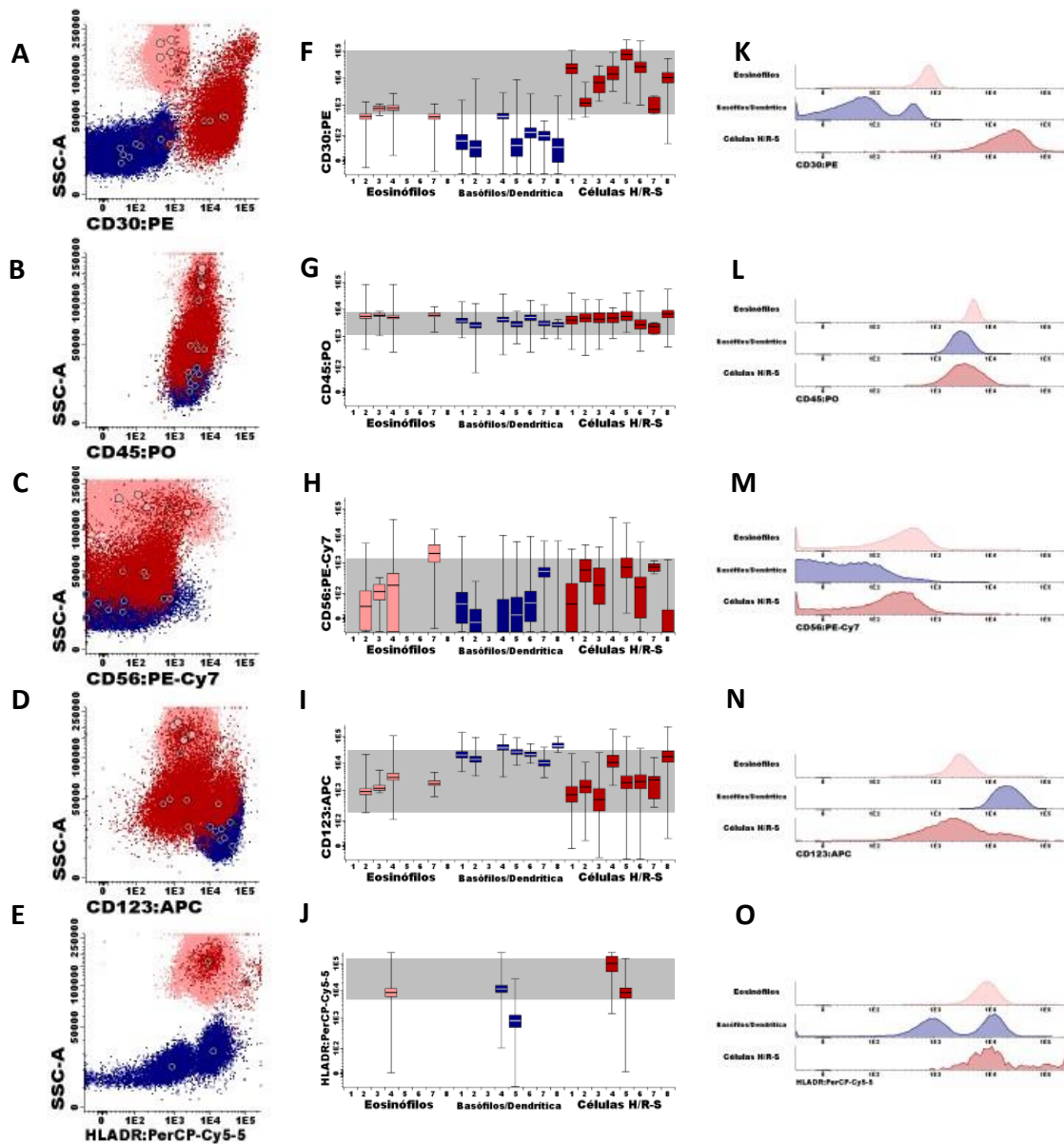


Figura 18 Perfil imunofenotípico das populações de eosinófilos, células dendríticas e basófilos na primeira combinação de anticorpos (Continuação). *Dot plots* representando a expressão dos marcadores CD30 (A), CD45 (B), CD56 (C), CD123 (D) e HLADR (E) nas populações de eosinófilos (rosa), células dendríticas/basófilos (azul escuro); *Box plots* destacando as diferenças na intensidade média de intensidade de marcação de CD30 (F), CD45 (G), CD56 (H), CD123(I) e HLADR (J) nas populações de eosinófilos, células dendríticas/basófilos; Histogramas evidenciando a expressão média dos marcadores CD30 (K), CD45 (L), CD56 (M), CD123 (N) e HLADR (O) nas populações de eosinófilos, células dendríticas/basófilos. A população de eosinófilos identificada em 4 casos e apresentou expressão para CD45 em ausência de expressão de CD30, CD56, CD123 e HLA-DR. Já a população de basófilos e células dendríticas foi identificada em 7/8 dos casos e apresentou expressão de CD45 e HLADR, associada a expressão de CD123 forte, em ausência de expressão de CD30 e CD56.

Na segunda combinação de anticorpos, o estudo imunofenotípico dos linfócitos T/NK evidenciou que os marcadores com maior incidência nessas populações foram os marcadores CD45, presente em 100% (8/8) dos casos, e o marcador CD95, foi expresso em 25% (2/8) dos

casos, respectivamente. O marcador CD56 foi heterogêneo em 100% (8/8) dos casos. Os marcadores CD15, CD30, CD40 e nuPAX5 foram negativos em 100% (8/8) das populações de linfócitos T/NK avaliadas (Figura 19). Ao avaliar os linfócitos B, os marcadores que apresentaram maior incidência foram CD45 e nuPAX5, presentes em 100% (8/8) dos casos, seguido pelo marcador CD40, presente em 75% (6/8) dos casos. Além desses marcadores, o marcador CD95 foi expresso em 25% (2/8) dos casos. Não houve expressão de CD15, CD30 e CD56 nessa população (Figura 19).

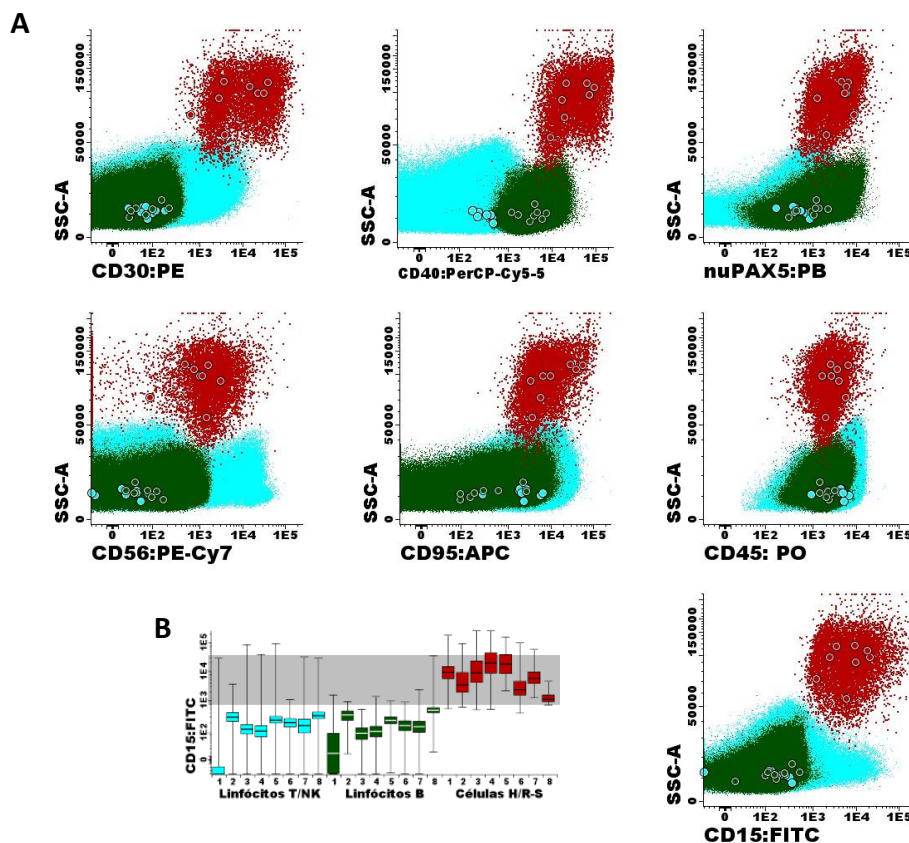


Figura 19 Análise do padrão imunofenotípico de linfócitos T/NK e linfócitos B, na segunda combinação de anticorpos. (A) *Dot plots* representando a expressão imunofenotípica das populações de linfócitos T/NK e linfócitos B das oito amostras analisadas em cada um dos anticorpos versus sua granulocidade (SSC). (B) Abaixo, o histograma e *dot plots* representam populações de linfócitos T/NK, linfócitos B e células H/R-S e demonstram a diferença do deslocamento no marcador CD15.

O estudo fenotípico dos monócitos evidenciou que os marcadores com maior incidência nessa população foram o CD45 e CD15 presentes em 100% (8/8) e CD40, presente em 50% (4/8) dos casos. Já o marcador CD95 foi expresso em 62% (5/8) dos casos. Os monócitos não

apresentaram marcação para CD30, CD56 e nuPAX5 em nenhum dos casos (8/8) (Figuras 20 e 21).

Na análise das populações de neutrófilos os marcadores CD15 e CD45 foram presentes em 100% (8/8) dos casos. Não houve marcação para CD30, CD40, CD56, CD95 e nuPAX5 em nenhum dos casos (8/8) (Figuras 20 e 21).

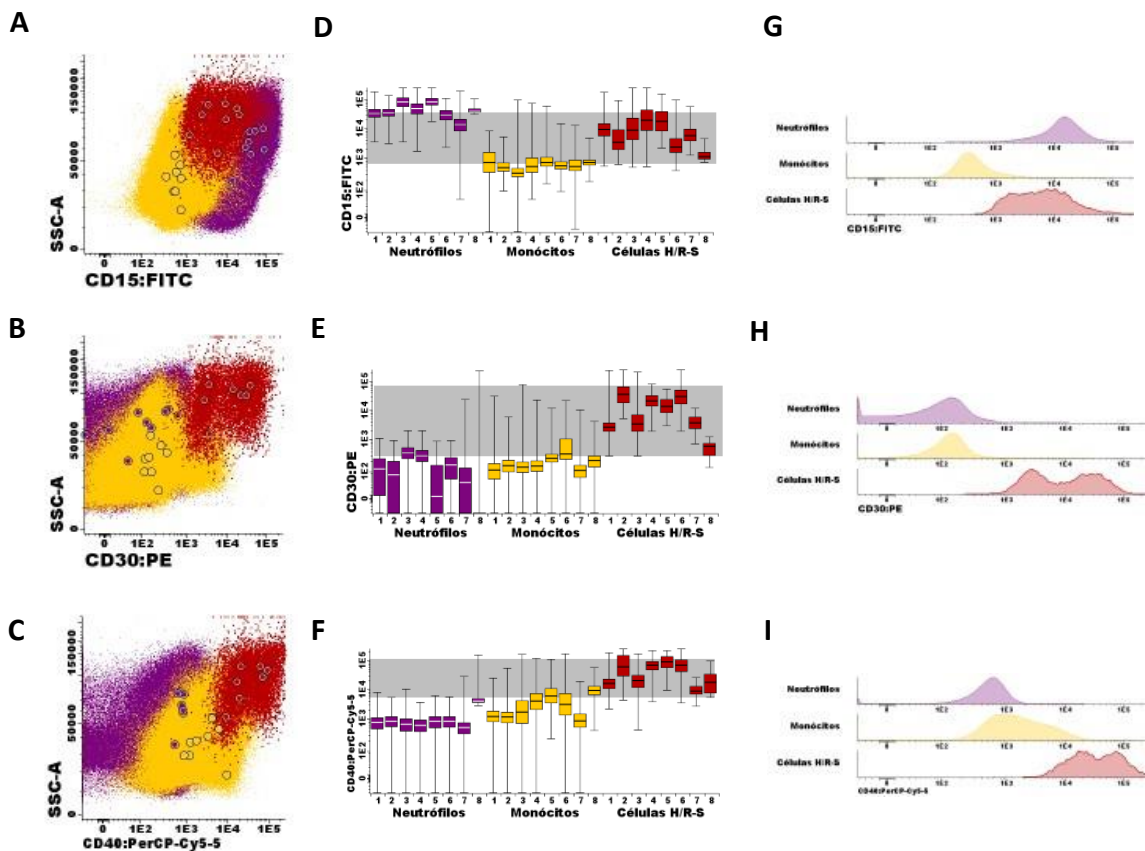


Figura 20 Perfil imunofenotípico das populações de neutrófilos e monócitos na segunda combinação de anticorpos. *Dot plots* representando a expressão dos marcadores CD15 (A), CD30 (B) e CD45 (C) nas populações de monócitos (amarelo) e neutrófilos (roxo); *Box plots* destacando as diferenças na intensidade média de intensidade de marcação de CD15 (D), CD30 (E) e CD45 (F) nas populações de monócitos e neutrófilos. Histogramas evidenciando a expressão média dos marcadores CD15 (G), CD30 (H) e CD45 (I) nas populações de monócitos e neutrófilos. A população de monócitos apresentou expressão fraca de CD40 e CD15 em todos os casos associada a ausência de expressão de CD30. Já a população de neutrófilos apresentou expressão forte e uniforme de CD15, associada a ausência de expressão de CD30 e CD40.

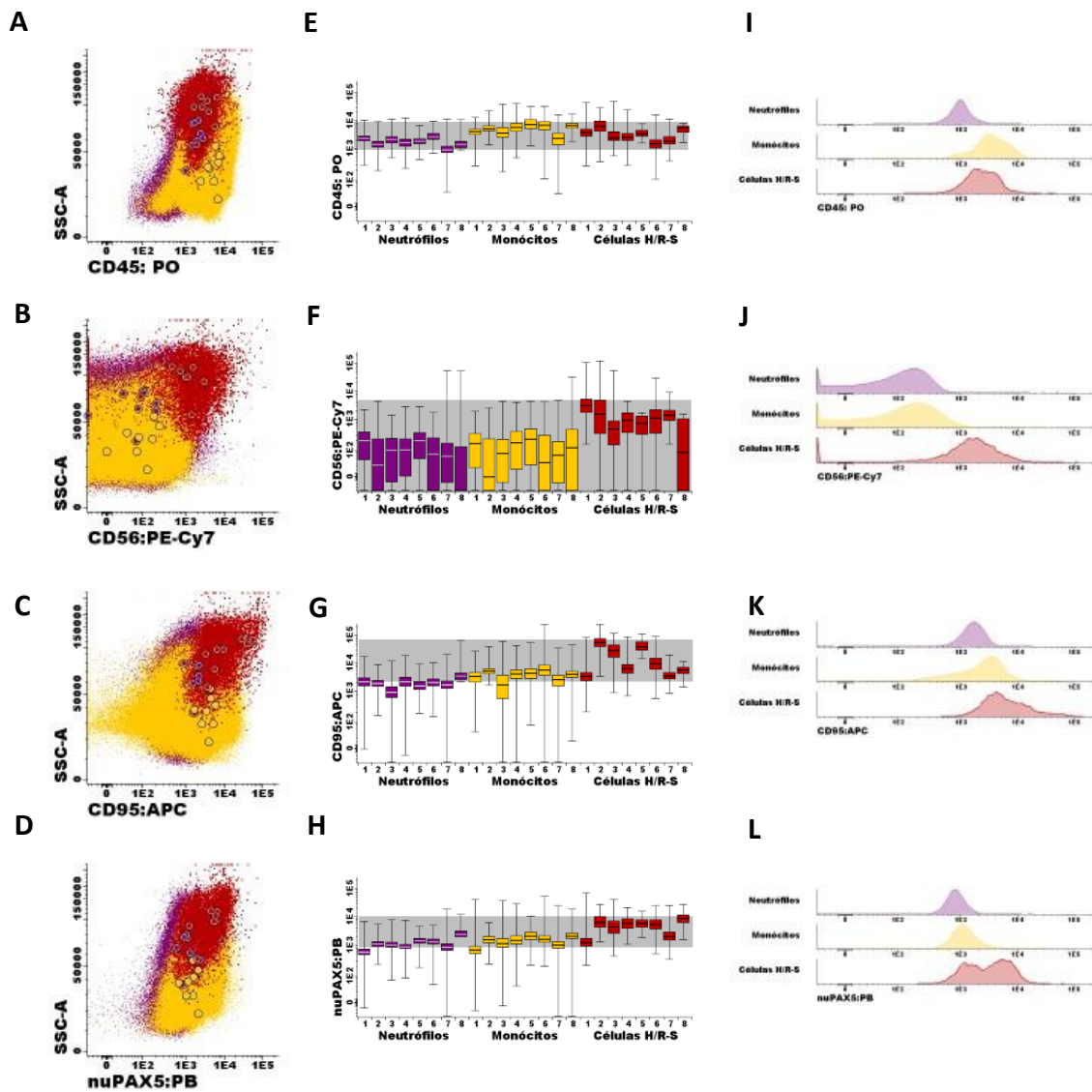


Figura 21 Perfil imunofenotípico das populações de neutrófilos e monócitos na segunda combinação de anticorpos (Continuação). *Dot plots* representando a expressão dos marcadores CD45 (A), CD56 (B), CD95 (C) e nuPAX5 (D) nas populações de monócitos (amarelo) e neutrófilos (roxo); *Box plots* destacando as diferenças na intensidade média de marcação de CD45 (E), CD56 (F), CD95 (G) e nuPAX5 (H) nas populações de monócitos e neutrófilos. Histogramas evidenciando a expressão média dos marcadores CD45 (I), CD56 (J), CD95 (K) e nuPAX5 (L) nas populações de monócitos e neutrófilos. A população de monócitos foi identificada a partir da expressão de CD45 associada a expressão fraca de CD95 em ausência de expressão de CD56 e nuPAX5. A população de neutrófilos, assim como a de monócitos, foi identificada a partir da expressão de CD45, a expressão fraca de CD95 em ausência de expressão de CD56 e nuPAX5.

Por fim, o estudo das populações de eosinófilos, identificados em 7 casos, evidenciou que os marcadores com maior incidência nessa população foram CD15 e CD45, presentes em 100% das amostras (7/7). Os marcadores CD30, CD40, CD56, CD95 e nuPAX5 não foram expressos em nenhuma das amostras (5/5) (Figuras 22 e 23).

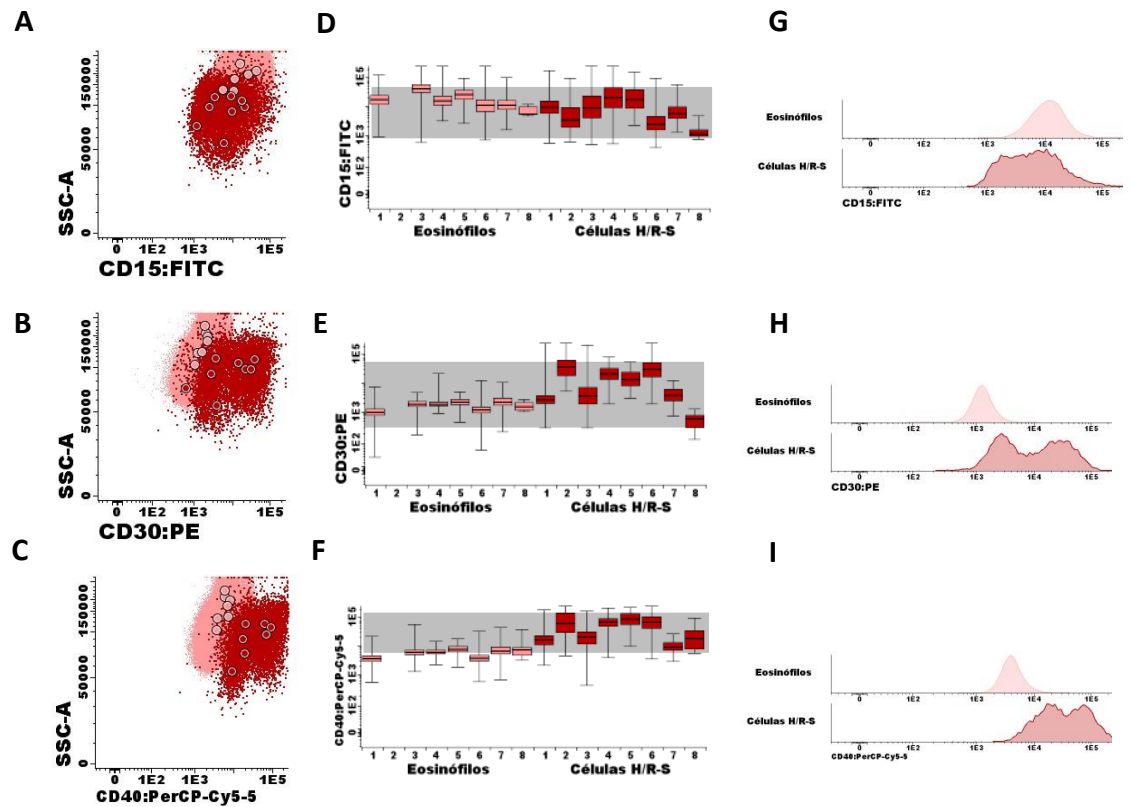


Figura 22 Perfil imunofenotípico das populações de eosinófilos na segunda combinação de anticorpos. *Dot plots* representando a expressão dos marcadores CD15 (A), CD30 (B) e CD40 (C), nas populações de eosinófilos (rosa claro) ; *Box plots* destacando as diferenças na intensidade média de intensidade de marcação de CD15 (D), CD30 (E) e CD40 (F) nas populações de eosinófilos. Histogramas evidenciando a expressão média dos marcadores CD15 (G), CD30 (H) e CD40 (I) nas populações de eosinófilos. A população de eosinófilos foi identificada a partir da expressão de CD15 em ausência de expressão de CD30 e CD40.

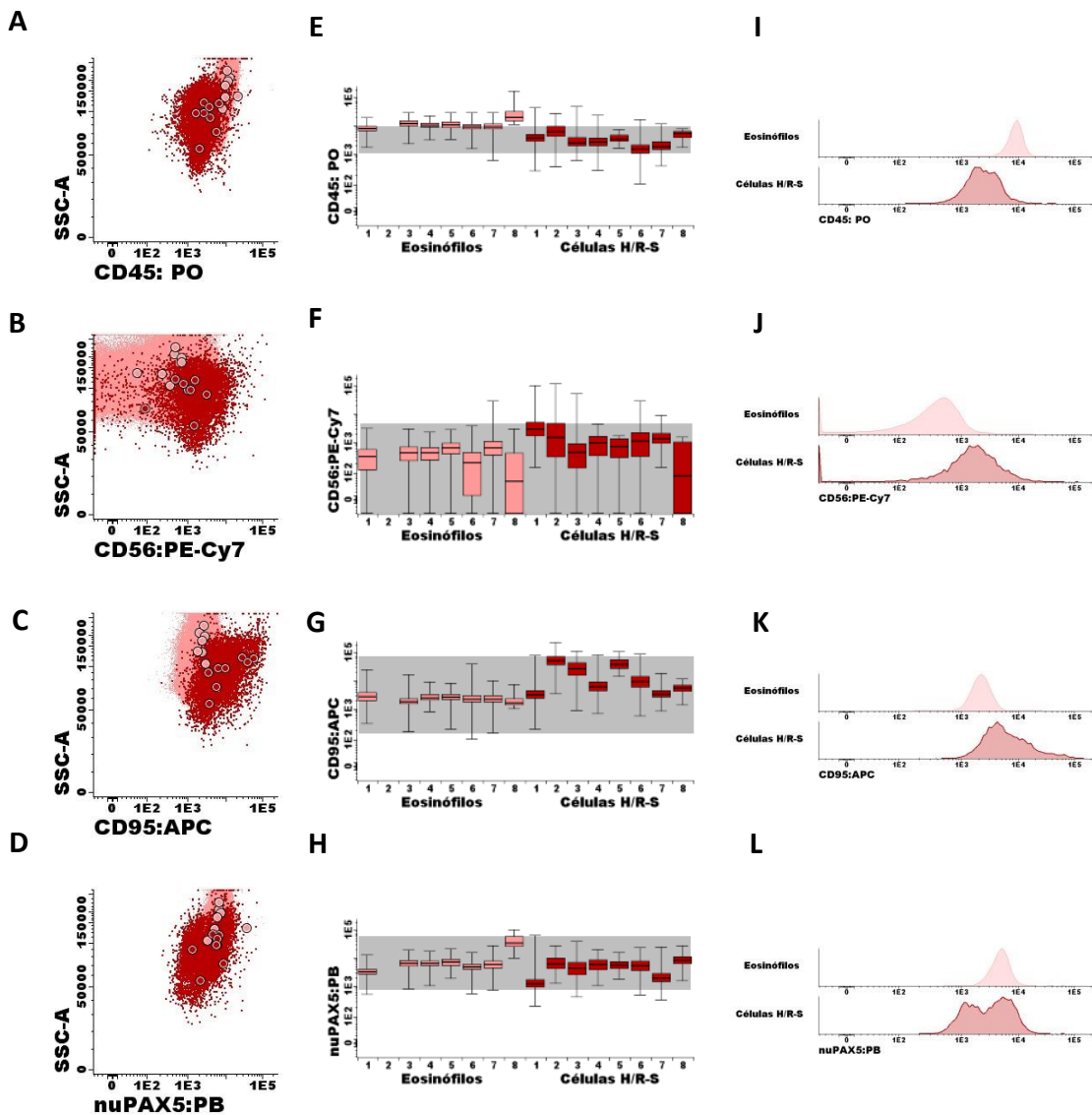


Figura 23 Perfil imunofenotípico das populações de eosinófilos na segunda combinação de anticorpos (Continuação). *Dot plots* representando a expressão dos marcadores CD45 (A), CD56 (B), CD95 (C) e nuPAX5 (D) nas populações de eosinófilos (rosa claro); *Box plots* destacando as diferenças na intensidade média de intensidade de marcação de CD45 (E), CD56 (F), CD95 (G) e nuPAX5 (H) nas populações de eosinófilos. Histogramas evidenciando a expressão média dos marcadores CD45 (I), CD56 (J), CD95 (K) e nuPAX5 (L) nas populações de eosinófilos. A população de eosinófilos foi identificada a partir da expressão de CD45 associada a expressão fraca de CD95 em ausência de expressão de CD56 e nuPAX5.

6.4 SELEÇÃO DOS MARCADORES MAIS IMPORTANTES PARA DISTINÇÃO DAS CÉLULAS H/R-S E OUTRAS POPULAÇÕES

Após avaliação das duas combinações de anticorpos nas amostras infiltradas por LHC, os marcadores principais para distinção das células H/R-S das células normais do infiltrado imune foram calculados utilizando a ferramenta estatística de Análise Canônica (CA), presente no software *Infinicyt*.

As células H/R-S foram comparadas às populações de linfócitos e células mieloides identificadas em cada tubo. Na primeira combinação de anticorpos, os marcadores mais importantes para separação das células H/R-S de linfócitos T/NK e linfócitos B foram CD15, CD30 e CD45 (Figura 24A). Na comparação das células H/R-S com monócitos e neutrófilos os marcadores mais importantes para separação destas populações foram CD30, CD20, CD45 (Figura 24B). Na comparação das células H/R-S e eosinófilos os marcadores mais importantes para separação foram CD30, CD20 e CD45 (Figura 24C).

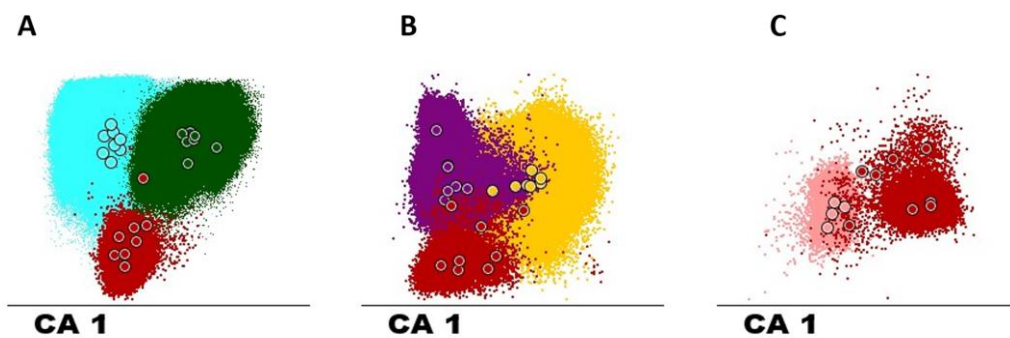


Figura 24 Análise Canônica para definição dos marcadores que melhor distinguem as populações avaliadas dentro da primeira combinação de anticorpos. A) Células H/R-S versus Linfócitos T/NK e B; B) Células H/R-S versus monócitos e neutrófilos; C) Células H/R-S versus eosinófilos.

Na segunda combinação de anticorpos, os marcadores mais importantes para separação das células H/R-S e linfócitos T/NK e linfócitos B foram CD15, CD30 e CD45 (Figura 25A). Na comparação das células H/R-S com monócitos e neutrófilos os marcadores mais importantes para separação destas populações foram CD45, CD40 e ν PAX5 (Figura 25B). Por fim, na separação das células H/R-S e eosinófilos os marcadores mais importantes foram CD45, CD30 e CD95 (Figura 25C).

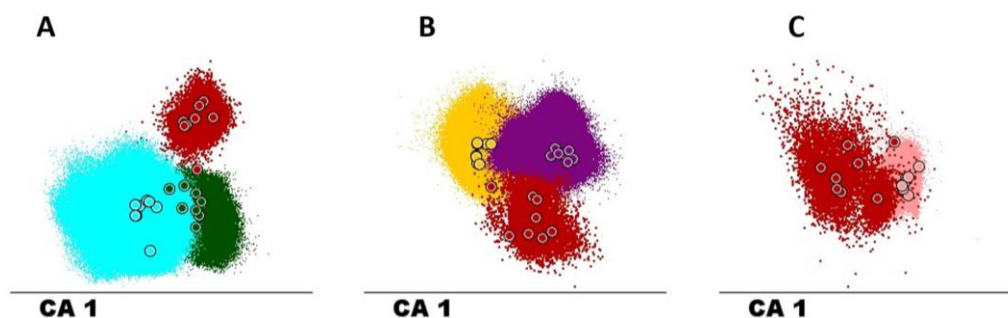


Figura 25 Análise Canônica para definição dos marcadores que melhor distinguem as populações avaliadas dentro da segunda combinação de anticorpos. A) Células H/R-S *versus* Linfócitos T/NK e B; B) Células H/R-S *versus* monócitos e neutrófilos; C) Células H/R-S *versus* eosinófilos.

6.5 ANÁLISE DO NÚMERO DE EVENTOS E VIABILIDADE CELULAR

6.5.1 Análise de total das amostras

O número de eventos, viabilidade celular e número de células neoplásicas identificadas em cada amostra foi estudada em todos os casos. Para tal, nossa coorte foi dividida em dois grandes grupos, o primeiro, composto por 72 amostras que foram avaliadas com a primeira combinação de anticorpos, e o segundo, composto por 28 amostras que foram avaliadas com a segunda combinação de anticorpos.

Nas 72 amostras avaliadas com a primeira combinação de anticorpos, a mediana de número de eventos adquiridos foi de 771.428 células. O número mínimo de eventos adquiridos foi de 27.475 células e o número máximo de eventos adquiridos foi de 7.479.348, esses casos corresponderam a uma amostra de biópsia linfonodo e uma amostra de efusão pericárdica, respectivamente. No estudo de viabilidade, a mediana foi de 76,2%, com valor mínimo de 8,4% e valor máximo de 94%. A amostra que contou com menor viabilidade dentro dessa análise foi também a amostra que tinha menor número de eventos entre as 72 amostras, já a amostra que apresentou maior viabilidade foi uma amostra de aspirado de medula óssea. Para cada uma das categorias de espécimes estudados foi calculada a mediana de eventos adquiridos e a mediana de viabilidade. Também foram registrados a mediana de eventos neoplásicos por amostra, assim como sua porcentagem (Tabela 6).

Tabela 6: Descritivo do número de eventos e viabilidade por tipo de amostra, referente a primeira versão do tubo HD

<i>Amostra</i>	<i>N de amostras</i>	<i>Infiltradas /Total</i>	<i>Mediana de eventos adquiridos (min-máx)</i>	<i>Mediana de Viabilidade Celular (min-máx)</i>	<i>N eventos neoplásicos (min-máx)</i>	<i>% eventos neoplásicos (min-máx)</i>
<i>Linfonodo</i>	36	11/36	610326 (27475-5000000)	76% (8.4%-91.4%)	615 (7-10521)	0,048% (0,009%-1,42%)
<i>Medula óssea</i>	15	0/15	3817650 (47520-6049675)	83,1% (65,6%-94%)	N/A	
<i>Massas</i>	11	3/11	195750 (50000-5000000)	66,5% (10%-84,6%)	177	0,004%
<i>Efusão Pleural</i>	4	0/4	2405714 (60400-3390394)	82,95% (27,4%-90%)	N/A	
<i>Sangue Periférico</i>	2	0/2	2650000 (300000-5000000)	68,2% (52,4%-84%)	N/A	
<i>Efusão Pericárdica</i>	3	0/3	2130428 (700000-7479348)	73,3% (41%-85%)	N/A	
<i>Fluido Ascítico</i>	1	0/1	238725	79,2%	N/A	

Nas 28 amostras avaliadas com a segunda combinação de anticorpos, a mediana de número de eventos adquiridos foi de 631.212 células. O número mínimo de eventos adquiridos foi de 10.475 células e o número máximo de eventos adquiridos foi de 4.181.825, esses casos corresponderam a uma amostra de biópsia de linfonodo e um aspirado de medula óssea, respectivamente. No estudo de viabilidade, a mediana foi de 76%, com valor mínimo de 1,7% e valor máximo de 91%. A amostra que contou com menor viabilidade dentro dessa análise foi uma amostra de LCR, já a amostra que apresentou maior viabilidade correspondeu a amostra de aspirado de medula óssea com maior número de eventos, previamente mencionado. Para cada uma das categorias de espécimes estudados foi calculada a mediana de eventos adquiridos, a mediana de viabilidade. Também foram registrados a mediana de eventos neoplásicos por amostra, assim como sua porcentagem (Tabela 7).

Tabela 7: Descritivo do número de eventos e viabilidade por tipo de amostra, referente a segunda versão do tubo HD

<i>Amostra</i>	N de amostras	Infiltradas /Total	Mediana de eventos adquiridos (min-máx)	Mediana de Viabilidade Celular (min-máx)	N eventos neoplásicos (min-máx)	% eventos neoplásicos (min-máx)
<i>Linfonodo</i>	15	6/15	1217250 (10475-4506000)	76% (11%-91%)	441 (95-2946)	0,014% (0,013%-0,41%)
<i>Medula óssea</i>	4	¼	751450 (342250-3312575)	84,8% (65%-91%)	442	0,013%
<i>Líquor</i>	3	1/3	85125 (73850-112475)	20% (1,7%-62%)	13	0,01%
<i>Sangue Periférico</i>	2	0/2	553575 (402900-704250)	69% (65%-73%)	N/A	N/A
<i>Massa</i>	2	2/2	2563025 (1927050-3199000)	81,8% (81%- 82,6%)	704 (277-1132)	0,01% (0,01%- 0,04%)
<i>Efusão pericárdica</i>	1	1/1	219725	76%	2813	1,8%
<i>Efusão Pleural</i>	1	0/1	256475	77%	N/A	N/A

6.5.2 Análise das amostras de pacientes com LHC

Na nossa amostra, dos 25 casos infiltrados por células H/R-S, 23 foram avaliadas pela histopatologia de forma concomitante a CFM. Os outros 2 casos tiveram avaliação somente por meio da CFM, pois compreendiam duas amostras de fluídos que não foram encaminhadas a citologia. Dentro dos 23 casos avaliados pelo método padrão-ouro, 60% (14/23) das amostras foram classificadas corretamente por CFM. Do total das 16 amostras que obtiveram diagnóstico por CFM, a mediana de eventos foi de 1.000.000 (mín:máx 112.475:4.181.825). A mediana de eventos neoplásicos foi de 437 (mín:máx 7:13.282).

Na avaliação com a primeira combinação de anticorpos observamos que a mediana de eventos em amostras que tiveram diagnóstico correto de LHC por CFM foi de 1.000.000 (mín:máx 238.650:5.000.000). A mediana de viabilidade foi de 78%, variando desde 54% a 87% e mediana de eventos neoplásicos foi de 401.

Em comparação, a mediana de eventos em amostras que não tiveram diagnóstico de LHC por CFM foi de 251.237 (mín:máx 83.538: 771.432). A mediana de viabilidade nessas amostras foi de 44%, variando entre 16% e 76%. Além disso, nessa versão do tubo, 57% (4/7) das amostras infiltradas por LHC que não foram diagnosticadas por CFM apresentam menos de 50% > (47,5%-16,6%) de viabilidade.

Frente ao número de erros diagnósticos obtidos com a primeira combinação de anticorpos, estabelecemos a hipótese que adquirindo um maior número de eventos conseguiríamos aumentar a sensibilidade do teste. Essa teoria foi embasada na raridade de células H/R-S, típicas no LHC. Assim, na segunda versão do tubo HD, o mínimo de 5×10^6 eventos foi adquirido em todas as amostras sempre que possível. A mediana de eventos em amostras que tiveram diagnóstico correto de LHC por CFM no segundo tubo foi de 1.927.050 (mín:máx 112.475: 4.506.000), a mediana de viabilidade foi de 76%, variando desde 59% e 85,2%, a mediana de eventos neoplásicos foi de 432. A mediana de eventos em amostras que não tiveram diagnóstico de LHC por CFM foi de 731 987 (mín:máx 6855:135.425) e a mediana de viabilidade foi 75,9%, variando entre 70,8% e 81%.

Para entender se havia relação entre os dados, foram comparados o número de erros e acertos diagnósticos por CFM nas amostras que apresentavam número de eventos $\geq 1 \times 10^6$ *versus* o número de erros e acertos diagnósticos por CFM nas amostras que tinham número de eventos adquiridos $< 1 \times 10^6$ utilizou-se o Teste Exato de Fisher. Na análise, foi utilizado o número absoluto para cálculo e posteriormente foram inseridas as porcentagens dos casos representados sobre o total de casos avaliados. Foi obtido o p-valor=0,03, o que comprova o número de eventos influencia no poder diagnóstico do teste (Tabela 8).

Tabela 8 : Comparação entre número de eventos adquiridos e o diagnóstico por CFM				
		Eventos		Total
		$< 1 \times 10^6$	$\geq 1 \times 10^6$	
Diagnóstico por CFM	ACERTO	6 (24%)	11 (44%)	17
	ERRO	7 (28%)	1 (0,04%)	8
Total		13	12	25

6.6 ANÁLISE DE CONCORDÂNCIA ENTRE AVALIAÇÃO IHQ VERSUS CFM

As análises de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia foram calculadas por tubo, considerando a histopatologia/imunohistoquímica como o “padrão-ouro”. Na primeira versão do tubo HD a sensibilidade foi de 57%, a especificidade foi de 100%, o valor preditivo positivo foi de 100% e o valor preditivo negativo foi de 90%. Na segunda versão do tubo HD a sensibilidade subiu para 81%, a especificidade manteve-se em 100%, o valor preditivo positivo foi de 100% e o valor preditivo negativo foi de 90%. Concluindo, tivemos que a acurácia total do nosso teste foi de 91%, na primeira combinação de anticorpos e de 93% na segunda combinação de anticorpos (Tabela 9).

Tabela 9: Análises estatísticas referentes as duas versões do tubo HD.

	Tubo HD (versão 1)	Tubo HD (versão 2)
Sensibilidade	57%	81%
Especificidade	100%	100%
Valor Preditivo Positivo	100%	100%
Valor Preditivo Negativo	90%	90%
Acurácia	91%	93%

7 DISCUSSÃO

A definição de um diagnóstico de forma rápida e sensível é essencial para o estabelecimento do regime terapêutico adequado e assim garantir o melhor desfecho possível aos pacientes com câncer (WHITAKER, 2020). Atualmente, o diagnóstico de linfoma de Hodgkin depende da análise morfológica e imunohistoquímica, uma abordagem que pode demandar extensos períodos. Embora a CFM apresente papel central na caracterização, classificação e seguimento de leucemias e linfomas não-Hodgkin desde a virada do século (ALAGGIO et al., 2022; ORFAO et al., 1999), ainda não faz parte da abordagem diagnóstica do LHC. Protocolos para o diagnóstico de LHC por CFM em contexto clínico vêm sendo propostos na literatura, mas ainda são poucos. Atualmente, a base do PubMed conta com 256 artigos que apresentam [*hodgkin, disease*] e [*flow cytometry*] como palavras-chave. Dentro desses, um pouco menos que a metade abordam de fato o estudo do imunofenótipo das células H/R-S, o seu infiltrado imune e novos marcadores para prognóstico da doença.

Frente a esse cenário, existe necessidade de estudos propondo painéis e protocolos padronizados que possam levar a um diagnóstico sensível e específico da doença e, além disso, que possam distinguir quais dos marcadores avaliados são de maior relevância para a identificação das células H/R-S. Neste trabalho foi avaliado não apenas 12 marcadores em duas combinações distintas, bem como o efeito do número de eventos adquiridos e a inclusão de um novo marcador de viabilidade (FVS780) no protocolo para diagnóstico de LHC por citometria de fluxo. Em geral, as duas versões do tubo HD demonstraram alta acurácia diagnóstica, de 91% e 93%, respectivamente, comprovando que os marcadores estudados são bons candidatos para uso em contextos clínicos.

De acordo com o pesquisado na literatura, este trabalho foi o primeiro a retratar o perfil imunofenotípico das células H/R-S provenientes de uma coorte pediátrica brasileira, o primeiro a sugerir a utilização do fator transcricional μ PAX5 para a identificação de células H/R-S por CFM e o identificar infiltração de LHC no sistema nervoso central por meio da CFM. Tal marcador até então era avaliado apenas por imunohistoquímica (O'MALLEY et al., 2019).

No contexto do laboratório clínico e de pesquisa, o objetivo desse projeto surgiu há 11 anos, a partir da necessidade de fornecer diagnóstico diferencial amostras de LHC que chegavam por meio do projeto de diagnóstico de tumores sólidos pediátricos. O primeiro painel

foi desenhado com o objetivo de identificar as células H/R-S por meio dos marcadores, CD15, CD30 e CD123 e populações principais do infiltrado imune (FERREIRA-FACIO et al., 2021).

No primeiro tubo, o CD15 foi expresso em 100% dos casos, sendo que em 50% apresentou intensidade de marcação comparável a neutrófilos. Na literatura, CD15 é presente em cerca de 89% dos casos avaliados por CFM, enquanto por IHQ a expressão de CD15 fica em torno de 70% do total de casos. Curiosamente, a expressão de CD15 por IHQ pode variar entre células H/R-S, tanto em intensidade, distribuição entre células e focalidade, neste trabalho a expressão de CD15 foi uniforme entre as células H/R-S identificadas (FROMM; KUSSICK; WOOD, 2006; O'MALLEY et al., 2019). Como limitação da CFM, não se pode avaliar se a distribuição das células é focal ou difusa, uma vez que a amostra é dissociada.

Neste trabalho, o CD30 foi expresso em todos os casos estudados. Diversos estudos consagram o marcador CD30 como típico de LHC, e os resultados obtidos corroboram com a porcentagem e intensidade de expressão reportada por outros autores tanto por CFM quanto por IHQ (FROMM; KUSSICK; WOOD, 2006; O'MALLEY et al., 2019). Devido a autofluorescência elevada das células de H/R-S, a intensidade média de fluorescência no canal do marcador CD45, sofreu um deslocamento de fluorescência em 75% dos casos avaliados no primeiro tubo. Embora classicamente as células H/R-S não expressem CD45 por IHQ, Fromm e colaboradores (2006) também reportaram tal deslocamento em 73% dos casos avaliados por CFM, com intensidade de expressão variável. Curiosamente, há também variabilidade entre os padrões de expressão entre clones de CD45 empregados na IHQ, no entanto, o maior desafio dessa abordagem é distinguir as células H/R-S de outras células não reativas a CD45 no infiltrado imune, como histiócitos e células dendríticas (O'MALLEY et al., 2019).

Na avaliação dos marcadores linfóides, observou-se que CD3 e CD5 sofreram deslocamento de fluorescência em 87% e 50% dos casos, respectivamente. Na literatura, a expressão de CD3 apresentou deslocamento similar em cerca de 82% estudados por CFM. Esse deslocamento desapareceu em 79% dos casos quando essas amostras foram tratadas com anticorpos bloqueadores da interação linfócito T, o que indica que esse é um efeito secundário da formação de rosetas (FROMM; KUSSICK; WOOD, 2006). Já CD5, embora não tenha tido porcentagem de seu deslocamento de fluorescência estabelecido por CFM, também teve deslocamento anulado quando as amostras foram tratadas com anticorpos bloqueadores. Esse resultado está de acordo com a descrição imunohistoquímica da ausência de expressão de CD3 e CD5 nas células H/R-S (O'MALLEY et al., 2019). É possível teorizar que o deslocamento de fluorescência observado neste trabalho também foi pela formação de rosetas. No entanto, não

possuímos anticorpos bloqueadores para fazer pré-tratamento das amostras e comprovar nossa hipótese.

Em relação ao CD20, foi observado que metade dos casos analisados expressam esse marcador. Outros autores detectaram tal expressão em cerca de um terço dos casos, tanto por citometria quanto por imunohistoquímica. Interessantemente, a marcação de CD20 por IHQ geralmente é considerada fraca em células H/R-S. Nos casos deste trabalho, a intensidade de expressão de CD20 foi comparável à de linfócitos B maduros em parte das células de H/R-S de alguns casos. Na IHQ, a parcela dos casos de LHC expressam CD20 de forma forte e uniforme são raros, representando cerca de 1%-5% dos casos (FROMM; KUSSICK; WOOD, 2006; O'MALLEY et al., 2019).

No presente estudo, o CD123 foi expresso em um quarto das amostras estudadas. Na literatura, CD123 é descrito em cerca de 59% dos casos de LHC avaliados por CFM e em 90% dos casos avaliados por IHQ. Embora tenha padrão de marcação variável por IHQ, na nossa coorte a intensidade de marcação foi comparável à de células dendríticas/basófilos presentes nas amostras (ALDINUCCI et al., 2002; FROMM, 2011b). Por fim, o marcador HLA-DR foi presente em todas as amostras em que foi avaliado e apresentou intensidade de marcação superior aos níveis expressos em linfócitos B, T e monócitos. Na literatura, esse marcador foi expresso em 88% das amostras avaliadas por CFM, porém apresentou intensidade de expressão similar nas células neoplásicas e células B não neoplásicas e células T ativadas, estabelecendo contraposição ao padrão de expressão por nós encontrado (FROMM; KUSSICK; WOOD, 2006).

Neste estudo, a avaliação da expressão do marcador CD56 nas amostras estudadas tinha como objetivo, em conjunto ao CD45, descartar a presença de células de tumores sólidos da infância das amostras estudadas (FERREIRA-FACIO et al., 2021; FERREIRA-FACIO et al., 2013).

Após avaliação de 72 amostras com suspeita de linfoma, por um período de 10 anos, algumas dificuldades intrínsecas ao teste se tornaram claras. A primeira delas foi a baixa sensibilidade alcançada, de apenas 57%. Duas teorias foram traçadas buscando superar esse desafio, a primeira apontava a necessidade da inclusão de marcadores mais sensíveis a identificação de células H/R-S na combinação de anticorpos. No primeiro tubo, fora o marcador CD30, só existiam os marcadores CD15 e CD123 capazes de identificar as células neoplásicas,

e que poderiam ser ausentes em cerca de 30% a 40% dos casos. Outra teoria explorada para aumentar a sensibilidade foi o aumento do número ideal de eventos adquiridos, que será abordada posteriormente.

Além desses desafios havia necessidade em aumentar a confiabilidade da detecção de células neoplásicas nas amostras. As células H/R-S são reconhecidas pelo seu tamanho maior que uma célula hematopoiética comum. Essa característica, associada a formação de rosetas, típica de CHL, leva ao deslocamento dessas células à área de *doublets* no *dot plot*, e no nosso caso, culminava também na interseção dessa população com os eosinófilos. A autofluorescência dos eosinófilos, somado ao seu tamanho, levava a confundimento entre os limites das duas populações nos gráficos, tornando o diagnóstico difícil com a quantidade limitada de marcadores.

O tubo foi redesenhado visando superar cada um dos desafios encontrados: a) uma nova combinação de anticorpos foi estabelecida com base em pesquisa e literatura e colaboração com patologistas b) marcador de viabilidade FVS780 foi inserido a combinação de anticorpos c) o número ideal de eventos a serem adquiridos foi aumentado.

Na segunda versão do tubo, alguns marcadores foram mantidos, sendo eles o CD15, CD30, CD45 e CD56. Sua expressão foi a mesma reportada na versão anterior, tanto em porcentagem de casos avaliados como positivos, quanto em intensidade de marcação. A exceção é do marcador CD45, que no segundo tubo apresentou deslocamento de fluorescência positivo em todos os casos.

Dentre os marcadores novos, a expressão de CD40 foi presente em todos os casos avaliados. Quando comparado a outros estudos por CFM, a expressão de CD40 é considerada como uma característica essencial para identificação das células H/R-S, junto a expressão de CD30 (FROMM; KUSSICK; WOOD, 2006; FROMM; THOMAS; WOOD, 2009). Quando avaliado o perfil descrito por IHQ, a expressão de CD40 é observada em 94% dos casos de LHC. Seu padrão de expressão tanto por CFM quanto por IHQ é de maior intensidade quando comparado com outras células do infiltrado imune, a mesma observada nos nossos casos (KIM et al., 2003).

A expressão de CD95 também foi presente em todos os nossos casos avaliados, o que corrobora a expressão encontrada em outros estudos de CFM. Na IHQ, a expressão de CD95 ocorre em 90% dos casos. Assim como CD40, apresenta expressão mais intensa nas células

H/R-S do que outras células do infiltrado imune (FROMM; KUSSICK; WOOD, 2006; KIM et al., 2003).

Na avaliação de PAX5, foi observado a sua expressão em todos os casos avaliados. Ainda não há outros relatos de avaliação deste fator transcricional por CFM, mas quando comparada a IHQ, foi observado que PAX5 é expresso em cerca de 80-98% dos casos de LHC. Interessantemente, a expressão de nuPAX5, embora presente em porcentagem concordante a literatura, teve marcação mais intensa em células H/R-S em comparação aos linfócitos B. Na IHQ, esse padrão é inverso, com expressão de PAX5 maior nos linfócitos B (O'MALLEY et al., 2019). Teorizamos que a marcação pode ter sido mais intensa nas células H/R-S devido a reunião dos sinais gerados pelos grânulos nucleares que expressam PAX5 fracamente e costumam ser visualizados individualmente pela imunohistoquímica.

Com a avaliação dos novos marcadores incluídos, foi alcançada a melhora em sensibilidade. Resultado do sucesso em compor um painel que apresenta combinações de anticorpos expressas em mais de 90% dos casos de LHC, o que evita as perdas ocasionais associadas a variabilidade da expressão de outros marcadores (CD15 e CD123) e que são intrínsecas a neoplasia. A nova combinação também permitiu a melhor distinção entre a população neoplásica e a de eosinófilos.

De forma concomitante a identificação de células H/R-S por CFM, as principais populações do infiltrado imune foram identificadas para todas as amostras. Com a classificação das populações distintas foi possível análise dos marcadores que tinham maior peso na separação entre elas por meio da análise Canônica. A combinação final incluiu sete marcadores: CD30, CD45, CD15, CD20, CD40, CD95 e nuPAX5. Essa combinação está de acordo com o perfil imunofenotípico esperado de células H/R-S, garantindo assim sua identificação. As únicas exceções são os marcadores CD45 e CD20.

Nosso grupo não é o primeiro a utilizar análises estatísticas para propor uma série de marcadores mais relevantes para a classificação de LHC no contexto da CFM. Em 2015, Fromm e colaboradores estabeleceram que os principais parâmetros para discriminação das células H/R-S estavam associados a populações com expressão para CD5, associada a expressão intermediária a alta de CD15 e CD71 e expressão baixa de CD30, CD40 e CD64. Interessantemente, os autores assumem que esses padrões não selecionam as células H/R-S, um

fator que poderia tornar a empregabilidade desses parâmetros no contexto clínico um desafio (NG et al., 2015).

Outro estudo foi o publicado por Simonson e colaboradores em 2021 por meio do qual foram obtidas as combinações que tiveram maior relevância para a classificação das células H/R-S: CD40/CD15, CD20/CD71, SSC-H/CD20, CD5/CD15 e SSC-A/CD20 (SIMONSON et al., 2021). Dentre as combinações encontradas, os marcadores CD40, CD15 e CD20 também foram considerados de maior relevância no nosso trabalho. Interessantemente, houve a exclusão do marcador CD30 das combinações, o que vai de encontro às estratégias de análises manuais empregadas por especialistas. Tais abordagens, usualmente compreendem a seleção de células a partir do perfil imunofenotípico positivo para CD30, CD40 associada a expressão variável de CD15 (GREWAL et al., 2019).

Além da definição de marcadores mais relevantes, foi realizada a estimativa do número ideal de células que deveriam ser adquiridas para diagnóstico. O estabelecimento dessa necessidade surgiu a partir do reconhecimento que um dos desafios no diagnóstico de LHC está na raridade de células neoplásicas. Na literatura, é estabelecido que as células H/R-S compõe cerca de 1% da amostra total, mas frequentemente podem compor menos de 0,01% das células, o que está de acordo com a mediana de células neoplásicas que obtivemos no primeiro tubo, de 0,03% (ALAGGIO et al., 2022; FROMM; WOOD, 2014).

O número ideal de eventos a serem adquiridos por tubo foi aumentado e junto a essa orientação foi adicionado um marcador de viabilidade. Com a análise de resultados foi comprovado que nas amostras em que foram adquiridos um número superior ou igual a 1 milhão de células houve maior probabilidade de estabelecimento de diagnóstico de CHL. Esse número foi estabelecido com base na recomendação do número mínimo de eventos a serem adquiridos, preconizados nas últimas publicações (NG et al., 2015; SIMONSON et al., 2021). É interessante destacar que o aumento de número de eventos junto ao emprego de um marcador de viabilidade não alterou a mediana de células neoplásicas identificadas no segundo tubo.

Ainda assim, a quantidade mínima de células necessárias para o diagnóstico de LHC é uma discussão em aberto. Em estudo retrospectivo, Chan et al., comprovaram a possibilidade de diagnosticar LHC por meio de amostras obtidas por biópsia de agulha fina e pequenas biópsias que apresentavam 100 000 células ou menos (CHAN et al., 2022). Além desse caso, Fromm já demonstrou ser possível diagnosticar LHC em amostra com cerca de 50.000 eventos

totais, embora usualmente recomende a aquisição de 500.000 eventos sempre que possível (FROMM; THOMAS; WOOD, 2009; GLYNN et al., 2019).

Ressaltamos que embora tenha sido incluído um marcador de viabilidade, as proporções de células viáveis foram muito similares as obtidas na primeira combinação de anticorpos. Além disso, quando avaliadas os diferentes espécimes estudados, as medianas de viabilidade também são muito próximas entre si, embora apresentem distinções entre número de eventos totais. A semelhança entre medianas se repete na comparação das células neoplásicas avaliadas em cada uma das versões do tubo e reflete a consistência do nosso trabalho por meio dos anos. O marcador de viabilidade destaca-se por conferir mais credibilidade ao trabalho. Como as células H/R-S caem na zona de *debris* e *doublets* é importante descartar que as células identificadas como neoplásicas poderiam ser fruto da marcação inespecífica de células em processo de morte celular.

Um desfecho adicional deste estudo foi a possibilidade de investigar as células neoplásicas em diversas amostras. O LHC é caracterizado por ter sítio primário em linfonodos e/ou massas, e por isso, esses espécimes compõe a maioria dos tecidos avaliados ao diagnóstico. Infiltração em outros sítios por células H/R-S não são comuns. Entre as nossas amostras, foi possível avaliar a presença de infiltração em amostras de LCR, medula óssea, efusão pericárdica e biópsia de SNC, sendo esta última raríssima (GHARBARAN et al., 2014). Dentre estas, a presença de infiltração foi confirmada por IHQ na amostra de medula e SNC, pertencentes a mesma paciente. Esses resultados confirmam a sensibilidade do teste desenvolvido e nos permite sugerir sua utilidade em situações emergenciais.

Após quase duas décadas do estabelecimento da possibilidade do diagnóstico de LHC por CFM os estudos permanecem limitados. Este trabalho se posiciona como destaque como um dos poucos grupos a corroborar com a capacidade de identificação de células H/R-S por CFM. Além disso, o presente estudo reflete os esforços do laboratório de citometria do IPPMG, dentro da colaboração com o consórcio internacional de citometria de fluxo EuroFlow para o desenvolvimento de novas metodologias voltadas ao diagnóstico de câncer por meio da CFM.

Este estudo foi desenvolvido concomitantemente ao projeto independente do Centro Hospitalar do Porto para diagnóstico de LHC por CFM. Após análise conjunta dos nossos resultados, foi possível propor uma combinação de anticorpos, em 12 canais, para diagnóstico diferencial de linfomas. Tal projeto, intitulado LIMA, foi aprovado e agora segue para registro

oficial dentro do consórcio e teste em outros centros vinculados ao EuroFlow. Finalmente, esse estudo comprova o sucesso das cooperações internacionais e reitera a relevância da ciência brasileira no estabelecimento de novos métodos diagnósticos que sejam capazes de oferecer respostas a questões internacionais.

8 CONCLUSÃO

O presente estudo conseguiu alcançar todos os objetivos que foram nele propostos. Dentre os marcadores estudados, CD30, CD45, CD15, CD20, CD40, CD95 e μ PAX5 apresentaram maior relevância para o diagnóstico de LHC. Estimamos que o número mínimo de eventos adquiridos por CFM deve ser de 1×10^6 , além disso alcançamos maior confiabilidade no nosso teste por meio da inclusão do FVS780. Com esses desfechos conseguimos melhorar a sensibilidade do teste de 57% para 81% enquanto a especificidade se manteve em 100%, demonstrando a utilidade da CFM no diagnóstico de LHC.

BIBLIOGRAFIA

- ACHI, H. E. et al. CD123 as a Biomarker in Hematolymphoid Malignancies: Principles of Detection and Targeted Therapies. 2020.
- ADAN, A. et al. Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 163–176, 17 fev. 2017.
- AGGARWAL, P.; LIMAIEM, F. **Reed Sternberg Cells**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2022.
- ALAGGIO, R. et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. **Leukemia**, v. 36, n. 7, p. 1720–1748, jul. 2022.
- ALDINUCCI, D. et al. Expression of Functional Interleukin-3 Receptors on Hodgkin and Reed-Sternberg Cells. **The American Journal of Pathology**, v. 160, n. 2, p. 585–596, fev. 2002.
- ALLEN, C. D. C.; OKADA, T.; CYSTER, J. G. Germinal-center organization and cellular dynamics. **Immunity**, v. 27, n. 2, p. 190–202, ago. 2007.
- ANSELL, S. M. Hodgkin lymphoma: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **American Journal of Hematology**, v. 97, n. 11, p. 1478–1488, 2022.
- BIASOLI, I. et al. Lower socioeconomic status is independently associated with shorter survival in Hodgkin Lymphoma patients—An analysis from the Brazilian Hodgkin Lymphoma Registry. **International Journal of Cancer**, v. 142, n. 5, p. 883–890, 2018a.
- BIASOLI, I. et al. Treatment outcomes for Hodgkin lymphoma: First report from the Brazilian Prospective Registry. **Hematological Oncology**, v. 36, n. 1, p. 189–195, fev. 2018b.
- BONADONNA, G. et al. Combination chemotherapy of Hodgkin's disease with adriamycin, bleomycin, vinblastine, and imidazole carboxamide versus MOPP. **Cancer**, v. 36, n. 1, p. 252–259, jul. 1975.
- BORCHMANN, P.; EICHENAUER, D. A.; ENGERT, A. State of the art in the treatment of Hodgkin lymphoma. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 9, n. 8, p. 450–459, ago. 2012.
- BOSCH, X. et al. Evaluation of unexplained peripheral lymphadenopathy and suspected malignancy using a distinct quick diagnostic delivery model: prospective study of 372 patients. **Medicine**, v. 93, n. 16, p. e95, out. 2014.
- BRACK, C. et al. A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. **Cell**, v. 15, n. 1, p. 1–14, 1 set. 1978.
- BROOKS, E. G. et al. Impact of time from diagnosis to initiation of curative-intent chemotherapy on clinical outcomes in patients with classical Hodgkin lymphoma. **Leukemia & Lymphoma**, v. 57, n. 4, p. 872–879, 2 abr. 2016.
- BROWN, L. Improving histopathology turnaround time: a process management approach. **Current Diagnostic Pathology**, v. 10, n. 6, p. 444–452, 1 dez. 2004.

BUHTOJAROV, I. N. Pediatric Lymphoma. **Pediatrics in Review**, v. 38, n. 9, p. 410–423, set. 2017.

CAMPANA, D.; COUSTAN-SMITH, E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. **Cytometry**, v. 38, n. 4, p. 139–152, 15 ago. 1999.

CAMPO, E. et al. The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee. **Blood**, v. 140, n. 11, p. 1229–1253, 15 set. 2022.

CAMPOS, A. H. J. F. M. et al. Frequency of EBV associated classical Hodgkin lymphoma decreases over a 54-year period in a Brazilian population. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1849, 30 jan. 2018.

CANELLOS, G. P. et al. Chemotherapy of advanced Hodgkin's disease with MOPP, ABVD, or MOPP alternating with ABVD. **The New England Journal of Medicine**, v. 327, n. 21, p. 1478–1484, 19 nov. 1992.

CHABAY, P. et al. Lymphotropic Viruses EBV, KSHV and HTLV in Latin America: Epidemiology and Associated Malignancies. A Literature-Based Study by the RIAL-CYTED. **Cancers**, v. 12, n. 8, p. 2166, 4 ago. 2020.

CHAN, A. et al. Role of Flow Cytometric Immunophenotyping for Classic Hodgkin Lymphoma in Small Biopsy and Cytology Specimens. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 146, n. 4, p. 462–468, 1 abr. 2022.

CLARK, E. A. A Short History of the B-Cell-Associated Surface Molecule CD40. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 2014.

CONNORS, J. M. et al. Hodgkin lymphoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 1, p. 61, 23 jul. 2020.

COSTA, E. S. et al. Automated pattern-guided principal component analysis vs expert-based immunophenotypic classification of B-cell chronic lymphoproliferative disorders: a step forward in the standardization of clinical immunophenotyping. **Leukemia**, v. 24, n. 11, p. 1927–1933, nov. 2010.

CRAIG, F. E.; FOON, K. A. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. **Blood**, v. 111, n. 8, p. 3941–3967, 15 abr. 2008.

CS, F.-F. et al. Flow Cytometry Immunophenotyping for Diagnostic Orientation and Classification of Pediatric Cancer Based on the EuroFlow Solid Tumor Orientation Tube (STOT). **Cancers**, v. 13, n. 19, 30 set. 2021.

DE MULDER, P. H. et al. Increased antibody-dependent cytotoxicity mediated by purified monocytes in Hodgkin's disease. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 26, n. 3, p. 406–414, mar. 1983.

DENG, C.; PAN, B.; O'CONNOR, O. A. Brentuximab Vedotin. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 1, p. 22–27, 2 jan. 2013.

DEVITA, V. T.; SERPICK, A. A.; CARBONE, P. P. Combination chemotherapy in the treatment of advanced Hodgkin's disease. **Annals of Internal Medicine**, v. 73, n. 6, p. 881–895, dez. 1970.

DIEHL, V. et al. BEACOPP: a new regimen for advanced Hodgkin's disease. German Hodgkin's Lymphoma Study Group. **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 9 Suppl 5, p. S67-71, 1998.

DINAND, V. et al. Proliferative index and CD15 expression in pediatric classical Hodgkin lymphoma. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 50, n. 2, p. 280–283, fev. 2008.

DÖRING, C. et al. A novel immunohistochemical classifier to distinguish Hodgkin lymphoma from ALK anaplastic large cell lymphoma. **Modern Pathology**, v. 27, n. 10, p. 1345–1354, out. 2014.

DREXLER, H. G.; MINOWADA, J. Hodgkin's disease derived cell lines: a review. **Human Cell**, v. 5, n. 1, p. 42–53, mar. 1992.

DUARTE, N. L. et al. Prognostic Factors in Children and Adolescents with Lymphomas and Vertical Transmission of HIV in Rio de Janeiro, Brazil: A Multicentric Hospital-Based Survival Analysis Study. **Cancers**, v. 15, n. 8, p. 2292, 14 abr. 2023.

E, S.-F. et al. **International Incidence of Childhood Cancer, 2001-10: A Population-Based Registry Study**. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28410997/>>. Acesso em: 27 maio. 2020.

ELGUETA, R. et al. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. **Immunological reviews**, v. 229, n. 1, p. 10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x, maio 2009.

ERBER, W. N. (ED.). **Diagnostic Techniques in Hematological Malignancies**. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO/INSTITUTO DO CÂNCER DO ESTADO DE SÃO PAULO, HOSPITAL DAS CLÍNICAS, SÃO PAULO – SP, BRAZIL et al. Hodgkin's lymphoma unmet medical needs in Brazil: experts' perspective. **Jornal Brasileiro de Economia da Saúde**, v. 10, n. 2, p. 118–125, ago. 2018.

FERREIRA, J. M. DE O. et al. Lymphoma subtype incidence rates in children and adolescents: First report from Brazil. **Cancer Epidemiology**, v. 36, n. 4, p. e221–e226, ago. 2012.

FERREIRA-FACIO, C. S. et al. Contribution of Multiparameter Flow Cytometry Immunophenotyping to the Diagnostic Screening and Classification of Pediatric Cancer. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e55534, 5 mar. 2013.

FERRY, J. A. Burkitt's Lymphoma: Clinicopathologic Features and Differential Diagnosis. **The Oncologist**, v. 11, n. 4, p. 375–383, 1 abr. 2006.

FLORES, M. B. Á. et al. A new approach to the study of Hodgkin lymphoma by flow cytometry. **Pathology**, v. 55, n. 1, p. 86–93, 1 fev. 2023.

FROMM, J. R. Flow cytometric analysis of CD123 is useful for immunophenotyping classical Hodgkin lymphoma. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 80B, n. 2, p. 91–99, 2011a.

FROMM, J. R. Flow cytometric analysis of CD123 is useful for immunophenotyping classical Hodgkin lymphoma. **Cytometry. Part B, Clinical Cytometry**, v. 80, n. 2, p. 91–99, mar. 2011b.

FROMM, J. R.; KUSSICK, S. J.; WOOD, B. L. Identification and purification of classical Hodgkin cells from lymph nodes by flow cytometry and flow cytometric cell sorting. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 126, n. 5, p. 764–780, nov. 2006.

FROMM, J. R.; THOMAS, A.; WOOD, B. L. Flow cytometry can diagnose classical Hodgkin lymphoma in lymph nodes with high sensitivity and specificity. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 131, n. 3, p. 322–332, mar. 2009.

FROMM, J. R.; WOOD, B. L. Strategies for immunophenotyping and purifying classical Hodgkin lymphoma cells from lymph nodes by flow cytometry and flow cytometric cell sorting. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 57, n. 3, p. 368–375, jul. 2012.

FROMM, J. R.; WOOD, B. L. A six-color flow cytometry assay for immunophenotyping classical Hodgkin lymphoma in lymph nodes. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 141, n. 3, p. 388–396, mar. 2014.

GARSIDE, P. et al. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. **Science (New York, N.Y.)**, v. 281, n. 5373, p. 96–99, 3 jul. 1998.

GELLERT, M. V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, p. 101–132, 2002.

GEORGOULIS, V. et al. Unraveling the Immune Microenvironment in Classic Hodgkin Lymphoma: Prognostic and Therapeutic Implications. **Biology**, v. 12, n. 6, p. 862, 15 jun. 2023.

GHARBARAN, R. et al. Circulating tumor cells in Hodgkin's lymphoma - a review of the spread of HL tumor cells or their putative precursors by lymphatic and hematogenous means, and their prognostic significance. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 89, n. 3, p. 404–417, mar. 2014.

GLYNN, E. et al. Flow Cytometry for Non-Hodgkin and Hodgkin Lymphomas. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1956, p. 35–60, 2019.

GRAHAM, B. S.; LYNCH, D. T. Burkitt Lymphoma. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

GRANT, C. et al. Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma, Classic Hodgkin Lymphoma Presenting in the Mediastinum, and Mediastinal Gray Zone Lymphoma: What is the Oncologist To Do? **Current hematologic malignancy reports**, v. 6, n. 3, p. 157–163, set. 2011.

- GREWAL, R.-K. et al. Use of flow cytometry in the phenotypic diagnosis of hodgkin's lymphoma. **Cytometry. Part B, Clinical Cytometry**, v. 96, n. 2, p. 116–127, mar. 2019.
- GRU, A. A.; LU, D. Concurrent malignant melanoma and cutaneous involvement by classical hodgkin lymphoma (CHL) in a 63 year-old man. **Diagnostic Pathology**, v. 8, p. 135, 9 ago. 2013.
- GRUSS, H. J. et al. Expression and function of CD40 on Hodgkin and Reed-Sternberg cells and the possible relevance for Hodgkin's disease. **Blood**, v. 84, n. 7, p. 2305–2314, 1 out. 1994.
- HALUSKA, F. G.; CANELLOS, G. P. The Cellular Biology of the Reed-Sternberg Cell. [s.d.].
- HANNA, T. P. et al. Mortality due to cancer treatment delay: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, v. 371, p. m4087, 4 nov. 2020.
- HARDY, R. R.; HAYAKAWA, K. B C ELL D EVELOPMENT P ATHWAYS. **Annual Review of Immunology**, v. 19, n. 1, p. 595–621, abr. 2001.
- HARRIS, N. L. et al. Lymphoma classification – from controversy to consensus: The R.E.A.L. and WHO Classification of lymphoid neoplasms. **Annals of Oncology**, Proceedings of the VIIth International Conference on Malignant Lymphoma 2–5 June 1999 – Lugano, Switzerland. v. 11, p. S3–S10, 1 jan. 2000.
- HEEL, K. et al. Developments in the immunophenotypic analysis of haematological malignancies. **Blood Reviews**, v. 27, n. 4, p. 193–207, 1 jul. 2013.
- HJALGRIM, H.; JARRETT, R. F. Epidemiology of Hodgkin Lymphoma. Em: ENGERT, A.; YOUNES, A. (Eds.). **Hodgkin Lymphoma: A Comprehensive Overview**. Hematologic Malignancies. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 3–23.
- HODGKIN, D. Absorbent Glands and Spleen. **The Boston Medical and Surgical Journal**, v. 6, n. 7, p. 101–104, 28 mar. 1832.
- HOFFBRAND, A. V. **Fundamentos Em Hematologia 6Ed.***. 6ª edição ed. [s.l.] Artmed, 2012.
- HUANG, J. et al. Incidence, mortality, risk factors, and trends for Hodgkin lymphoma: a global data analysis. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 15, n. 1, p. 57, 11 maio 2022.
- JAFFE, E. S. et al. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. **Blood**, v. 112, n. 12, p. 4384–4399, 1 dez. 2008.
- JAFFE, E. S.; COOK, J. R. Core biopsy for lymphoma diagnosis? A needling prospect. **Blood**, v. 140, n. 24, p. 2525–2527, 15 dez. 2022.
- JAMIL, A.; MUKKAMALLA, S. K. R. Lymphoma. Em: **StatPearls [Internet]**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2023.
- KALINA, T. et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. **Leukemia**, v. 26, n. 9, p. 1986–2010, set. 2012.

KANZLER, H. et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 4, p. 1495–1505, 1 out. 1996.

KASEB, H.; BABIKER, H. M. Hodgkin Lymphoma. Em: **StatPearls [Internet]**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2022.

KIM, L.-H. et al. The role of CD30, CD40 and CD95 in the regulation of proliferation and apoptosis in classical Hodgkin's lymphoma. **Pathology**, v. 35, n. 5, p. 428–435, out. 2003.

KÜPPERS, R. et al. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 23, p. 10962–10966, 8 nov. 1994.

KÜPPERS, R.; ENGERT, A.; HANSMANN, M.-L. Hodgkin lymphoma. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 10, p. 3439–3447, out. 2012.

LAKHTAKIA, R.; BURNEY, I. A Historical Tale of Two Lymphomas. **Sultan Qaboos University Medical Journal**, v. 15, n. 2, p. e202–e206, maio 2015.

LAMB, M. J. et al. Hodgkin lymphoma detection and survival: findings from the Haematological Malignancy Research Network. **BJGP Open**, v. 3, n. 4, p. bjgpopen19X101668, [s.d.].

LEBIEN, T. W.; TEDDER, T. F. B lymphocytes: how they develop and function. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1570–1580, 1 set. 2008.

LINSKENS, E. et al. Improved Standardization of Flow Cytometry Diagnostic Screening of Primary Immunodeficiency by Software-Based Automated Gating. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 584646, 2 nov. 2020.

LIU, H.; AUDINO, A. N. Metastatic nasopharyngeal carcinoma mimicking nodular sclerosis Hodgkin lymphoma. **Blood**, v. 136, n. 22, p. 2596, 26 nov. 2020.

LUO, R. F. et al. CD81 Protein is Expressed at High Levels in Normal Germinal Center B cells and in Subtypes of Human Lymphomas. **Human pathology**, v. 41, n. 2, p. 271, fev. 2010.

MAGAKI, S. et al. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1897, p. 289–298, 2019.

MANCINI, N. **Estatísticas de linfoma no Brasil mostram cenário preocupante**. **Revista Online ABRALE**, 6 abr. 2022. Disponível em: <<https://revista.abrale.org.br/estatisticas-de-linfoma-no-brasil-mostram-cenario-preocupante/>>. Acesso em: 11 jan. 2023

MANI, H.; JAFFE, E. S. HODGKIN LYMPHOMA: AN UPDATE ON ITS BIOLOGY WITH NEWER INSIGHTS INTO CLASSIFICATION. **Clinical lymphoma & myeloma**, v. 9, n. 3, p. 206–216, jun. 2009.

MARAFIOTI, T. et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. **Blood**, v. 95, n. 4, p. 1443–1450, 15 fev. 2000.

MCKINNON, K. M. Flow Cytometry: An Overview. **Current Protocols in Immunology**, v. 120, n. 1, jan. 2018.

MELCHERS, F. The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 7, p. 578–584, jul. 2005.

MOLYNEUX, E. M. et al. Burkitt's lymphoma. **The Lancet**, v. 379, n. 9822, p. 1234–1244, 31 mar. 2012.

MOMOTOW, J. et al. Hodgkin Lymphoma—Review on Pathogenesis, Diagnosis, Current and Future Treatment Approaches for Adult Patients. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 5, p. 1125, 8 mar. 2021.

MONTGOMERY, E. A. et al. Inflammatory myxohyaline tumor of distal extremities with virocyte or Reed-Sternberg-like cells: a distinctive lesion with features simulating inflammatory conditions, Hodgkin's disease, and various sarcomas. **Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 11, n. 4, p. 384–391, abr. 1998.

MURAMATSU, M. et al. Class Switch Recombination and Hypermutation Require Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID), a Potential RNA Editing Enzyme. **Cell**, v. 102, n. 5, p. 553–563, 1 set. 2000.

MÜSCHEN, M. et al. Somatic mutations of the CD95 gene in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. **Cancer Research**, v. 60, n. 20, p. 5640–5643, 15 out. 2000.

NAVARRO, J.-T. et al. Hodgkin Lymphoma in People Living with HIV. **Cancers**, v. 13, n. 17, p. 4366, 29 ago. 2021.

NG, D. P. et al. Computer-aided detection of rare tumor populations in flow cytometry: an example with classic Hodgkin lymphoma. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 144, n. 3, p. 517–524, set. 2015.

NGUYEN, P. L. et al. Expression of CD95 antigen and Bcl-2 protein in non-Hodgkin's lymphomas and Hodgkin's disease. **The American Journal of Pathology**, v. 148, n. 3, p. 847–853, mar. 1996.

NUTT, S. L.; KEE, B. L. The Transcriptional Regulation of B Cell Lineage Commitment. **Immunity**, v. 26, n. 6, p. 715–725, 22 jun. 2007.

O'GRADY, J. T. et al. CD40 expression in Hodgkin's disease. **The American Journal of Pathology**, v. 144, n. 1, p. 21–26, jan. 1994.

O'MALLEY, D. P. et al. American Registry of Pathology Expert Opinions: Immunohistochemical evaluation of classic Hodgkin lymphoma. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 39, p. 105–110, 1 abr. 2019.

- ORFAO, A. et al. Acute lymphoblastic leukemia (ALL): detection of minimal residual disease (MRD) at flow cytometry. **Leukemia & Lymphoma**, v. 13 Suppl 1, p. 87–90, 1994.
- ORFAO, A. et al. Clinically Useful Information Provided by the Flow Cytometric Immunophenotyping of Hematological Malignancies: Current Status and Future Directions. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 10, p. 1708–1717, 1 out. 1999.
- PARENTE, P. et al. Hodgkin Reed–Sternberg-Like Cells in Non-Hodgkin Lymphoma. **Diagnostics**, v. 10, n. 12, p. 1019, 27 nov. 2020.
- PEDREIRA, C. E. et al. From big flow cytometry datasets to smart diagnostic strategies: The EuroFlow approach. **Journal of Immunological Methods**, v. 475, p. 112631, dez. 2019.
- PELTIER, C.; VISALLI, M.; SCHLICH, P. Comparison of Canonical Variate Analysis and Principal Component Analysis on 422 descriptive sensory studies. **Food Quality and Preference**, v. 40, p. 326–333, 1 mar. 2015.
- PEREZ-ANDRES, M. et al. Human peripheral blood B-cell compartments: A crossroad in B-cell traffic. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 78B, n. S1, p. S47–S60, 2010.
- PICOT, J. et al. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. **Cytotechnology**, v. 64, n. 2, p. 109–130, mar. 2012.
- PIERCE, J. M. R.; MEHTA, A. Diagnostic, prognostic and therapeutic role of CD30 in lymphoma. **Expert Review of Hematology**, v. 10, n. 1, p. 29–37, jan. 2017.
- PILERI, S. A. et al. Hodgkin’s lymphoma: the pathologist’s viewpoint. **Journal of Clinical Pathology**, v. 55, n. 3, p. 162–176, 1 mar. 2002.
- POPPEMA, S. et al. In Situ Immunologic Characterization of Cellular Constituents in Lymph Nodes and Splens Involved by Hodgkin’s Disease. **Blood**, v. 59, n. 2, p. 226–232, 1 fev. 1982.
- RAMOS-VARA, J. A. Principles and Methods of Immunohistochemistry. Em: GAUTIER, J.-C. (Ed.). **Drug Safety Evaluation: Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. p. 83–96.
- RAVOET, C. et al. Contribution of Flow Cytometry to the Diagnosis of Malignant and Non Malignant Conditions in Lymph Node Biopsies. **Leukemia & Lymphoma**, v. 45, n. 8, p. 1587–1593, ago. 2004.
- ROBINSON, J. P.; ROEDERER, M. Flow cytometry strikes gold. **Science**, v. 350, n. 6262, p. 739–740, 13 nov. 2015.
- SANTOS, M. DE O. et al. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, p. e-213700, 6 fev. 2023.
- SARKOZY, C. et al. Gray-zone Lymphoma Between cHL and Large B-Cell Lymphoma: A Histopathologic Series From the LYSA. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 43, n. 3, p. 341, mar. 2019.

SEITZ, V. et al. Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease. **Blood**, v. 95, n. 10, p. 3020–3024, 15 maio 2000.

SHANBHAG, S.; AMBINDER, R. Hodgkin Lymphoma: a review and update on recent progress. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 2, p. 116–132, mar. 2018.

SHARMA, S. et al. Nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma grade 2: A diagnostic challenge to the cytopathologists. **Cancer Cytopathology**, v. 125, n. 2, p. 104–113, 2017.

SIMONSON, P. D. et al. De Novo Identification and Visualization of Important Cell Populations for Classic Hodgkin Lymphoma Using Flow Cytometry and Machine Learning. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 156, n. 6, p. 1092–1102, 27 jun. 2021.

SMITH, C. A. et al. CD30 antigen, a marker for Hodgkin's lymphoma, is a receptor whose ligand defines an emerging family of cytokines with homology to TNF. **Cell**, v. 73, n. 7, p. 1349–1360, 2 jul. 1993.

SOMMER, U. et al. High-sensitivity flow cytometric assays: Considerations for design control and analytical validation for identification of Rare events. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 100, n. 1, p. 42–51, 2021.

SOUZA, V. S. DE et al. O itinerário terapêutico dos pacientes portadores de linfoma. **HU Revista**, v. 45, n. 2, p. 134–139, 7 nov. 2019.

STETLER-STEVENSON, M. Flow cytometry in lymphoma diagnosis and prognosis: useful? **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 16, n. 4, p. 583–597, 1 dez. 2003.

STONE, M. J. Samuel Wilks: the “grand old man” of British medicine. **Proceedings (Baylor University. Medical Center)**, v. 23, n. 3, p. 263–265, jul. 2010.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

SUSANIBAR-ADANIYA, S.; BARTA, S. K. 2021 Update on Diffuse large B cell lymphoma: A review of current data and potential applications on risk stratification and management. **American journal of hematology**, v. 96, n. 5, p. 617–629, 1 maio 2021.

SYRYKH, C. et al. Lymph node excisions provide more precise lymphoma diagnoses than core biopsies: a French Lymphopath network survey. **Blood**, v. 140, n. 24, p. 2573–2583, 15 dez. 2022.

TAKAHARA, T. et al. Hodgkin Lymphoma: Biology and Differential Diagnostic Problem. **Diagnostics**, v. 12, n. 6, p. 1507, jun. 2022.

THIDA, A. M.; TUN, A. M. Lymphocyte Depleted Hodgkin Lymphoma. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

TONEGAWA, S. Somatic generation of antibody diversity. **Nature**, v. 302, n. 5909, p. 575–581, abr. 1983.

TZANKOV, A.; DIRNHOFER, S. Pathobiology of Classical Hodgkin Lymphoma. **Pathobiology**, v. 73, n. 3, p. 107–125, 2006.

VAN DER WEYDEN, C. A. et al. Understanding CD30 biology and therapeutic targeting: a historical perspective providing insight into future directions. **Blood Cancer Journal**, v. 7, n. 9, p. e603–e603, set. 2017.

VAN DONGEN, J. J. M. et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. **Leukemia**, v. 26, n. 9, p. 1908–1975, set. 2012.

VANIA CRISTINA CANUTO DOS SANTOS. **Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Linfoma de Hodgkin**. Disponível em: <https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/consultas/relatorios/2020/ddt_linforma_de_hodgkin_cp_11_2020.pdf>. Acesso em: 7 maio. 2023.

VENKATARAMAN, G. et al. Aberrant T-cell antigen expression in classical Hodgkin lymphoma is associated with decreased event-free survival and overall survival. **Blood**, v. 121, n. 10, p. 1795–1804, 7 mar. 2013.

VICTORA, G. D.; NUSSENZWEIG, M. C. Germinal Centers. [s.d.].

VON TRESCKOW, B.; MOSKOWITZ, C. H. Treatment of relapsed and refractory Hodgkin Lymphoma. **Seminars in Hematology**, Hodgkin Lymphoma. v. 53, n. 3, p. 180–185, 1 jul. 2016.

WARD, E. et al. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 64, n. 2, p. 83–103, 2014.

WENIGER, M. A.; KÜPPERS, R. Molecular biology of Hodgkin lymphoma. **Leukemia**, v. 35, n. 4, p. 968–981, abr. 2021.

WHITAKER, K. Earlier diagnosis: the importance of cancer symptoms. **The Lancet Oncology**, v. 21, n. 1, p. 6–8, 1 jan. 2020.

WOO, J.; BAUMANN, A.; ARGUELLO, V. Recent advancements of flow cytometry: new applications in hematology and oncology. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 14, n. 1, p. 67–81, jan. 2014.

WOOD, B. L. et al. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. **Cytometry. Part B, Clinical Cytometry**, v. 72 Suppl 1, p. S14-22, 2007.

APÊNDICE:**CLASSICAL HODGKIN LYMPHOMA DIAGNOSIS THROUGH MULTIPARAMETER FLOW CYTOMETRY****INTRODUCTION**

Classical Hodgkin lymphoma (CHL) is a rare neoplasm whose incidence varies according to sex, age, geographical location, and socioeconomic status ¹. Gold standard diagnosis is performed through morphological and immunohistochemical evaluation of pathognomic Hodgkin/Reed-Sternberg cells. These cells present a characteristic CD30+, PAX5+, CD15-/+, CD20-/low, CD3- immunohistochemical profile and are exceedingly rare, often comprising 1% or less of cells amongst a rich immune infiltrate ². The rarity of Hodgkin/Reed-Sternberg cells and the absence of specific symptoms can lead to delayed diagnosis and negatively affect prognosis ³.

Multiparameter flow cytometry (MFC) is essential to the rapid diagnosis, classification and monitoring of most haematological malignancies. It can detect rare populations in a great variety of samples, ranging from biopsies to fluids, and efficiently distinguish cell types based on physical parameters (size and complexity) and phenotypic profile ⁴. Although it requires tissue disaggregation and thus loss of morphological characteristics, it can be useful in cases where limited tissue is available or/and morphological evaluation is insufficient to establish a diagnosis ⁵.

In the last two decades CHL diagnosis through MFC has been proven feasible ⁶. Research in this field has been mostly focused on further examination of antigens that can identify HRS cells with greater sensitivity and specificity while enabling characterization of the immune infiltrate in the search of new prognostic markers ⁶⁻⁹.

The panels usually range from 6 to 10 antigens including the backbone markers CD30, CD45 and CD15 combined with a variety of other antigens such as CD3, CD4, CD5, CD8, CD20, CD40, CD64, CD71, CD95, CD123, HLA-DR¹²⁻¹⁴. These efforts combined have provided a landscape for the H/R-S immunophenotype in MFC and proved its correlation to immunohistochemical analysis. Despite this, few attempts have been made to determine which of the antigens represent the most relevant markers, essential to CHL diagnosis^{10,11}. This definition is especially important as large panels are difficult to translate to clinical setups^{8,9,12-14}.

Here we describe the retrospective study of the expression analysis of 15 antigens in 139 patients to define the most informative markers that can provide an accurate diagnosis for CHL and establish a differential diagnosis to other lymphomas and solid tumours.

METHODS

Specimen Selection and Ethics Statement

The study cohort included 139 samples from 80 patients that could be further stratified into a pediatric cohort comprised of 101 specimens from patients ranging from 0-19 years old (median 10 years), evaluated in tubes 1 and 2, and an adult cohort comprised of 38 specimens from patients ranging from 20-85 years old (median 62 years), evaluated in tubes 3 and 4 .

The final diagnosis of classical Hodgkin lymphoma (CHL) was established based on morphological and immunohistochemical analyses in accordance with the World Health Organization (WHO) criteria. Specimens included lymph node biopsies, tonsil biopsies, tumour mass specimens and bone marrow (BM) aspirates. Other samples, such as pleural effusions, pericardial effusions, and cerebrospinal fluid (CSF), were included but weren't submitted for cytologic analysis. The description of samples is in (TABLE 1)

The study was conducted with the approval of the Ethics Committee of the Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG/UFRJ) and approval by the ethics committee of each of the participating centres. Samples were obtained after written informed consent was given, in accordance with the Helsinki Declaration protocol.

Description of Antibodies combinations

Data acquisition was performed on a FACS Canto II flow cytometer (BD), 3-laser, 10-color, using the FACSDiva software (BD, San José, CA, USA) and analyzed through Infinicyt (Cytognos, SL, Salamanca, Spain). Four different antibody combinations were tested on a total of 139 samples. The distribution of samples between tubes and the fluorescently labelled antibodies combinations used, as their clone names and commercial houses are described in TABLE 2.

The MFC assays were done in parallel with histopathology analysis in each of the reference centres. An ideal of 5×10^6 cellular events were acquired for the analysis of lymph nodes and mass biopsies or bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) samples. For other fluidic samples, an ideal of $> 1 \times 10^4$ cellular events was acquired.

Sample preparation

Lymph node suspensions were prepared through a mechanical disaggregation procedure. The tissue was dissected with sterile needles and filtered through a 200µm pore size filters to eliminate clumps and debris, centrifuged (800g for 10 minutes), and washed twice. Firstly, with phosphate-buffered saline (PBS) + 0,2% BSA (800g for 5 min) and then phosphate-buffered saline (PBS) (560g for 5 min).

Body fluids were collected in either an EDTA tube or, in the case of cerebrospinal fluid samples (CSF), in a tube containing 5–10% volume of TransFix (Caltag Medsystems, Towcester, UK). Then, the tubes were centrifuged (at 800 g for 10 min), resuspended in 5 mL

of PBS containing 0.2% bovine serum albumin (PBS–BSA), and washed twice, as specified above.

Bone marrow samples were processed following the EuroFlow protocols for Bulk Lysis. The viability dye, employed on the second antibody combination, was added to the samples before the antibody staining. All the samples were incubated with FVS780 for 15 minutes at room temperature, protected from light.

The staining of surface markers only or cell surface membrane plus intracellular markers, were done according to EUROFLOW SOP (SOPs available at www.EuroFlow.org).

Identification of H/R-S and immune infiltrate cells

The identification of different populations was performed through Boolean gating strategies. In most of the (¾) antibody combinations, cell debris and doublets were excluded according to FSCxSSC parameters, saved for the second antibody combination where cell debris and non-viable cells were excluded using the Fixable Viability Stain 780 (BD Horizon™, BD Biosciences).

All samples were evaluated with the backbone markers CD15, CD30 and CD45 accompanied by a variable combination of antigens for the identification and discrimination of HRS cells.

In tube 1, HRS cells were defined by CD30⁺, CD15^{-/+} and CD123^{-/+} expression. In tubes 2 and 3, HRS cells were defined by CD30⁺, CD40⁺, CD95⁺ and CD15^{-/+} expression. And finally, in tube 4, HRS cells were defined by CD30⁺ and CD40⁺ expression.

In our study, we also aimed for the identification of the reactive cells of the immune infiltrate, and differential diagnosis for non-hematopoietic solid tumours (CD45⁻, CD56⁺), the latter restricted to tubes 1 and 2.

The immune infiltrate was classified based on the populations of lymphocytes (CD45⁺⁺, FSC^{low}, SSC^{low}) and their major populations: B lymphocytes (CD20⁺, CD40⁺, nuPAX5⁺) and T/NK cells (CD3⁺, CD5⁺, CD56⁺). When specific markers were absent T/NK cells were roughly classified by their FSC^{low}, SSC^{low} and CD30⁻, CD40⁻ expression. The myeloid lineage was defined based on monocytes (CD45⁺⁺, HLADR⁺, CD14⁺, CD123⁺), neutrophils (CD45⁺, CD15⁺, HLADR⁺), and eosinophils (CD45⁺, CD15⁺).

RESULTS

Description of cases

On our 37 morphologically confirmed CHL cases, the average age was 11 years and the 0,6: 1 female: male ratio was X . The cases included 25 samples from pediatric patients and 12 samples from adult patients (median of 62 years, 0,81:1 female: male) (TABLE 3).

The cases corresponded to samples from 21 patients that were subclassified as 17/21 (80%) nodular-sclerosis Hodgkin lymphoma (NSCHL) and 4/21(20%%) as mixed-cellularity Hodgkin lymphoma (TABLE 3).

All the analysis were performed concomitantly to the morphologic evaluation and immunochemical analysis of samples. Clinical data was limited to age, gender and diagnosis suspicion at the thus reducing bias to minimal.

Identification of HRS cells

In our first antibody combination 8 of the 14 cases evaluated were considered diagnostic of CHL by MFC. Overall, the immunophenotypic profile showed a uniform bright expression of CD30, CD15 was detected in 50% (4/8) of the cases and CD123 was expressed in 25% (2/8) cases (FIGURE 1). HLA-DR was present in all cases in which was evaluated (2/2).

Interestingly, the lymphoid markers smCD3 and CD5 showed some expression in our cases,

being detected in 87% (4/8) and 50% (4/8) of the samples, respectively. This atypical expression could be explained by T cell and H/R-S rosette formation, typical of CHL, and already reported by other authors.

The B lymphoid marker CD20 was expressed in 50% (4/8) cases and showed slight dimmer expression in H/R-S cells when compared to normal B lymphocytes. In our cases, CD45 showed unexpected dim to bright expression in neoplastic cells and no expression of CD56 was reported.

In the analysis of the tube 2 combination, 9 of 11 cases were considered diagnostic but only 8 could be analyzed for antigen expression due to acquisition error in one sample. The H/R-S cells showed a uniform bright expression of CD30, CD40 and CD95 in 100% (8/8) of the cases and, as expected, CD40 and CD95 expression was greater in the neoplastic cells than in other observed cell types (FIGURE 1). CD15 showed similar staining pattern between the second antibody combination and the first antibody combination, being present in 50% (4/5) of cases in both. Likewise, CD45 dislocation was present in all samples. Finally, the expression of nuPAX5 was present in all cases. In our cases, H/R-S showed a brighter expression of PAX5 than B lymphocytes. Usually, B lymphocytes demonstrate a higher staining pattern when compared to H/R-S in immunohistochemical analysis.

The third and fourth antibody combinations were evaluated concomitantly in 14 cases of which 12 were considered diagnostic for CHL. In these samples, CD30, CD40, CD95 were brightly expressed in all cases. CD86 was also identified in all cases (8/8). In comparison, CD15 was present in 62% (5/8) of the samples and HLADR was present in 87% (7/8) cases (FIGURE 1).

The lymphoid marker CD20 was expressed in 12% (1/8) of the cases and some expression of CD3 was reported in 62% (5/8) of the samples.

Interestingly, the expression of CD81 was present in all (8/8) cases (FIGURE 1). CD81 is a typical marker of normal germinal centre B cells and shows a strong staining pattern in these cells both through immunohistochemical and MFC evaluation. Expression of this marker in CHL is exceedingly rare, comprising only 0,05% of cases. No cases showed expression of CD14.

Minimal events and cell viability analysis

The experiments evaluated samples with 10000 to 5×10^6 events. No samples were excluded because of the number of events or viability. Although HRS are rare, we achieved diagnosis in samples with as little as 112000 cells.

Overall, a median cell viability of 76,2% (74,5–77,4%) was observed after excluding events corresponding to dead cells and cell debris. Viability rates were > 50% in half (56/109 samples) of the samples, and Boolean gating strategy and FVS780 protocols yielded similar results in the analysis of percentage of viable cells, 76,2% ($\pm 21\%$) and 74,5% ($\pm 24\%$), respectively.

Selection of markers to distinguish between normal and HRS cells

In this study, we also identified reactive cells and discriminated them from infiltrating HRS cells. Overall, the immune cells could be readily identified, yet not all cases were representative of the main lymphoid and myeloid subpopulations. The eosinophil population could not be identified in 5/8 of the adult cases and in 6/16 pediatric cases. In the pediatric population, the neutrophil population was absent in 1/16 cases.

Subsequently, all analyzed MFC files were merged into single files in accordance with their respective antibody combinations. Canonical analysis (CA) based on multivariate analysis of the merged flow cytometry data was employed to select the most informative, non-redundant markers to discriminate between HRS cells and the normal and inflammatory cells of the

immune infiltrate in each of the antibody combinations. Thus, in CA analysis revealed that amongst the four tubes, the most informative markers for distinction between lymphoid cells were (CD15, CD30, CD45, CD81, CD86, CD95, nuPAX5), whereas (CD45, CD15, nuPAX5, CD30, CD86, CD95, CD40) in combination were critical to distinguish HRS and myeloid cells (FIGURE 2). This study a final 8 antibody-combination of CD15, CD30, CD40, CD45, CD81, CD86, CD95 and nuPAX5.

Sensibility and Specificity analysis

We evaluated 122 specimens to determine our overall sensibility and specificity in detecting HRS cells throughout the four distinct tubes. The samples included in this analysis corresponded to a variety of reactive cases, non-hematopoietic solid tumour biopsies and non-Hodgkin lymphoma samples. Amongst NHL samples, entities that are common differential diagnoses for CHL, such as anaplastic large cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma, were present.

We excluded peripheral blood samples, CSF samples, pleural effusion and pericardial effusion specimens of patients suspicious of CHL from this analysis since they weren't submitted to cytological evaluation. Specimens data was analyzed at the moment of morphological diagnosis.

Overall, the sensibility was 73% and specificity was 98%. To aid the selection of the most informative markers in the cohort the sensibility and specificity of each tube were calculated. Thus, sensibility in tube 1 to tube 4 was 57%, 81%, 86% and 92%, respectively, portraying a clear increase.

In regard to specificity, no specimen analyzed by the first two tubes showed a CHL-type population, leading to a specificity of 100%. In the third and fourth tubes, the specificity was 92% and 95%, respectively.

Discussion

Despite advances, few groups have explored the possibility of CHL diagnosis through cytometry and thus the proposal and design of antibody panels for accurate diagnosis remains limited.

Overall, the analysis of the immunophenotypic profile of H/R-S cells was compatible with other immunohistochemical and MFC reports. The backbone markers CD15 and CD30 were evaluated in all samples and present in 100% and 54% of cases, as expected. Other markers that also displayed staining expression intensity and distribution according to literature included CD20, CD40, CD86, CD95, CD123 and HLA-DR ^{2,9,15}.

Differences in intensity of antigen detection were seen between different clones in CD40 and CD95 cases. We concluded that the xs clones provided better separation between HRS and non-neoplastic cells. This separation could also be influenced by the different fluorochrome channels to which CD95 was conjugated (PE versus APC).

Interestingly, some discrepancies in the literature were found in our analysis. The most remarkable of them was regarding PAX5 and CD81 staining pattern intensity. Although expected to be expressed in all HRS cells, PAX5 usually shows much stronger staining in B cells through immunochemistry evaluation ². In our cases, PAX5 showed a slightly higher expression in HRS cells through MFC, likely due to the combination of individual dim signals often visualized by immunochemistry analysis. PAX5 is important in the detection of CHL through IHQ as it confirms the B-cell origin of the neoplasm and it readily distinguishes from other common lymphoma diagnosis.

Another interesting result was the expression of CD81 in all cases evaluated. CD81 is an important marker in mature B lymphocytes and is highly expressed in germinal center lymphocytes. It has characteristic strong expression membrane and cytoplasmatic staining pattern. This bright staining in normal B cells can be also observed clearly through MFC. In contrast, no MFC expression of CD81 has been reported to HRS cells but its detection in CHL through immunohistochemical analysis is rare, comprising only 0,05% of the cases 16.

In contrast to other MFC and IHQ descriptions, our cohort demonstrated high expression of CD20 evaluated by tube 1 cases. The bright expression of this antigen is rare, comprising 5%-1% of all cases and thus is usually considered useful in the differentiation of CHL from other B cell lymphomas ².

Classically H/R-S cells do not express CD45 in IHC but in 70% of your cases it showed unspecific positive expression. Fromm also reported displacement of this marker in 73% of cases evaluated by CFM, associated with variable expression intensity 9. It is important to consider that there is also variability among expression patterns among CD45 clones employed in IHC; However, the biggest challenge faced by this approach is to distinguish H/R-S cells from other non-CD45-reactive cells in the immune infiltrate, such as histiocytes and dendritic cells ².

When we evaluated lymphoid markers, we observed that smCD3 and CD5 were displaced in 87% and 50% of cases, respectively. In our cases, CD3 and CD5 expression was seen in 75% and 50% cases respectively. In literature, CD3 expression showed a similar displacement in about 82% of cases studied by CFM. This displacement disappeared in 79% of the cases when these samples were treated with antibodies blocking T lymphocyte interaction with H/R-S cells, indicating that this would be a secondary effect of rosette formation 9. CD5 expression was not established by CFM, its displacement was also annulled when the samples were

treated with blocking antibodies. This result coincides with immunohistochemical description of absence of CD3 and CD5 expression in H/R-S cells ². It is possible to theorize that the displacement observed in our work was also due to the formation of rosettes. However, we do not have blocking antibodies to pre-treat the samples and prove our hypothesis.

Finally, CD56 was employed to provide a differential diagnosis in cases suspicious of solid tumours ¹⁷. This marker was absent in all HRS cells studied and its unspecific expression could be attributed to fluorescence spillover in PE-Cy 7 channel.

Regarding the sensibility and specificity of our assay, the evaluation of a large series of unselected cases allowed us to explore other cases of common differential diagnosis such as Anaplastic lymphoma and Large B cell lymphoma in an unbiased approach, adding to the accuracy of the combination here proposed. Overall, only one lymph node sample demonstrated an HRS cell-like population by MFC.

Despite little change was noted in viability between tubes, FVS780 incorporation played an essential role in accuracy increase. As H/R-S cells commonly fall into the debris and doublets area in dot plots, ruling out dying cells was a must as this cells can express nonspecific labelling, leading to false positive results ⁶.

An additional achievement of our study was the evaluation of metastasis. This event in CHL is extremely rare. It is estimated that bone marrow involvement is present in 5-38% of cases while central nervous system involvement occurs in as little as 0,2-0,5% of cases ¹⁸. In our cohort we successfully identified HRS infiltration on a bone marrow sample and central nervous system biopsy of the same patient. This identification is essential as both conditions are associated with late-stage disease and poor survival. Overall, the identification of metastasis can aid the stratification of patients and consequently select the most adequate therapeutic intervention, increasing their chances of a better outcome ¹⁸.

Finally, our study reiterates the feasibility of the identification of HRS cells through MFC analysis while exploring the advantages of inclusion of antigens nuPAX5 and CD81 to antibody panels and proposing an 8 antibody-combination that can be easily applied to clinical settings.

TABLE 1: Demographic and clinical features of patients (n=) and their samples (n=139) analyzed in this study.

Parameter	Patient distribution (n=)	N. of samples/total samples (%) (n=139)
Age at diagnosis (Years)*	10	
Gender (Male – Female)	49-30	
Underling disease		
Reactive/control samples		/139
Malignant neoplasm		/139
- <i>Hodgkin Lymphoma</i>		37/139
- <i>Others</i>		/139
Type of sample	Primary site (n=)	Sample site (n=139)
Lymph node	88/101	88/139
Tonsils	NP	02/139
Tumor mass	13/103	13/139
Central Nervous System	01/103	01/13
Head and neck	04/103	01/13
Thoracic	01/103	04/13
Axillar	03/103	01/13
Abdominal	02/103	03/13
Pelvic	01/103	02/13
Inguinal	01/103	01/13
BM	NP	19/103
PB	NP	4/103
Other fluids	NP	13/103
ICCC-3/ WHO diagnosis	Patient (n=x)	Sample (n=139)
<i>Lymphomas and reticuloendothelial neoplasms</i>	33/79	39/139
Hodgkin Lymphoma	21/79	25/139
Non Hodgkin Lymphoma	12/79	14/139
Burkitt Lymphoma	3/79	3/139
Diffuse Large B cell Lymphoma	3/79	3/139
Anaplastic Lymphoma	4/79	6/139
T lymphoblastic Lymphoma/Leukemia	2/79	2/139
<i>Non hematopoietic neoplasms</i>	8/79	8/139
Nasopharyngeal carcinoma	1/79	1/139
Neuroblastoma and other peripheral nervous cell tumors	3/79	3/139
Renal Tumors	2/79	2/139
Germ cell tumors	2/79	2/139
<i>Inflammatory/reactive diseases/control samples*</i>	38/79	53/139
Time of analysis		
At diagnosis	1/79	93/139
Not at diagnosis	1/79	8/139
Total	79	139

TABLE 2 : Antibody combinations evaluated for diagnosis of Classical Hodgkin Lymphoma.

Study	Antibody panel (N samples)	Fluorochrome-conjugated reagent							
		PB/BV421	PO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC/AF647	APCH7
RIO	Tube 1 (73)	CD20 2H7 Biolegend	CD45 HI30 Invitrogen	CD15 MMA BD	CD30 BerH8 BD	CD5 L17F12 BD	CD56 N901 Beckman Coulter	CD123 AC145 MitenylBiotec	smCD3 SK7 BD
	Tube 2 (28)	nuPAX5 HI9 BD	CD45 HI30 Invitrogen	CD15 MMA BD	CD30 BerH8 BD	CD40 5C3 Biolegend	CD56 N901 Beckman Coulter	CD95 DX2 BD	FV5780 BD
PORTO	Tube 3 (38*)	CD20	CD45	CD15	CD95	CD40	HLADR	CD30	CD3
	Tube 4 (31*)	CD81	CD45	CD14	CD86	CD40	HLADR	CD30	CD3

Abbreviations (alphabetical order): APC: allophycocyanin; APCH7: allophycocyanin-hilite 7; BD: Becton/Dickinson Biosciences;

BV: brilliant Violet; cy: cytoplasmic; FITC: fluorescein isothiocyanate; PB: Pacific Blue; PerCPCy5.5: peridinin-chlorophyll protein-complex cyanin 5.5; PE: phycoerythrin; PE-Cy7: PE-cyanin 7.

TABLE 3: Description of CHL positive samples

Case	Age,y	Sex	Specimen	Subtype	Antibody-Combination version	MFC	%HRS cells
1	12	M	Thoracic mass	NSCHL	1	-	NA
2	12	F	Lymph node	NSCHL	1	-	NA
3	14	F	Lymph node	NSCHL	1	-	NA
4	14	F	Lymph node	NSCHL	1	-	NA
5	10	M	Lymph node	NSCHL	1	+	1,4
6	6	F	Lymph node	MCCHL	1	+	0,19
7	14	M	Thoracic mass	NSCHL	1	+	0,004
8	7	F	Lymph node	NSCHL	1	+	0,04
9	11	M	Thoracic mass	CHL	1	-	NA
10	7	F	Lymph node	NSCHL	1	+	0,02
11	6	F	Lymph node	NSCHL	1	+	0,009
12	8	M	Lymph node	NSCHL	1	+	1,27
13	11	F	Lymph node	MCCHL	1	-	NA
14	9	M	Lymph node	MCCHL	1	+	0,03
15	16	F	Lymph node	NSCHL	2	-	NA
16	19	M	Lymph node	CHL	2	+	0,01

17	12	F	Axilar mass	NSCHL	2	+	0,04
18	5	F	Lymph node	MCCHL	2	+	0,01
19	5	F	Bone marrow	MCCHL	2	+	0,02
20	16	M	Pericardial effusion*	NSCHL	2	+	1,6
21	16	M	Lymph node	NSCHL	2	+	0,4
22	5	F	CSF*	MCCHL	2	+	0,01
23	16	F	Lymph node	NSCHL	2	+	0,02
24	6	F	CNS biopsy	MCCHL	2	+	0,01
25	10	M	Lymph node	NSCHL	2	-	NA
26			Lymph node		3,4	+	0,10
27			Lymph node		3,4	+	0,66
28			Lymph node		3,4	+	0,09
29			Lymph node		3,4	+	0,06
30			Lymph node		3,4	+	0,14
31			Lymph node		3,4	+	0,01
32			Lymph node		3,4	+	0,13
33			Lymph node		3,4	+	0,04
34			Lymph node		3,4	+	
35			Lymph node		3,4	+	
36			Lymph node		3,4	+	
37			Lymph node		3,4	+	NA
38			Lymph node		3,4	-	
39			Lymph node		3,4	-	

Abbreviations : CHL: classical Hodgkin lymphoma; CNS: central nervous system; CSF : cerebrospinal fluid; MCCHL; mixed cellularity classical Hodgkin lymphoma; NSCHL; nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma; MFC : multiparameter flow cytometry; NA : not applicable

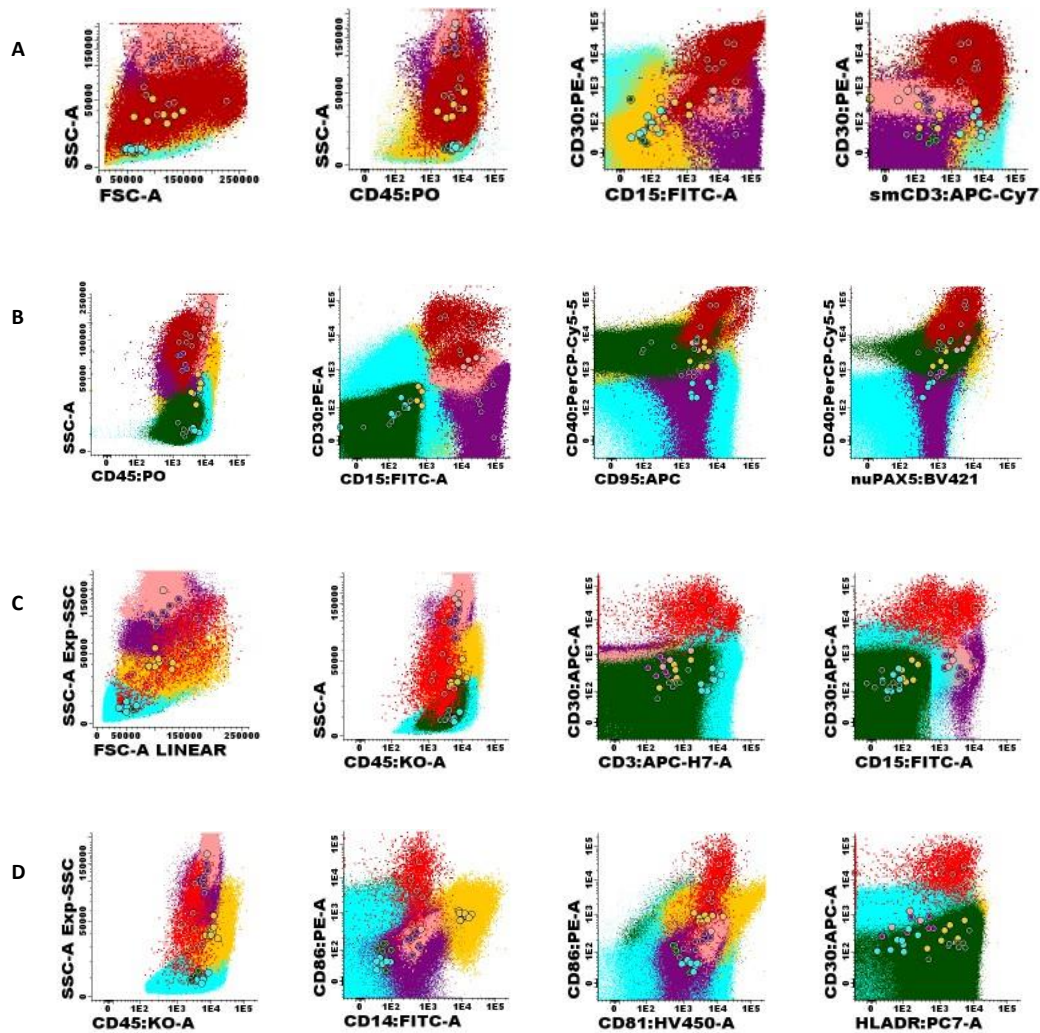


FIGURE 1: Antibody expression in HRS cells versus the immune infiltrate in each version of the tubes. Illustrative representation of the HRS cells (in red) versus immune cells. T cells are represented in light blue, B cells in dark green, monocytes in yellow, neutrophils in purple and eosinophils in light pink. Images A-D highlight the immunophenotypic profile of HRS cells in the antibody combinations that better separate them from the normal/reactive cells in A) tube 1, B) tube 2, C) tube 3, D) tube 4.

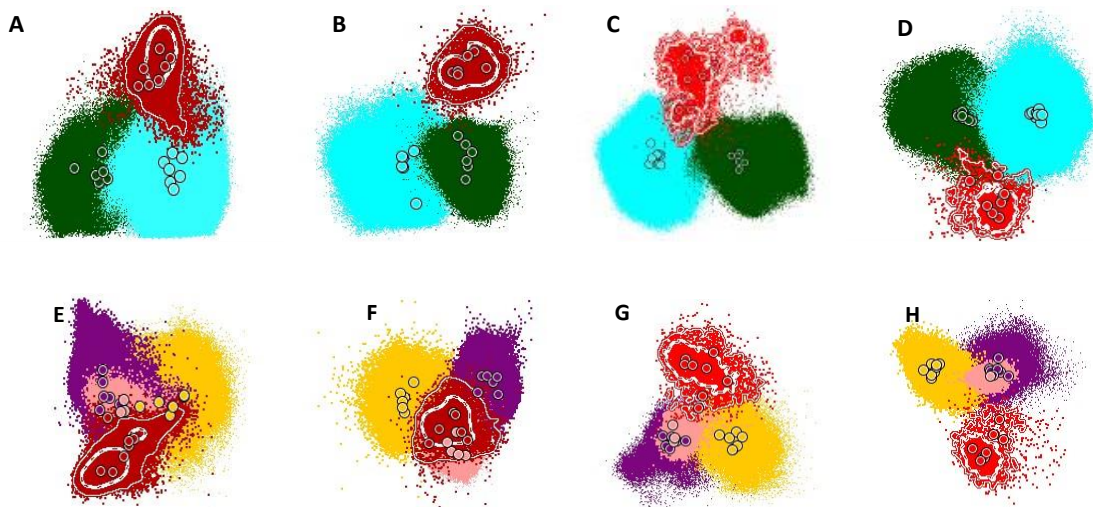


FIGURE 2: Selection of most informative markers through CA analysis. Illustrative representation of the discrimination of HRS cells (in red) versus T/NK cells (in light blue) and B cells (in dark green) through the most informative markers a) in tube 1 (CD15, CD30, CD45) ; b) in tube 2 (CD15, CD30, CD45, nuPAX5); c) in tube 3 (CD15, CD30, CD45, CD95) ; d) in tube 4 (CD45, CD81, CD86). The illustrative representation of the discrimination of HRS cells (in red) versus monocytes (in yellow), neutrophils (in purple) and eosinophils (in pink) through the most informative markers was also calculated for E) tube 1 (CD15, CD45, smCD3); F) tube 2 (CD45, nuPAX5, CD95); G) tube 3 (CD45, CD30, CD40); H) and tube 4 (CD45, CD86, CD40)

SUPPLEMENTARY IMAGES

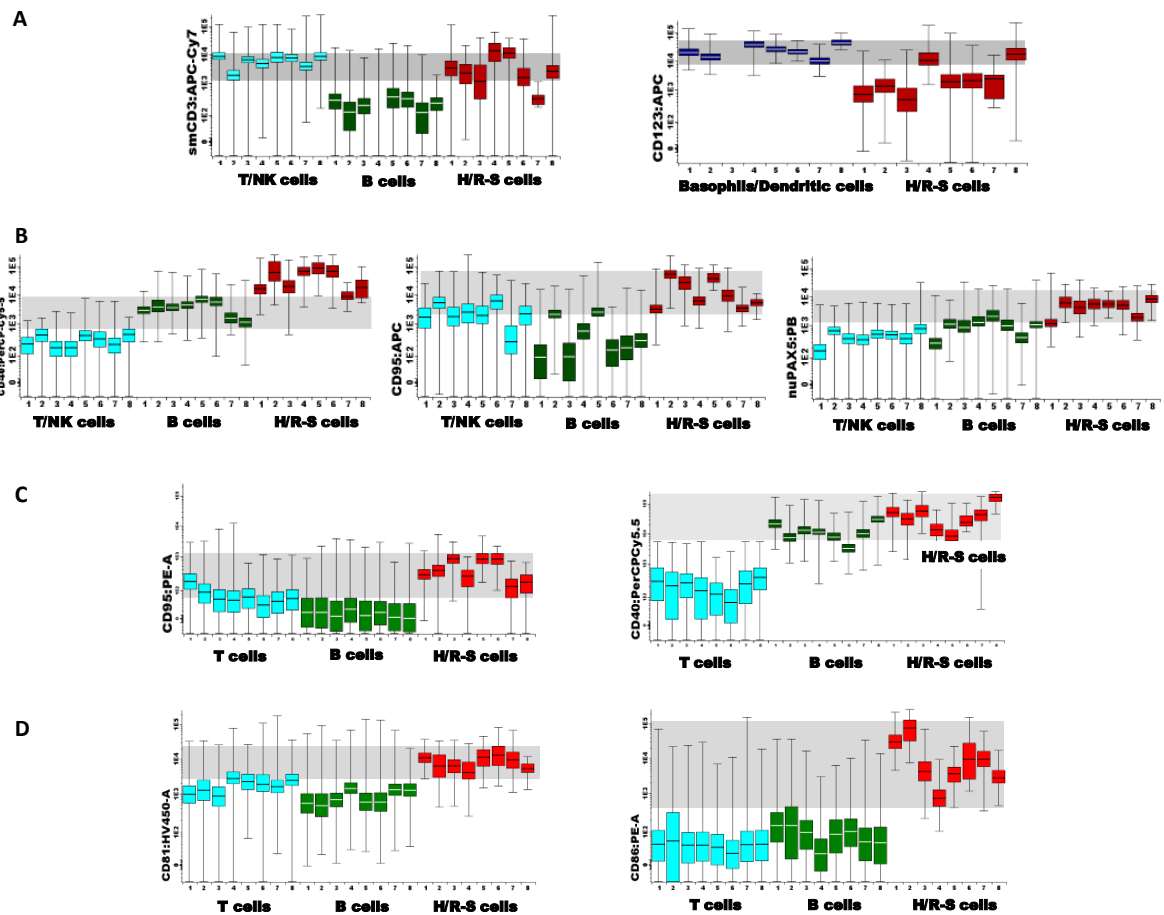


FIGURE 3: Box Plot representation of the most informative markers throughout tubes 1-4. (A) Illustrative representation of CD3 expression in H/R-S cells (red) compared to T/NK cells (light blue) and B cells (dark green). The CD123 expression in H/R-S cells (in red) was compared to basophils and dendritic cells (dark blue); (B) Illustrative representation of CD40, CD95 and nuPAX5 in H/R-S cells (red) compared to T/NK cells (light blue) and B cells (dark green) in tube 2. (C) Illustrative representation of CD40 and CD95 and nuPAX5 in H/R-S cells (red) compared to T/NK cells (light blue) and B cells (dark green) in the samples analyzed in tubes 3-4. (D) Illustrative representation of CD81 and CD86 in H/R-S cells (red) compared to T/NK cells (light blue) and B cells (dark green) in the samples analyzed in tubes 3-4.

BIBLIOGRAPHY

1. Huang, J. *et al.* Incidence, mortality, risk factors, and trends for Hodgkin lymphoma: a global data analysis. *J. Hematol. Oncol.* **15**, 57 (2022).
2. O'Malley, D. P. *et al.* American Registry of Pathology Expert Opinions: Immunohistochemical evaluation of classic Hodgkin lymphoma. *Ann. Diagn. Pathol.* **39**, 105–110 (2019).
3. Ansell, S. M. Hodgkin lymphoma: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am. J. Hematol.* **97**, 1478–1488 (2022).
4. Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y. & Nalbant, A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **37**, 163–176 (2017).
5. Chan, A. *et al.* Role of Flow Cytometric Immunophenotyping for Classic Hodgkin Lymphoma in Small Biopsy and Cytology Specimens. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **146**, 462–468 (2022).
6. Grewal, R.-K., Chetty, M., Abayomi, E.-A., Tomuleasa, C. & Fromm, J. R. Use of flow cytometry in the phenotypic diagnosis of hodgkin's lymphoma. *Cytometry B Clin. Cytom.* **96**, 116–127 (2019).
7. Fromm, J. R. Flow cytometric analysis of CD123 is useful for immunophenotyping classical Hodgkin lymphoma. *Cytometry B Clin. Cytom.* **80B**, 91–99 (2011).
8. Flores, M. B. Á. *et al.* A new approach to the study of Hodgkin lymphoma by flow cytometry. *Pathology (Phila.)* **55**, 86–93 (2023).
9. Fromm, J. R., Kussick, S. J. & Wood, B. L. Identification and purification of classical Hodgkin cells from lymph nodes by flow cytometry and flow cytometric cell sorting. *Am. J. Clin. Pathol.* **126**, 764–780 (2006).
10. Ng, D. P., Wu, D., Wood, B. L. & Fromm, J. R. Computer-aided detection of rare tumor populations in flow cytometry: an example with classic Hodgkin lymphoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **144**, 517–524 (2015).
11. Simonson, P. D., Wu, Y., Wu, D., Fromm, J. R. & Lee, A. Y. De Novo Identification and Visualization of Important Cell Populations for Classic Hodgkin Lymphoma Using Flow Cytometry and Machine Learning. *Am. J. Clin. Pathol.* **156**, 1092–1102 (2021).
12. Fromm, J. R. & Wood, B. L. A six-color flow cytometry assay for immunophenotyping classical Hodgkin lymphoma in lymph nodes. *Am. J. Clin. Pathol.* **141**, 388–396 (2014).
13. Fromm, J. R. & Wood, B. L. Strategies for immunophenotyping and purifying classical Hodgkin lymphoma cells from lymph nodes by flow cytometry and flow cytometric cell sorting. *Methods San Diego Calif* **57**, 368–375 (2012).
14. Fromm, J. R. Flow cytometric analysis of CD123 is useful for immunophenotyping classical Hodgkin lymphoma. *Cytometry B Clin. Cytom.* **80**, 91–99 (2011).

15. Kim, L.-H., Eow, G.-I., Peh, S. C. & Poppema, S. The role of CD30, CD40 and CD95 in the regulation of proliferation and apoptosis in classical Hodgkin's lymphoma. *Pathology (Phila.)* **35**, 428–435 (2003).
16. Luo, R. F. *et al.* CD81 Protein is Expressed at High Levels in Normal Germinal Center B cells and in Subtypes of Human Lymphomas. *Hum. Pathol.* **41**, 271 (2010).
17. Cs, F.-F. *et al.* Flow Cytometry Immunophenotyping for Diagnostic Orientation and Classification of Pediatric Cancer Based on the EuroFlow Solid Tumor Orientation Tube (STOT). *Cancers* **13**, (2021).
18. Shanbhag, S. & Ambinder, R. Hodgkin Lymphoma: a review and update on recent progress. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 116–132 (2018).

ANEXOS**ANEXO A****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****NOVAS ESTRATÉGIAS PARA O DIAGNÓSTICO E ACOMPANHAMENTO DO CÂNCER PEDIÁTRICO**

Termo de Consentimento para responsável de paciente PEDIÁTRICO

Você está sendo convidado (a) a participar de um projeto/estudo porque o seu (sua) filho (a) tem uma massa tumoral em investigação. Para que você possa decidir se seu (sua) filho (a) pode participar ou não deste projeto, precisa conhecer seus benefícios, riscos e conseqüências. Após receber todas as informações abaixo você poderá fornecer seu consentimento por escrito, caso autorize a participação do seu (sua) filho (a) no projeto.

PROPÓSITO (OBJETIVOS) DO PROJETO

O Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira- IPPMG/UFRJ juntamente com o Hospital dos Servidores do Estado (HFSE), Hospital da Lagoa, Rede D'or, Hospital da Criança e Instituto Nacional do Câncer (INCA) está desenvolvendo um projeto de pesquisa com o objetivo de auxiliar no diagnóstico e acompanhamento dos tumores sólidos pediátricos. O projeto envolve o estudo por citometria de fluxo multiparamétrica e FISH de parte do material que poderá ser retirado durante os procedimentos de diagnóstico e/ou tratamento, tais como, biopsias, cirurgias, coleta de sangue, fluidos, excreções.

Hoje em dia, para diagnosticar os tumores sólidos pediátricos há necessidade de uma grande experiência do patologista e de vários exames auxiliares. O que se pretende é:

- testar um método diagnóstico feito de maneira automática, chamado citometria de fluxo, que já é usado de rotina para o diagnóstico de outras doenças.
- auxiliar no diagnóstico convencional (histopatológico)
- estudar a resposta do sistema imune contra o câncer
- identificar subgrupos de tumores auxiliando no diagnóstico e tratamento

Rubrica do paciente Rubrica do pesquisador

PROCEDIMENTOS DO PROJETO

Se você concordar em participar deste projeto de pesquisa os pesquisadores participantes consultarão os dados clínicos registrados (quando pertinente) no prontuário do seu filho (a) e no momento da biópsia e/ou cirurgia para retirada do tumor de seu filho, uma parte deste material que não seria utilizada para o exame de rotina (que se chama histopatológico) será enviada ao laboratório de citometria de fluxo no IPPMG. Este material não utilizado seria descartado de acordo com as normas vigentes da Legislação Sanitária, não tendo prejuízo para o diagnóstico de seu filho. Além disso, será necessária uma pequena amostra (1 ml) de sangue (colhida no momento em que for necessário algum outro exame de sangue do seu filho, ou seja, ele não será incomodado somente para o estudo). A retirada de 1 ml de sangue não traz nenhum mal para seu filho. O material coletado só será utilizado para pesquisa de células de tumor no sangue e para avaliação da resposta imune ao câncer. Não haverá prejuízo no diagnóstico e no tratamento de seu filho. O diagnóstico e o tratamento dele serão realizados de acordo com os protocolos utilizados no hospital onde está internado sem qualquer interferência deste estudo.

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Caso você não deseje autorizar a participação do seu (sua) filho (a) neste projeto de pesquisa, basta que você não assine este Termo de Consentimento, e nenhuma amostra de sangue, medula óssea, fluidos ou massa do seu (sua) filho (a) será utilizada nem os registros médicos do seu (sua) filho (a) serão consultados (quando pertinente).

BENEFÍCIOS

Este projeto de pesquisa/estudo não oferece benefícios diretos a seu (sua) filho (a). O benefício principal da participação do seu (sua) filho (a) é possibilitar que no futuro, com os resultados alcançados com esse projeto, o diagnóstico e tratamento para esta doença beneficiem novos pacientes com tumores sólidos.

RISCOS

Não estão previstos riscos físicos para seu (sua) filho (a) pela participação dele (a) neste projeto. Nenhuma nova amostra será coletada. Apenas uma parte das amostras coletadas durante os procedimentos de investigação do tumor de seu filho serão utilizadas para este projeto de pesquisa.

2

Rubrica do paciente Rubrica do pesquisador

Além disso, alguns dados do registro médico (quando pertinente) do seu (sua) filho (a) serão analisados.

CUSTOS

Se você concordar com o uso de uma amostra de sangue, medula óssea, fluidos e/ou massa do seu (sua) filho (a) do modo descrito acima, é necessário esclarecer que você não terá quaisquer custos ou forma de pagamento pela participação dele (a) no projeto de pesquisa. A participação no projeto/estudo é voluntária e seu (sua) filho (a) não sofrerá nenhum dano no que diz respeito ao tratamento e acompanhamento no Hospital de origem caso não autorize a participação dele (a). Todo o tratamento e acompanhamento médico do seu (sua) filho (a) serão os mesmos, independentes de sua decisão de autorizar ou não a participação dele (a) no projeto.

CONFIDENCIALIDADE

Todas as informações desse projeto serão confidenciais e seu (sua) filho (a) não será identificado em nenhum momento. As amostras de sangue, medula óssea, fluidos e/ou massa serão processadas de tal forma que a privacidade e identidade do seu (sua) filho (a) sejam preservadas. Além da equipe de saúde que cuidará de você, os registros médicos (quando pertinente) do seu (sua) filho (a) poderão ser consultados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA, HFSE, IPPMG e Rede D'or e pela equipe de pesquisadores envolvidos. O nome do seu (sua) filho (a) não será revelado ainda que informações do registro médico dele (a) sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

BASES DA PARTICIPAÇÃO (direito a recusa ou abandono)

É importante que você saiba que a participação do seu (sua) filho (a) neste projeto é completamente voluntária e que você pode recusar-se a autorizar o uso do material e das informações para este projeto ou interromper a participação do seu (sua) filho (a) a qualquer momento sem perda de benefícios aos quais seu (sua) filho (a) tem direito, ou mudança no tratamento dele (a) nesta instituição. Em caso de você decidir interromper a participação do seu (sua) filho (a) no projeto, a equipe de pesquisadores envolvidos nesse projeto deve ser comunicada e a coleta/utilização do material: sangue, medula óssea, fluidos e/ou massa será imediatamente

Rubrica do paciente Rubrica do pesquisador

interrompida e nenhum dado do registro médico (quando pertinente) do seu (sua) filho (a) será utilizado.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

A pessoa responsável por obter este Termo de Consentimento lhe explicou claramente o conteúdo destas informações e se colocou à disposição para responder às suas perguntas sempre que tiver novas dúvidas. Você também tem a liberdade de consultar outros investigadores envolvidos neste projeto quando sentir necessário. Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazerem perguntas a qualquer momento do projeto/estudo. Neste caso, por favor, ligue para os contatos a seguir:

Laboratório de Citometria de fluxo IPPMG: 39386195

Dra Cristiane Facio: 997081715

PACIENTES DO INCA:

Se você tiver perguntas com relação aos direitos seu (sua) filho (a) como participante deste projeto também pode contar com um contato imparcial, o Comitê de Ética em Pesquisa do INCA, situado à Rua do Resende, 128 - sala 203, telefones (21) 3207-4550 ou 3207-4556, ou também pelo e-mail: cep@inca.gov.br.

PACIENTES DO HFSE:

Se você tiver perguntas com relação aos direitos seu (sua) filho (a) como participante deste projeto também pode contar com um contato imparcial, o Comitê de Ética em Pesquisa do HFSE, Rua Sacadura Cabral, 178 – Saúde. Telefones (21) 2291-3131.

PACIENTES DO IPPMG E HOSPITAL DA LAGOA:

Se você tiver perguntas com relação aos direitos seu (sua) filho (a) como participante deste projeto também pode contar com um contato imparcial, o Comitê de Ética em Pesquisa do IPPMG, Rua Bruno Lobo, nº50- Ilha do Fundão. Telefones (21) 3938-6116

Rubrica do paciente

Rubrica do pesquisador

PACIENTES REDE D'OR E HOSPITAL DA CRIANÇA:

Se você tiver perguntas com relação aos direitos seu (sua) filho (a) como participante deste projeto também pode contar com um contato imparcial, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Copa D'or, Rua Figueiredo de Magalhães, 875 - Copacabana, Rio de Janeiro - RJ, 22031-011

CONSENTIMENTO

Li as informações acima e entendi o propósito deste projeto assim como os benefícios e riscos potenciais da participação do meu (sua) filho (a) no mesmo. Ficou claro que a participação do meu (sua) filho (a) é isenta de despesas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para a participação do seu (sua) filho (a) neste projeto.

Nome do paciente :

____/____/____
DATA

Nome e Assinatura do Responsável Legal Data

____/____/____
DATA

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste projeto ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo mesmo. Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido do responsável pelo paciente para a participação nesta pesquisa.

____/____/____
DATA

Nome e Assinatura do Responsável pela obtenção do Termo

OBS: O TCLE será emitido em duas vias, uma para o paciente e outra para o pesquisador.

Todas as páginas devem ser rubricadas e numeradas.

Projeto aprovado pelo comitê de ética do HFSE _____, IPPMG _____,

INCA _____ Rede D'or _____

Rubrica do paciente Rubrica do pesquisador

ANEXO B

**TERMO DE ASSENTIMENTO HSE
para paciente adolescente****Projeto de Pesquisa: "NOVAS ESTRATÉGIAS PARA O DIAGNÓSTICO
E ACOMPANHAMENTO DO CÂNCER PEDIÁTRICO"**

Você está sendo convidado (a) a participar de um projeto de pesquisa porque você tem uma massa tumoral em investigação. Para que você possa decidir se quer participar ou não deste projeto, precisa conhecer seus benefícios, riscos e consequências. Após receber todas as informações abaixo você poderá fornecer seu consentimento por escrito, caso autorize a sua participação no projeto.

OBJETIVOS DO PROJETO

O Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira- IPPMG/UFRJ junto com o Hospital dos Servidores do Estado (HFSE), Hospital da Lagoa, Rede D'or, Hospital da Criança e Instituto Nacional do Câncer (INCA) está desenvolvendo um projeto de pesquisa. Esta pesquisa tem a finalidade de ajudar no diagnóstico e acompanhamento dos tumores em crianças.

Hoje em dia, para diagnosticar os tumores em crianças é necessário uma série de exames feitos pelo patologista.

O que se pretende é:

- testar um outro método diagnóstico que se chama: citometria de fluxo. Este método é usado para diagnóstico das leucemias, por exemplo.
- descobrir novas pistas que vão ajudar a entender porque algumas crianças ficam boas e em outras a doença volta
- estudar como seu corpo te defende contra este tumor (resposta imunológica)
- avaliar se existem células doentes no sangue ou em outro lugar além da massa tumoral ajudando no tratamento

PROCEDIMENTOS DO PROJETO

O diagnóstico desta massa tumoral é feito a partir de uma cirurgia onde um pedaço dela é retirado e enviado ao patologista. Além disso, para estudar melhor esta massa outros materiais

RÚBRICA DO PACIENTE

RÚBRICA DO PESQUISADOR

1

podem ser colhidos como sangue periférico, medula óssea, urina, líquido pleural, líquido ascítico para o diagnóstico e para o acompanhamento da doença. Parte da amostra colhida, que sobra dos exames pedidos pelo médico responsável e que são descartadas após a realização dos exames necessários, representa material muito útil para a pesquisa dessas células doentes.

Por esse motivo, você está sendo convidado a colaborar com a pesquisa científica autorizando a utilização de parte das amostras já coletadas de massa, sangue periférico, medula óssea ou outro material (líquido ascítico, líquido pleural, urina) nos procedimentos de rotina de diagnóstico. Você não será submetido a nenhum procedimento apenas para coleta de material para pesquisa. Caso você concorde em participar, será utilizado apenas o material que sobrar dos exames indicados pelo médico responsável, não havendo risco adicional algum. O material será utilizado apenas para essa pesquisa e não será, em nenhuma hipótese, utilizada para outros fins.

Pedimos também autorização para a consulta de seu prontuário, como forma de estudarmos possíveis associações entre os dados laboratoriais encontrados e a evolução do quadro clínico da doença. O acesso aos seus dados individuais será restrito aos pesquisadores envolvidos e não será permitido sua divulgação a terceiros.

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Caso você não deseje participar deste projeto de pesquisa, basta que você não assine este Termo de Consentimento, e nenhuma amostra de sangue, medula óssea, fluidos ou massa será utilizada nem seus registros médicos serão consultados (quando pertinente).

BENEFÍCIOS

Não há nenhum benefício direto e imediato para os pacientes que participam dessa pesquisa. Também não há nenhuma forma de recompensa financeira para participar da pesquisa.

A pesquisa busca entender a doença para poder no futuro, fazer melhores diagnósticos e tratamentos para as crianças e adolescentes que venham a desenvolver essa doença no futuro. A maior recompensa é contribuir para que possamos alcançar esse objetivo.

RISCOS

Caso não concorde em participar, ou se futuramente, em qualquer fase da pesquisa vier a retirar o seu assentimento, sua decisão não influenciará, em hipótese alguma, no curso de seu

tratamento, que continuará a ser realizado da mesma forma com os mesmos exames que seriam feitos caso participasse da pesquisa.

CUSTOS

Se você concordar com o uso de uma amostra de sangue, medula óssea, fluidos e/ou massa sua do modo descrito acima, é necessário te explicar que você não terá quaisquer custos ou forma de pagamento pela participação neste projeto de pesquisa. A participação no projeto é voluntária.

CONFIDENCIALIDADE

As amostras serão identificadas por um número e registradas em uma base de dados. Apenas pessoas autorizadas da equipe podem ter acesso as informações do paciente, já que a base é protegida por senha. Caso venhamos a publicar os resultados da pesquisa seu anonimato como paciente será garantido.

BASES DA PARTICIPAÇÃO (direito a recusa ou abandono)

É importante que você saiba que sua participação neste projeto é completamente voluntária e que você pode recusar-se a autorizar o uso do material e das informações para este projeto ou interromper sua participação a qualquer momento sem qualquer tipo de mudança no seu tratamento nesta instituição. Tudo será exatamente igual participando ou não do projeto. Em caso de você decidir interromper sua participação no projeto, a equipe de pesquisadores envolvidos nesse projeto deve ser comunicada e a coleta/utilização do material: sangue, medula óssea, fluidos e/ou massa será imediatamente interrompida e nenhum dado do registro médico seu será utilizado.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

A pessoa responsável por passar este Termo de Consentimento lhe explicou claramente o conteúdo destas informações e se colocou à disposição para responder às suas perguntas sempre que tiver novas dúvidas. Você também tem a liberdade de consultar outros investigadores envolvidos neste projeto quando sentir necessário. Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazerem perguntas a qualquer momento do projeto. Neste caso, por favor, ligue para Cristiane Facio no telefone (21) 997081715. Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante deste projeto também pode contar com um contato imparcial:

PACIENTES DO INCA:

Se você tiver perguntas com relação aos direitos seu (sua) filho (a) como participante deste projeto também pode contar com um contato imparcial, o Comitê de Ética em Pesquisa do INCA, situado à Rua do Resende, 128 - sala 203, telefones (21) 3207-4550 ou 3207-4556, ou também pelo e-mail: cep@inca.gov.br.

PACIENTES DO HFSE:

Se você tiver perguntas com relação aos direitos seu (sua) filho (a) como participante deste projeto também pode contar com um contato imparcial, o Comitê de Ética em Pesquisa do HFSE, Rua Sacadura Cabral, 178 – Saúde. Telefones (21) 2291-3131.

PACIENTES DO IPPMG E HOSPITAL DA LAGOA:

Se você tiver perguntas com relação aos direitos seu (sua) filho (a) como participante deste projeto também pode contar com um contato imparcial, o Comitê de Ética em Pesquisa do IPPMG, Rua Bruno Lobo, nº50- Ilha do Fundão. Telefones (21) 3938-6116

PACIENTES REDE D'OR E HOSPITAL DA CRIANÇA:

Se você tiver perguntas com relação aos direitos seu (sua) filho (a) como participante deste projeto também pode contar com um contato imparcial, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Copa D'or, Rua Figueiredo de Magalhães, 875 - Copacabana, Rio de Janeiro - RJ, 22031-011

CONSENTIMENTO

Li as informações acima e entendi o propósito deste projeto assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Ficou claro que minha participação é isenta de despesas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste projeto.

Nome e Assinatura do paciente

____/____/____
Data

Nome e Assinatura do Responsável Legal

____/____/____
Data

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste projeto ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo mesmo. Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente para a participação desta pesquisa.

Nome e Assinatura do Responsável pela obtenção do Termo

____/____/____
Data

OBS: O TCLE será emitido em duas vias, uma para o paciente e outra para o pesquisador. Projeto aprovado pelo comitê de ética do HFSE _____, IPPMG _____, INCA _____ Rede D'or _____

ANEXO C



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA
MARTAGÃO GESTEIRA

NOVAS ESTRATÉGIAS PARA O DIAGNÓSTICO E ACOMPANHAMENTO DO
CÂNCER PEDIÁTRICO"

Procedimento inicial de coleta de amostras ao laboratório de citometria

A coleta de amostras será realizada durante procedimento diagnóstico e/ou seguimento de pacientes com suspeita e/ou diagnóstico de câncer pediátrico. O médico responsável pela coleta deve estar ciente dos cuidados de coleta e armazenamento para envio ao laboratório de citometria.

O preenchimento dos dados de identificação da amostra e paciente deve ser realizado pelo médico responsável pelo procedimento, devendo ser enviado conjuntamente com a amostra.

Os pacientes que participarão da pesquisa serão recrutados no momento da primeira consulta com o oncologista pediátrico, quando, juntamente com seus responsáveis legais, serão esclarecidos quanto a doação de material para a pesquisa, e, caso concordem, assinarão o termo de consentimento. Amostras de sangue periférico, medula óssea e líquidos corporais, serão coletados pelo oncologista e/ou cirurgião responsável e colaborador da pesquisa.

Amostras de tecido

A coleta de material proveniente de ressecção tumoral, biópsia ou punção aspirativa serão realizadas sem prejuízo ao diagnóstico convencional utilizado no Hospital de origem e, portanto, devem ser coletadas preferencialmente pelo patologista responsável na sala de congelação do centro cirúrgico. Importante que a coleta seja feita em área livre de necrose tumoral e representativa do tumor. Juntamente com o fragmento tumoral, sempre que possível, deve ser encaminhado fragmento contendo margem tumoral para avaliação de margem cirúrgica por citometria de fluxo.

Imediatamente após a coleta, o material deve ser armazenado em recipiente estéril contendo soro fisiológico 0,9% em temperatura ambiente (nota: os fragmentos tumorais Núcleo Transdisciplinar de Pesquisa- Laboratório de Citometria de Fluxo IPPMG/UFRJ Rua Bruno Lobo n50- Ilha do Fundão/ Rio de Janeiro
Tel: (21) 39384725/ 39384724

podem ser armazenados todos em um mesmo recipiente, porém a borda de tecido normal deve ser enviada em um recipiente separado), em volume suficiente para imersão do fragmento. Este recipiente deve ser colocado em isopor com gelo a fim de manter temperatura entre 2-4°C e, imediatamente, encaminhado ao laboratório de citometria de fluxo para processamento e análise.

O tamanho mínimo adequado para as amostras coletadas que serão analisadas por citometria de fluxo deve ser 0,5 x 0,3 x 0,3 cm. Em caso de coleta de amostras de tecido ósseo, idealmente um mínimo de 2 fragmentos deve ser encaminhado para análise.

Amostras de líquidos corporais

Amostras de fluidos corporais (líquor, humor vítreo, líquido ascítico, líquido pleural, urina, entre outros) deve ser realizado em ambiente estéril e armazenada em recipiente próprio (EDTA para líquido pleural, ascítico e pericárdico; EDTA + transfix para líquor, urina e humor vítreo) sem adição de líquidos ou conservantes. Um volume mínimo de 2 ml é necessário para o processamento adequado da amostra por citometria.

Imediatamente após a coleta, o material deve ser armazenado em isopor contendo gelo a temperatura de 2-4°C e enviado ao laboratório de citometria para processamento e análise.

Amostras de medula óssea e sangue periférico

Durante procedimento de estadiamento de câncer faz-se necessário, em alguns casos, a coleta de material proveniente de aspiração de medula óssea. Este material coletado deve ser encaminhado em tubo contendo EDTA, idealmente num volume total de 2ml.

No momento diagnóstico, sangue periférico é coletado para exames laboratoriais, com autorização prévia do paciente e/ou responsável e sem prejuízo ao mesmo. Neste momento de punção venosa uma amostra contendo 2ml de sangue periférico em EDTA, deve ser coletada e enviada ao laboratório de citometria para análise.

Contato em caso de dúvidas: Dra Cristiane Facio (21) 997081715

Dra Elaine Sobral (21) 999672864

Núcleo Transdisciplinar de Pesquisa- Laboratório de Citometria de Fluxo IPPMG/UFRJ
Rua Bruno Lobo n50- Ilha do Fundão/ Rio de Janeiro
Tel: (21) 39384725/ 39384724

ANEXO D



UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO
UFRJ



INSTITUTO DE PUERICULTURA E
PEDIATRIA MARTAGÃO GESTEIRA

LABORATORIO DE CITOMETRIA DE FLUXO

PROJETO DE PESQUISA: "NOVAS ESTRATÉGIAS PARA O DIAGNÓSTICO E
ACOMPANHAMENTO DO CÂNCER PEDIÁTRICO"

FICHA COLETA DE DADOS

<p>A) Dados de identificação do doador Código de identificação na pesquisa: Data da captação: _____ Hora: _____ Sexo: () Masc () Fem Idade: _____ Raça: _____ Nacionalidade: _____ Hospital de Procedência: _____ Médico responsável: _____</p>	<p>D) Dados da amostra de tecido: Tecido captado: () ressecção () Biópsia Sítio de captação: () primário () metastático Região anatômica: _____ Captação de tecido normal: _____ Número de amostras: _____ Registro no banco de tumores: _____</p>
<p>B) Dados da história clínica: Suspeita clínica: _____ Tempo de evolução: _____ Organomegalia: () sim () não Quais: _____ Metástase: () sim () não Sítios: _____ Quimioterapia prévia: () sim () não Protocolo: _____</p>	<p>E) Dados da amostra líquida: Procedimento: () mielograma: lado ESQ () DIR () () punção aspirativa () outros Volume coletado: _____</p>
<p>C) Dados laboratoriais: Leucograma: _____ Data: _____ Hg: _____ Hct: _____ Pla: _____ Ferritina: _____ VMA/ HMV: _____ LDH: _____</p>	<p>F) Anatomia patológica: Diagnóstico definitivo: _____ Tumor: () primário () recidiva () metastático Captação de tecido normal: () sim () não Quimioterapia prévia: () sim () não Resposta prévia do tumor a quimioterapia: () GRAU I (0-50%) () GRAU II (50-90%) () GRAU III (90-99%) () GRAU IV (100%)</p>

DADOS COLETADOS POR: _____

DATA: _____

Núcleo Transdisciplinar de Pesquisa – Laboratório de Citometria de Fluxo
Rua Bruno Lobo nº50 Ilha do Fundão Rio de Janeiro/RJ tel: 39384725/39384724
Dra Cristiane de Sá Ferreira Facio _ tel: (21) 997081715