

**ESTUDO DO MICROAMBIENTE TUMORAL
EM LINFOMA DE HODGKIN
PREDOMINÂNCIA LINFOCITÁRIA NODULAR**

LEONARDO LORDELLO DE MELO

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre em
Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: José Vassallo

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Melo, Leonardo Lordello de

**Estudo do microambiente tumoral em linfoma de Hodgkin
predominância linfocitária nodular** / Leonardo Lordello de Melo – São
Paulo, 2017.

104p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:
Oncologia.

Orientador: José Vassallo

Descritores: 1. Linfoma de Hodgkin/patologia/diagnóstico/
epidemiologia/imunologia/Hodgkin Disease/pathology/diagnosis/
epidemiology/immunology. 2. Microambiente Tumoral/imunologia/
Tumor Microenvironment/immunology.

“O famoso jeitinho brasileiro não possui apenas o lado ruim. Há muito de criatividade e improvisação, que permitem aos brasileiros sobreviverem em tempos de crise, inclusive no meio científico, onde tudo é mais rígido.”

Leonardo Lordello

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha mãe / avó, Neyde Lordello (*in memoriam*). Graças ao seu amor, que transbordava e inundava minha vida através dos seus gestos de carinho e cuidado, pude ser grande parte do que hoje sou. Se ter me ensinado a correr atrás dos meus sonhos acabou nos afastando de alguma forma, não tenho dúvidas de que hoje permanecemos mais próximos do que nunca. Afinal, agora, nem o tempo, nem o espaço são capazes de nos separar mais.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. José Vassallo, grande mestre, por todo suporte e sentido prático oferecido ao longo do trabalho, sobretudo por ter acreditado nele desde o princípio, ajudando a solucionar todas as dificuldades encontradas.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, por seu empenho e competência na patologia, além de todo o incentivo que sempre me foi dado, estímulo fundamental para os jovens patologistas.

À Prof^a. Iguaracyra Araujo, por ser um exemplo de patologista, inspiração para mim dentro do meio acadêmico, além de ser uma grande amiga, a quem devo minha formação inicial da graduação até a residência.

Às minhas amadas mães, Florinda (*in memorian*), Neyde (*in memorian*) e Elba, por sempre estarem ao meu lado mesmo nos momentos mais difíceis, dando todo seu apoio e cuidado, sempre acreditando em mim e fazendo com que acreditasse em mim mesmo.

À minha família, pelo carinho e incentivo, mesmo à distância, sobretudo aos meus tios, Geovane e Joney, e meu irmão, Júnior.

Ao meu marido Felipe Gargiulo, por seu amor, dedicação e paciência, principalmente nos momentos em que estive ausente por conta da pós-graduação. Agradeço, ainda, pela ajuda com a dissertação.

Às minhas amigas da Gang, das quais fiquei privado da convivência durante esses anos, mas que de alguma forma fizeram-se presentes a cada dia, dando forças para que não desistisse de tudo.

Aos meus amigos de infância, Gustavo, Tiago e Felipe, pela confiança que depositam em mim, sempre me tranquilizando nos momentos de ansiedade.

Ao amigo Davi Collares, por ter sido essencial para que esta dissertação fosse entregue este ano, além de estar sempre junto, mesmo à distância.

À amiga Gabriela Arruda, grande incentivadora em relação ao meu envolvimento com a ciência, por todas as conversas a respeito de medicina, ciência e futuro.

À amiga Liliane Afonso, pela torcida ao longo desses anos, assim como por todos os documentos organizados, escaneados e impressos. Sua ajuda foi de grande valia, até os últimos momentos.

À Ana Kuninari, pelo empenho junto à pós-graduação da Fundação Antônio Prudente, assim como pela simpatia e boa vontade para com os alunos.

À Suely Francisco, pela ajuda fundamental na organização da dissertação.

Às queridas Aninha, Louise, Eloísa, Fernanda, Júlia e Marina, não apenas por terem me ajudado com o projeto, mas pelas horas que passamos juntos.

Às colegas da Pós-Graduação, Mariana, Nayra, Mayara e Irina, pelas conversas e discussões relevantes, bem como pela ajuda e tranquilidade que sempre passaram nos momentos difíceis.

Às chefas e amigas Maria Inês e Luciana Schultz, pela flexibilidade que me foi dada no laboratório, enquanto nas aulas do mestrado, assim como pelo respeito e cuidado que sempre tiveram comigo.

A cada um dos funcionários do A.C.Camargo Cancer Center, que ajudaram direta ou indiretamente com a realização desta dissertação.

Aos pacientes, pois sem eles nada disso seria possível.

RESUMO

Melo LL. **Estudo do microambiente tumoral em linfoma de Hodgkin predominância linfocitária nodular**. São Paulo; 2017. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O linfoma de Hodgkin predominância linfocitária nodular (LHPLN) é caracterizado por padrões imunoarquiteturais constituídos por cerca de 1% de células neoplásicas em meio a microambiente inflamatório. Apesar da associação de características desse microambiente com prognóstico, não existem estudos sobre essa associação no Brasil. O presente estudo visa avaliar o impacto clínico de padrões imunoarquiteturais e microambiente tumoral do LHPLN, sobretudo com relação ao prognóstico. Para tanto, foram identificados retrospectivamente 69 pacientes, entre 1986 e 2016, com tempo médio de seguimento de 79 (IC95%: 59-99) meses. Houve razão masculino/feminino de 1,56, com média de idade de 32 (IC95%: 28-36) anos, 30% apresentando estágio avançado ao diagnóstico. Recidivas em 5 e 10 anos ocorreram em 16,4% e 20%, respectivamente. Houve mais de um padrão em 66,9% das amostras primárias e 83,3% nas recidivas, com predomínio de padrões B (54,6%) e A e B (33,3% cada), respectivamente. Macrófagos associados ao tumor não mostraram associação com pior prognóstico, quando avaliados por CD68 e CD163, assim como demais imunomarcadores avaliados. As curvas de sobrevida livre de progressão (SLP) foram desfavoráveis em padrões compostos exclusiva ou predominantemente por variante(s) atípica(s) e com microambiente rico em células T. Escore criado com base em grupo etário, gênero, estágio, combinação e microambiente dos padrões imunoarquitetural mostrou associação prognóstica com SLP.

SUMMARY

Melo LL. **[Tumoral microenvironment in nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma]**. São Paulo; 2017. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Nodular lymphocyte predominant Hodgkin's lymphoma (LHPLN) is characterized by immunoarchitectural patterns consisting of about 1% of neoplastic cells dispersed in an inflammatory microenvironment. Despite the association of characteristics of this microenvironment with prognosis, there are no studies evaluating this association in Brazil. The present study aims to evaluate the clinical impact of immunoarchitectural patterns and tumor microenvironment of LHPLN, specially concerning about prognosis. Patients (69) were retrospectively identified, between 1986 and 2016, with mean follow-up time of 79 (95% CI: 59-99) months. There was a male / female ratio of 1.56, with a mean age of 32 (95% CI: 28-36) years, 30% presenting as advanced stage at diagnosis. Relapses rates in 5 and 10 years were 16.4% and 20%, respectively. There were more than one pattern in 66.9% of the primary samples and 83.3% in relapses, with B (54.6%) and A / B (33.3% each) predominating. Tumor-associated macrophages showed no association with a worse prognosis, when identified by CD68 and CD163, as well as no other immunomarkers evaluated. Progression-free survival (PFS) curves were unfavorable in patterns composed of exclusively or predominantly atypical variant(s) and T cell rich microenvironment. Score created based on age group, gender, stage, combination and microenvironment of the immunoarchitectural patterns showed association prognosis with PFS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema dos padrões imunoarquiteturais.....	23
Figura 2	Fluxograma das análises realizadas no estudo.....	38
Figura 3	Histogramas, com curva de distribuição normal para idade estratificada por gêneros.....	40
Figura 4	Distribuição por topografia do diagnóstico primário e recidivas...	45
Figura 5	Curva de SLP.....	46
Figura 6	Curva de SCE.....	47
Figura 7	Padrões imunoarquiteturais de LHPLN observados no estudo, representados de acordo com a morfologia.....	48
Figura 8	Diagrama de caixa da relação de linfócitos B (CD20)/linfócitos T (CD3) por padrão imunoarquitetural.....	56
Figura 9	Expressão de CD4 e CD8 no TMA.....	58
Figura 10	Diagrama de caixa da relação de linfócitos T CD4+/linfócitos T CD8+ por padrão imunoarquitetural.....	58
Figura 11	Expressão de CD56, CD57, CD25 e FOXP3.....	59
Figura 12	Diagrama de caixa do percentual de macrófagos (CD68 e CD163) por padrão imunoarquitetural.....	62
Figura 13	Gráfico de dispersão entre CD68 e CD163.....	63

Figura 14	Avaliação de TAM (CD68 e CD163) e células dendríticas (S100) no TMA.....	64
Figura 15	Diagrama de caixa do percentual de células dendríticas interdigitantes por padrão imunoarquitetural.....	65
Figura 16	Diagrama de caixa da relação entre células dendríticas interdigitantes com morfologia estreladas e arredondadas por padrão imunoarquitetural.....	65
Figura 17	Curvas de SLP por grupo etário.....	67
Figura 18	Curvas de SLP por gênero.....	67
Figura 19	Curvas de SLP por tipo de estágio.....	68
Figura 20	Curvas de SLP por tipo de padrão imunoarquitetural.....	68
Figura 21	Curvas de SLP por morfologia de padrões imunoarquiteturais.....	69
Figura 22	Curvas de SLP por combinação de padrões imunoarquiteturais.....	70
Figura 23	Curvas de SLP por microambiente de padrões imunoarquiteturais.....	70
Figura 24	Curvas de SLP para escore 1 (grupo etário, gênero e tipo dos padrões).....	71
Figura 25	Curvas de SLP para escore 2 (grupo etário, gênero, tipo dos padrões e estágio).....	72

Figura 26	Curvas de SLP para escore 3 (grupo etário, gênero e combinações dos padrões).....	73
Figura 27	Curvas de SLP para escore 4 (grupo etário, gênero e microambiente dos padrões).....	74
Figura 28	Curvas de SLP para escore 5 (grupo etário, gênero, combinações dos padrões e estádio).....	74
Figura 29	Curvas de SLP para escore 6 (grupo etário, gênero, microambiente dos padrões e estádio).....	75
Figura 30	Curvas de SLP para escore 7 (grupo etário, gênero, tipo de estádio, combinações e microambiente dos padrões).....	75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Agrupamentos realizados para curvas de SLP e testes estatísticos com base nas características dos padrões imunoarquiteturais.....	26
Quadro 2	Anticorpos utilizados para reações imuno-histoquímicas.....	28
Quadro 3	Parâmetros utilizados no algoritmo do ImageScope® para avaliação de marcação membranar.....	30
Quadro 4	Parâmetros utilizados no algoritmo do ImageScope® para avaliação de marcação nuclear.....	31
Quadro 5	Variação dos padrões imunoarquiteturais em amostras pareadas.....	51
Quadro 6	Distribuição das áreas incluídas no TMA iguais e distintas por padrão imunoarquitetural.	53
Quadro 7	Divergência de padrões imunoarquiteturais observadas entre as áreas representadas no TMA e no corte inteiro, com referência ao padrão imunoarquitetural predominante.....	53
Quadro 8	Distribuição dos casos de LHPLN segundo expressão de CD56, CD57, CD25 e FOXP3 por padrão imunoarquitetural nas amostras avaliadas no TMA.....	60
Quadro 9	Comparação entre estimativa visual e análise digital pelo ImageScope® com base no CCI.....	77
Quadro 10	Parâmetros imunoarquiteturais avaliados para classificação dos padrões de LHPLN.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Cálculo dos escores prognósticos.....	35
Tabela 2	Comparação da média de idade com relação a gênero, estágio e agrupamentos por tipo, combinação, microambiente e morfologia de padrões imunoarquiteturais.....	41
Tabela 3	Comparação das características clínicas dos pacientes com material revisado e não revisado, referente a LHPLN.....	42
Tabela 4	Estadiamento ao diagnóstico.....	43
Tabela 5	Tratamento de primeira linha realizados de acordo com estratificação por estágio.....	44
Tabela 6	Comparação dos padrões predominantes de amostras primárias e recidivas.....	49
Tabela 7	Distribuição dos padrões imunoarquiteturais predominante e secundário(s) nas amostras primárias.....	49
Tabela 8	Distribuição dos padrões imunoarquiteturais predominante e secundário(s) nas recidivas.....	50
Tabela 9	Distribuição dos padrões imunoarquiteturais predominante e secundário(s) das amostras primárias dos pacientes que apresentaram progressão após tratamento.....	50
Tabela 10	Variação de parâmetros clínicos e patológicos nas amostras primárias e recidivas.....	52

Tabela 11	Distribuição da relação entre linfócitos B e T, avaliados por CD20 e CD3, respectivamente, e linfócitos T CD4+ e T CD8+ de acordo com os padrões imunoarquiteturais.....	56
Tabela 12	Distribuição de relação CD20/CD3, relação CD4/CD8, CD68, CD163, S100 e relação de células dendríticas interdigitantes com morfologia estrelada/arredondada de acordo com grupo etário e gênero.....	56
Tabela 13	Distribuição de relação CD20/CD3, relação CD4/CD8, CD68, CD163, S100 e relação de células dendríticas interdigitantes com morfologia estrelada/arredondada de acordo com estágio e sintomas B.....	57
Tabela 14	Distribuição de relação CD20/CD3, relação CD4/CD8, CD68, CD163, S100 e relação de células dendríticas interdigitantes com morfologia estrelada/arredondada de acordo com agrupamentos por tipo, microambiente e morfologia dos padrões imunoarquiteturais.....	57
Tabela 15	Expressão de CD56, CD57, CD25 e FOXP3 de acordo com grupo etário e gênero.....	61
Tabela 16	Expressão de CD56, CD57, CD25 e FOXP3 de acordo com estágio e sintomas B.....	61
Tabela 17	Expressão de CD56, CD57, CD25 e FOXP3 de acordo com tipo, microambiente e morfologia dos padrões imunoarquiteturais.....	61
Tabela 18	Distribuição de macrófagos, avaliados por CD68 e CD163, e células dendríticas interdigitantes, avaliadas por S100, incluindo relação entre as morfologias estrelada e arredondada, de acordo com os padrões imunoarquiteturais...	62

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABVD	Adriamicina, bleomicina, vinblastina, dacarbazine
BEACOPP	Adriamicina, bleomicina, vincristina, ciclofosfamida ou procarbazine, etoposide e prednisona
CCI	Coeficiente de correlação intraclasses
CCL17	<i>C-C motif ligand 17</i>
CCL22	<i>C-C motif ligand 22</i>
CCL28	<i>C-C motif ligand 22</i>
CCL5	<i>C-C motif ligand 5</i>
CD_n	<i>Cluster of differentiation sendo n o número atribuído ao marcador; quando n for seguido de L significa seu ligante</i>
Células NK	Células <i>natural killers</i>
CXCL13	<i>C-X-C motif ligand 13</i>
DAB	<i>Diaminobenzidine</i>
DAP	Departamento de anatomia patológica
EBNA-1	EBV <i>nuclear antigen-1</i>
EBNA-2	EBV nuclear antigen-2
EBV	Vírus Epstein-Barr
FOXP3	<i>Forkhead Box P3</i>
HE	Hematoxilina e eosina
IC95%	Intervalo de confiança de 95%
IHQ	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina
LDGCB	Linfoma difuso de grandes células B
LDGCB-RTH	Linfoma difuso de grandes células B rico em células T e histiócitos
LH	Linfoma de Hodgkin
LHC	Linfoma de Hodgkin clássico
LHPLN	Linfoma de Hodgkin predominância linfocitária nodular

Linfócitos Th1	<i>Lymphocyte T helper type 1</i>
Linfócitos Th2	<i>Lymphocyte T helper type 2</i>
LMP-1	<i>Latent membrane protein-1 do vírus de Epstein Barr</i>
MHC-II	<i>Major histocompatibility complex class II</i>
MOPP	Mecloretamina, vincristina, prednisona, procarbazona
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAX5	<i>Paired Box 5</i>
QT	Quimioterapia
RT	Radioterapia
S100	Proteína S100
SCE	Sobrevida câncer específica
SLP	Sobrevida livre de progressão
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TAM	<i>Tumor associated macrophages</i>
Taux	Linfócitos T auxiliares
Tcit	Linfócitos T citotóxicos
TGFB	<i>Transforming growth factor beta</i>
TMA	<i>Tissue microarray</i>
TMO	Transplante de medula óssea
TNFα	<i>Tumoral necrosis factor α</i>
Treg	Linfócitos T regulatórios

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Aspectos Gerais do LH.....	1
1.2	Padrões Imunoarquiteturais de LHPLN	9
1.3	Microambiente Celular Tumoral em LH	14
1.4	Justificativa do Estudo	19
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo Geral.....	20
2.2	Objetivos Específicos	20
3	METODOLOGIA	21
3.1	Considerações Éticas	21
3.2	Características do Estudo.....	21
3.3	População do Estudo	22
3.3.1	Crítérios de inclusão	22
3.3.2	Crítérios de exclusão	23
3.4	Dados Clínicos Obtidos de Prontuários	23
3.5	Resgate de Lâminas/Blocos de Parafina.....	24
3.6	Classificação Histopatológica	24
3.7	Confecção do TMA.....	26
3.8	Realização de Reações Imuno-histoquímicas.....	27
3.9	Análise das Reações Imuno-histoquímicas do TMA	29
3.10	Análise Estatística	31
3.10.1	Avaliação e categorização das células do microambiente tumoral....	31
3.10.2	Avaliação dos parâmetros clínicos e sobrevidas	33
3.10.3	Tabulação de dados, análises descritivas e testes estatísticos.....	36
4	RESULTADOS	38
4.1	Características Clínicas dos Pacientes com LHPLN	39

4.2	Características Imunoarquiteturais das Amostras de LHPLN.....	47
4.3	Microambiente Celular Tumoral.....	53
4.4	Análise de Sobrevida.....	66
4.5	Avaliação Digital	76
5	DISCUSSÃO	78
5.1	Características Clínico-Patológicas	78
5.2	Padrões Imunoarquiteturais.....	81
5.3	Fatores Prognóstico associados ao Microambiente Tumoral	83
5.4	Avaliação Digital	89
5.5	Limitações	91
6	RESUMO DOS ACHADOS	93
7	CONCLUSÕES	94
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

APÊNDICES

Apêndice 2 Formulário de Coleta de Dados Clínicos - LHPLN

Apêndice 3 Critérios do Grupo Alemão de Estudos de Hodgkin para o Cálculo da SLP

Apêndice 4 Coeficiente de correlação intraclass (CCI) dos imunomarcadores avaliados. Comparação entre estimativa visual e percentuais informados na avaliação digital através do ImageScope®.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DO LINFOMA DE HODGKIN (LH)

Linfomas são neoplasias malignas com origem no sistema linfo/hematopoiético, que correspondem a menos de 5% dos casos de câncer no mundo (ROMAN e SMITH 2011). Mais de 70 tipos de linfomas foram listados na mais recente classificação de tumores dos tecidos hematopoiético e linfóide da Organização Mundial da Saúde (OMS) (JAFFE et al. 2017), que tem como base aspectos clínicos e evolutivos dos pacientes acometidos, assim como morfológicos, imunofenotípicos e genéticos das células neoplásicas presentes em cada um desses tipos. Dentre os linfomas listados, destaca-se o LH, não apenas por representar uma parcela considerável do total dos linfomas no mundo, mas por apresentar características peculiares.

Apesar de ter sido descoberto por Marcello Malpighi (1628 - 1694), em 1666, o epônimo consagrado do LH foi atribuído ao Dr. Thomas Hodgkin (1798 - 1866) pelo Dr. Samuel Wilks (1824 - 1911), devido à sua publicação em 1832 de uma série de 7 casos fatais relacionados ao aumento do baço e das glândulas absorventes, atualmente conhecidas como gânglios linfáticos (BONADONNA 2000). Se inicialmente foi considerado como uma doença fatal, atualmente, sabe-se que o LH é uma neoplasia indolente predominantemente originada de células B (>98%), com um padrão de disseminação por contiguidade, que apresenta uma tendência a recorrências

locais, além de uma baixa taxa de progressão para linfomas de alto grau, sobretudo linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) (STEIN et al. 2017a).

A incidência anual de LH em países da Europa e América do Norte foi estimada entre 1,3 e 4,0/100.000 no sexo masculino e 0,9 e 3,1/100.000 no sexo feminino, enquanto que em países da Ásia foi significativamente menor: 0,1 a 1,3/100.000 no sexo masculino e menor que 0,7/100.000 no sexo feminino (ROMAN e SMITH 2011). A incidência anual ajustada para a idade é estimada em 2,8 casos/100.000. Diferentemente dos linfomas não-Hodgkin, que apresentam incidência gradativamente mais elevada ao longo dos anos, a incidência do LH permanece estável, conforme referido nas últimas duas classificações da OMS (POPPEMA et al. 2008; STEIN et al. 2017a).

Dados do *National Institutes of Health*-NIH mostram que os casos de LH corresponderam a cerca de 0,5% de todos os novos casos de câncer nos Estados Unidos da América em 2017, representando cerca de 10% de todos os casos novos de linfomas (National Cancer Institute-NCI 2017). Por sua vez, tal proporção foi de cerca de 6% no banco de dados do *Haematological Malignancy Research Network*-HMRN (2017), que traz dados representativos da população do Reino Unido. No Brasil, apesar de não aparecer entre os 10 tipos de câncer mais frequentes no país, estimava-se que pouco menos de 5% dos casos novos corresponderiam a LH, representando, contudo, uma proporção de cerca de 20% com relação ao total de casos novos de linfoma no país (Ministério da Saúde 2016). A incidência de LH no Brasil é relevante, sobretudo, entre jovens entre 20 e 24 anos, sendo esta a principal neoplasia

no sexo feminino em algumas capitais do país, como Porto Alegre (6,3%), Belo Horizonte (3,9%) e Fortaleza (3,1%) (SOARES et al. 2013).

A mais recente edição da classificação de tumores dos tecidos hematopoiético e linfóide da OMS refere, ainda, menor percentual atribuível aos subtipos clássicos de LH (LHC) (90%) que nas edições anteriores, o que possivelmente está associado à melhoria do diagnóstico histopatológico que ocorreu nas últimas décadas, sobretudo no que diz respeito ao subtipo predominância linfocitária nodular (LHPLN) (STEIN et al. 2017a e b). No Brasil, o LHC corresponde a cerca de 95% dos casos de LH, não havendo muitas diferenças na distribuição dos subtipos no Brasil em relação ao restante do mundo. Observa-se a seguinte ordem decrescente de frequência: esclerose nodular (~70%), celularidade mista (~20%) e depleção linfocitária (~5%) (VASSALLO et al. 2005). Nesse estudo, não foram identificados casos do subtipo rico em linfócitos.

O risco de desenvolver LH entre familiares próximos de pacientes afetados é de 3 a 17 vezes maior que na população geral (NAKATSUKA e AOZASA 2006). Este risco entre irmãos gêmeos é 99 vezes superior ao população geral (MACK et al. 1995). Um estudo demonstrou associação significativa entre LH e consanguinidade, apontando um papel para a genética como fator etiológico, possivelmente através de um padrão de herança recessiva, mas esse dado não foi confirmado por estudos maiores subsequentes (THOMSEN et al. 2016). A presença de 15 polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, do inglês *single nucleotide polymorphisms*) identificados em 9 *loci* diferentes envolvendo genes associados a LH em

estudo com gêmeos também contribui para a idéia de que um componente genético possa estar presente na susceptibilidade ao LH, ainda que os mecanismos envolvidos nesse processo sejam complexos e ainda não completamente entendidos (LINABERY et al. 2014).

Não se observa na literatura maior risco de desenvolvimento de LH associado a exposições ocupacionais, agentes químicos, tabagismo, estilo de vida ou radiação ionizante (NAKATSUKA e AOZASA 2006). Contudo, diferenças em relação à distribuição geográfica do LH podem estar associadas de maneira relevante ao vírus Epstein-Barr (EBV), haja vista sua relação com a patogênese de parte dos casos de LH (ARAUJO et al. 2006).

Os pacientes com LH são caracteristicamente adultos jovens, que apresentam acometimento de uma ou mais cadeias ganglionares da região cervical, com sintomas B em cerca de 30%, sendo estes caracterizados por febre, perda de peso e/ou sudorese noturna (STEIN et al. 2017a). Ressalta-se que esses são achados gerais dos LH, não necessariamente representando o que é observado em determinados subgrupos de pacientes, havendo alguma variação geográfica, como já comentado anteriormente.

No Brasil, observa-se maior acometimento de pacientes entre as primeiras décadas de vida, sendo a terceira neoplasia mais frequente entre adultos jovens (20-24 anos) (SANTOS et al. 2013). Em estudo avaliando linfomas de pacientes com idade inferior a 18 anos em um dos principais centros de consultoria em anatomia patológica do país, foram encontrados 42% dos casos correspondentes a LH (GUALCO et al. 2010). Estudos realizados em regiões distintas do país corroboram essa maior frequência de

acometimento de pacientes jovens (OLIVEIRA et al. 2002; ARAUJO et al. 2006). Apesar da divergência em relação à distribuição mundial ter sido associada a fatores socioeconômicos, apenas a infecção por EBV mostrou-se significativa em relação à patogênese dessa neoplasia no Brasil (ARAUJO et al. 2006).

Os casos de LH são classificados como duas entidades distintas: LHC e LHPLN (STEIN et al. 2017a). Apesar de ambas as entidades apresentarem como característica diagnóstica a presença de apenas uma pequena quantidade de células neoplásicas, que varia entre 0,1% e 10%, em meio a um microambiente predominantemente constituído por células inflamatórias, diferenças em relação à morfologia e ao imunofenótipo das células neoplásicas, bem como em relação à composição celular do microambiente e à evolução clínica permitem distinção entre elas.

Os seguintes subtipos são descritos como LHC: esclerose nodular, celularidade mista, rico em linfócitos e depleção linfocitária, com base em aspectos morfológicos e imunofenotípicos. Nesses subtipos, observam-se células de Reed-Sternberg, caracteristicamente grandes, com citoplasma levemente basofílico, dois ou mais núcleos ovóides, exibindo membrana nuclear irregular, com cromatina mais clara e nucléolo eosinofílico proeminente. Variantes mononucleares das células de Reed-Sternberg também podem ser encontradas, incluindo-se as células de Hodgkin e células lacunares, estas últimas frequentemente associadas ao subtipo esclerose nodular. Além disso, a presença de células com núcleos de aspecto picnótico

e citoplasma intensamente eosinofílico é comum, sendo estas conhecidas como células mumificadas (STEIN et al. 2017a).

O achado das células de Reed-Sternberg ou suas variantes com expressão de CD30 e CD15 em meio a microambiente constituído por células inflamatórias é diagnóstico de LHC. A expressão de antígenos presentes em células B, aqui incluídos CD20, PAX5 e CD79 α , ocorre de maneira reduzida, fraca e/ou focal nas células de Reed-Sternberg e suas variantes mononucleares. Diferentemente, a associação com o vírus Epstein-Barr (EBV), sobretudo nos países em desenvolvimento, é frequentemente observada através da expressão da proteína latente de membrana-1 (LMP1) e do antígeno nuclear do EBV-1 (EBNA-1), com negatividade para EBNA-2 nas células diagnósticas de LHC, traduzindo um padrão de latência do tipo II da infecção (STEIN et al. 2017a).

O LHC corresponde a cerca de 95% dos casos de LH, não havendo muita diferença na distribuição dos subtipos no Brasil em relação ao restante do mundo, como já mencionado. As características clínicas do LHC são similares às anteriormente descritas, haja vista que seus subtipos representam a grande maioria dos casos. Entretanto, além do pico em pacientes jovens (15 a 35 anos), frequentemente se observa outro pico em idade mais avançada (>60 anos), distribuição esta caracterizada originalmente como bimodal. Atualmente, a distribuição etária do LHC já foi reconhecida como variável de acordo com os subtipos pela OMS, com eventuais variações geográficas (STEIN et al. 2017a). No Brasil, esta

distribuição ocorreu de maneira unimodal no maior estudo realizado, com pico entre as duas primeiras décadas de vida (VASSALLO et al. 2005).

Altas taxas de sobrevida são esperadas em 5 anos em pacientes com LHC. Além dos fatores prognósticos desfavoráveis já conhecidos (gênero masculino, idade ≥ 45 anos, estágio avançado, hemoglobina baixa, contagem de leucócitos elevada, 3 ou mais áreas nodais acometidas, LDH sérica elevada, VHS elevada e envolvimento extranodal), a presença de recidiva está associada a redução da sobrevida em pacientes com esse subtipo de LH, diferentemente do que se observa no LHPLN.

No LHPLN, correspondente aos 5% restante dos casos de LH, destaca-se a presença de células grandes, com núcleos geralmente únicos de contornos irregulares, lobulados, com nucléolo pequeno, denominadas células linfo-histiocíticas ou células do tipo pipoca (do inglês, *popcorn cells*), devido à analogia morfológica em relação aos seus núcleos. As células linfo-histiocíticas mantêm a expressão de antígenos presentes em células B, sendo esta uma de suas características que as diferencia das células de Reed-Sternberg e suas variantes. Apesar da expressão de CD30 e CD15 não ser esperada, algumas células LH podem exibir expressão fraca e focal desses marcadores, contudo, a expressão de PAX5 e CD20 costuma ocorrer de maneira forte e difusa, assim como CD79 α , numa menor proporção (STEIN et al. 2017a).

As células neoplásicas, assim como no LHC, costumam estar presentes em pequena quantidade, dispersas em meio a microambiente quase que exclusivamente linfocitário, podendo estar circunscritas por rosetas

de pequenos linfócitos T que expressam CD57. Arranjo nodular ou vagamente nodular é frequentemente observado, com preservação da trama de células dendríticas foliculares, evidenciada através de CD21 ou CD23 (FAN et al. 2003).

Os aspectos clínico-patológicos referentes ao LHPLN são pouco conhecidos no Brasil, haja vista não existir na literatura estudo especificamente voltado para LHPLN no país (SOUZA et al. 1997; OLIVEIRA et al. 2002; VASSALLO et al. 2005; ARAUJO et al. 2006; GUALCO et al. 2010; GUESTA et al. 2012). Os dados disponíveis encontram-se diluídos em meio aos referentes aos LHC, o que gera uma distorção considerável das informações. A maior casuística publicada no Brasil é referente a um estudo envolvendo 5 grandes centros de diagnóstico em São Paulo, com 50 casos de LHPLN, contudo, apenas informações sobre distribuição etária e por gênero foram publicadas, sem outros dados pormenorizados (VASSALLO et al. 2005).

No que diz respeito ao tratamento, existe pouca distinção entre LHC e LHPLN. Os esquemas mais frequentemente utilizados envolvem as seguintes combinações de quimioterápicos: adriamicina, bleomicina, vinblastina e dacarbazina (ABVD), esquema mais utilizado para o tratamento; mecloretamina, vincristina, prednisona e procarbazina (MOPP), primeiro esquema utilizado com altas taxas de sucesso, ainda realizado em situações especiais, sobretudo alergia ou problemas cardiovasculares; e adriamicina, bleomicina, vincristina, ciclofosfamida ou procarbazina, etoposide e prednisona (BEACOPP), esquema geralmente utilizado para pacientes com

estágios avançados. Para pacientes com LHPLN, associação de ABVD com Rituximabe tem sido utilizada em alguns casos, contudo, sobretudo em se tratando de estágios mais avançados ou recidivas (BONADONNA 2000). Alguns centros, como o MD Anderson, tratame estes pacientes como LNH (FANALE et al 2017).

Nos últimos anos, a sobrevida após 5 anos supera os 80% na maioria dos países, possivelmente em virtude da detecção precoce e subsequente tratamento adequado (JOSTING 2010). Alguns pacientes, contudo, apresentam recidivas após o tratamento, sendo estas, por vezes, tardias, após 5 ou 10 anos (BRÖCKELMANN et al. 2016). A recidiva é um fator de pior prognóstico em pacientes com LHC, ainda que não tenha sido demonstrada tal associação em pacientes com LHPLN, indicando necessidade de tratamento mais agressivo (FAN et al. 2003; NOGOVÁ et al. 2008). Recidivas costumam ocorrer em pacientes com LHPLN de maneira mais tardia do naqueles com LHC (HARTMANN et al. 2013).

1.2 PADRÕES IMUNOARQUITETURAIS DE LHPLN

O LHPLN foi descrito inicialmente por JACKSON e PARKER (1944) como paragranuloma, sendo associado posteriormente ao LH por HICKS et al. (1956) como uma variante de crescimento nodular. LUKES e BUTLER (1966) em sua classificação passaram a reconhecer tal entidade como tipo preominância linfocitária do LH, constituído por células linfo-histiocíticas, que apresentavam distribuição distinta de acordo com os subtipos nodular e

difuso. POPPEMA et al. (1979), entretanto, favoreciam que o subtipo nodular representava uma entidade à parte, devendo ser, portanto, considerada com um subtipo distinto dos demais. Apesar disso, LHPLN somente foi reconhecido como entidade distinta a partir da publicação da classificação REAL (*Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasm*) por HARRIS et al. (1994), tendo sido mantido na classificação da OMS desde 2001 (JAFFE et al. 2001).

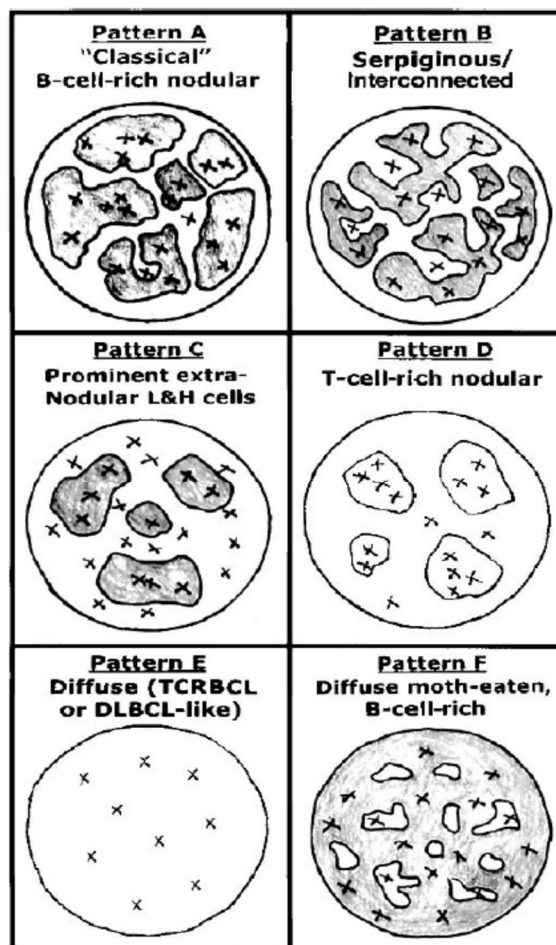
O padrão nodular do LHPLN é caracterizado pela presença de células linfo-histiocíticas formando nódulos constituídos por células B pequenas, envoltas em meio à trama dendrítica folicular, enquanto o padrão difuso é caracterizado pela distribuição de maneira difusa das células linfo-histiocíticas em meio a células T pequenas, com acentuada perda da trama dendrítica folicular. Por sua vez, distinção entre LHPLN com padrão difuso e LDGCB rico em células T e histiócitos (LDGCB-RTH) pode não ser possível em algumas situações, sobretudo quando há representação parcial da amostra ganglionar através de biópsia incisional, haja vista necessidade de identificação de área preservada da trama dendrítica folicular ao menos focalmente para diagnóstico de LHPLN.

Além desses dois padrões, foram descritos outros quatro padrões por FAN et al. (2003), com base na organização imunoarquitetural apresentada pelo LHPLN (Figura 1). Esses seis padrões foram descritos conforme segue:

A) padrão nodular clássico, rico em células B: células linfo-histiocíticas esparsas, predominantemente localizadas no interior de nódulos de contornos bem definidos, constituídos por frequentes linfócitos B pequenos, com trama

dendrítica folicular proeminente, além de rosetas de linfócitos T CD57+; **B) padrão nodular interconectado/serpiginoso:** similar ao padrão A, contudo, com nódulos de contornos irregulares, interconectados ou com aspecto serpiginoso, constituídos por frequentes linfócitos B pequenos, além de rosetas de linfócitos T CD57+; **C) padrão nodular com acentuada quantidade de células LH extranodulares:** células linfo-histiocíticas em maior quantidade que no padrão A, localizadas no interior de nódulos constituídos por frequentes linfócitos B pequenos, apresentando contornos irregulares, com frequente extensão extranodular das mesmas, por vezes, formando faixas circunjacentes aos nódulos ou mesmo adjacente a áreas difusas de células T, não associadas a trama dendrítica folicular ou rosetas de linfócitos T CD57+; **D) padrão nodular, rico em células T:** células linfo-histiocíticas predominantemente localizadas no interior de nódulos de contornos bem definidos, constituídos por frequentes linfócitos T pequenos, com trama dendrítica folicular geralmente atenuada, além de rosetas de linfócitos T CD57+; **E) padrão difuso (similar ao LDGCB-RTH):** células linfo-histiocíticas esparsas em meio a fundo difuso de linfócitos T, com perda de trama dendrítica folicular e rosetas de linfócitos T CD57+, contudo, havendo área preservada nodular na amostra, o que afasta diagnóstico de LDGCB-RTH; **F) padrão “comido por traça” (difuso), rico em células B:** células linfo-histiocíticas em meio a área vagamente nodular, expandida, com contornos irregulares, exibindo fundo predominantemente constituído por linfócitos B pequenos, associadas a trama dendrítica reticular fragmentada, com linfócitos T pequenos adjacentes às células linfo-histiocíticas,

configurando aspecto “comido por traça”.



Fonte: FAN et al. (2003).

Figura 1 - Esquema dos padrões imunoarquiteturais. Padrões A (superior, à esquerda), B (superior, à direita), C (meio, à esquerda), D (meio, à direita), E (inferior, à esquerda) e F (inferior, à direita). O microambiente nas áreas brancas e cinzas é representado predominantemente por linfócitos B e T, respectivamente, enquanto as células neoplásicas encontram-se indicadas por um "x".

O padrão E mostrou-se significativamente mais frequente nos casos que recidivaram do que naqueles que não apresentaram recidiva. Além disso, a presença dos padrões difusos E e/ou F foi preditora independente de recidiva. De maneira similar, observou-se uma tendência de associação do padrão E com transformação para LDGCB-RTH (FAN et al. 2003). Ainda que inicialmente esta associação não tenha sido respaldada por outros autores que avaliaram apenas os dois padrões originalmente descritos por LUKES e BUTLER (1966) (BOUDOVÁ et al. 2003), tal associação foi confirmada por HARTMANN et al. (2013), com a inclusão dos demais padrões descritos por FAN et al. (2003).

Os padrões C e D, assim como mencionado anteriormente para os padrões E e F, foram considerados como fator de risco independente para progressão ou recidiva de doença. Além disso, esses quatro padrões, considerados como variantes não típicas, estiveram associados a estágios avançados e pior escore prognóstico internacional (IPS, do inglês *international prognostic score*). Um escore prognóstico foi criado por HARTMANN et al. (2013) na tentativa de prever quais pacientes encontram-se sob maior risco de ter uma falha do tratamento padrão para LHPLN. Este escore tem como base padrões imunoarquiteturais (típicos A e B x variantes atípicas C, D, E e F), albumina sérica ($\geq 4\text{g/dL}$ x $< 4\text{g/dL}$) e gênero (masculino x feminino).

1.3 MICROAMBIENTE CELULAR TUMORAL EM LH

Caracteristicamente, o LH apresenta uma quantidade pequena de células neoplásicas, variando entre 0,1% e 10%, presentes em meio a microambiente rico em células inflamatórias, incluindo linfócitos B, linfócitos T, células *natural killers* (NK), plasmócitos, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e células dendríticas. Há evidências que demonstram que o recrutamento dessas células inflamatórias para o microambiente do LH é essencial para as células neoplásicas, pois estas necessitam de sinais parácrinos para sobreviverem. Células de Reed-Sternberg, nesta seção também representando variantes mononucleares do LHC, dificilmente crescem em cultura, não sobrevivem em camundongos imunodeficientes, raramente são encontradas no sangue periférico e, mesmo quando infiltram outros órgãos, o microambiente recapitula sua composição original, rica em células inflamatórias (KAPP et al. 1994).

Há evidências que sugerem que as células de Reed-Sternberg recrutam muitas das células inflamatórias que compõem o microambiente através da secreção de citocinas e quimiocinas. Por outro lado, elas se beneficiam de sinais parácrinos induzidos pelas células inflamatórias pertencentes ao rico microambiente (KÜPPERS 2012). Linfócitos T auxiliares CD4⁺ do tipo 2 (do inglês *T helper cell type 2*, Th2) e regulatórios (Treg) representam a maior parte da população de células infiltrantes nos tecidos envolvidos pelo LHC (MARSHALL et al. 2004). Estas células são presumivelmente atraídas pelas quimiocinas CCL5 (do inglês, *C-C motif*

ligand 5), CCL17 (do inglês, *C-C motif ligand 17*) e CCL22 (do inglês, *C-C motif ligand 22*) secretadas por células de Reed-Sternberg nos subtipos clássicos (NIENS et al. 2008).

Além disso, linfócitos Th2 e Treg produzem interleucina (IL)-7, que é capaz de induzir a diferenciação de linfócitos T CD4+ não ativados em linfócitos Treg. Estas células, que estão frequentemente localizados junto às células de Reed-Sternberg, expressam CD40L e, portanto, podem estimular a via de sinalização CD40 nas células neoplásicas, que está associada ao EBV nos subtipos clássicos. O complexo principal de histocompatibilidade classe II (do inglês, *major histocompatibility complex class II*; MHC-II) e os fatores estimuladores de células T, CD80 e CD86, são expressos na superfície de células de Reed-Sternberg, promovendo interação com os linfócitos T circundantes (KÜPPERS 2012).

Os linfócitos Treg CD25+ e FOXP3+ têm um papel essencial na autoimunidade, embora possam ainda suprimir os linfócitos reativos aos antígenos tumorais. Isto ocorre através da inibição de IL-2 e do receptor de IL-2 tipo 2 α , mais conhecido como CD25, que retarda ou impede a ativação de linfócitos T CD8+ e células NK. Os linfócitos Treg também secretam IL10, uma citocina supressora. Assim, os linfócitos Treg podem proteger as células de Reed-Sternberg de linfócitos T CD8+ e células NK, particularmente nos casos associados ao EBV, nos quais as células de Reed-Sternberg expressam o antígeno viral (KAPP et al. 1994; VISSER et al. 2016).

Ainda existe um debate na literatura quanto à real participação dos linfócitos B na patogênese do LH, haja vista que os mesmos são células

constituintes predominantes dos folículos linfóides, podendo estar presentes em meio ao microambiente tumoral apenas de maneira secundária, residual. No LHPLN, já foi identificada a expressão da quimiocina CXCL13 (do inglês, *C-X-C motif ligand 13*), responsável pela quimioatração de células B, demonstrada em um subgrupo de casos. De maneira similar, linfócitos B e T expressando outros marcadores relacionados ao centro germinativo já foram descritos como associados ao LHPLN, ainda que não tenha sido identificadas diferenças clínicas em pacientes com agrupamentos de linfócitos T CD4+ do tipo folicular, como reportado por NATHWANI et al. (2013). Considerando-se a composição do microambiente tumoral, possivelmente existe um papel mais preponderante dos linfócitos B no LHPLN do que no LHC, exceto em relação ao subtipo rico em linfócitos, que também possui grande quantidade de linfócitos B associados (MONTES-MORENO 2011; NATHWANI et al. 2013; VISSER et al. 2016).

O recrutamento de eosinófilos para o microambiente tumoral decorre da secreção de fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos, IL-5, IL-9, CCL5 e CCL28 (do inglês, *C-C motif ligand 28*; CCL28) pelas células de Reed-Sternberg. Os eosinófilos contribuem para a patogênese do LHC pela secreção de fator de crescimento transformador beta (do inglês, *transforming growth factor beta*; TGFB) e expressão do ligante do CD30 (CD30L), que estimula a sinalização nas células de Reed-Sternberg. A secreção de CCL5 pelas células de Reed-Sternberg atrai eosinófilos, linfócitos T CD4+ e mastócitos, os quais também expressam CD30L. Os mastócitos

podem contribuir para o crescimento tumoral por facilitar a angiogênese e remodelação dos tecidos (SCHMITZ et al. 2009).

Macrófagos são células mononucleares da linhagem fagocítica com diversidade de funções, que contribuem sobremaneira para a resposta imune, participando, inclusive, na ligação entre as respostas imune de tipo inata e adaptativa. De acordo com sua participação na resposta adaptativa, eles podem ser classificados como ativados pela via clássica, quando envolvido nas respostas dos linfócitos T auxiliares CD4⁺ do tipo 1 (do inglês *T helper cell type 1*, Th1). Esta população é ativada por interferon-gama, sendo caracterizada pela elevada expressão do MHC-II, expressão de IL-12 e fator de necrose tumoral alfa (do inglês, *tumoral necrosis factor alfa*; TNF α), geração de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, com consequente capacidade de destruir agentes patogênicos. Em contraste, os macrófagos classificados como ativados pela via alternativa diferenciam-se em resposta a IL-4 e IL-13 e estão envolvidos em respostas dos linfócitos Th2, incluindo imunidade humoral e reparo tecidual.

Outra população é a de células dendríticas apresentadoras de antígeno que são um ramo da linhagem fagocítica mononuclear. Além dessas, existem também outras populações de macrófagos envolvidos no desenvolvimento de tecido e homeostase, que em grande parte são regulados pelo fator estimulador de colônias e que não se enquadram facilmente nessas categorias imunológicas (WYNN et al. 2013).

Há evidências clínica e experimental de que macrófagos podem promover iniciação e progressão do câncer. Durante a iniciação do tumor,

macrófagos criam um ambiente inflamatório mutagênico e promotor de crescimento. Com a progressão, os macrófagos estimulam a angiogênese, intensificam a migração de células tumorais e suprimem a atividade antitumoral. Em sítios metastáticos, macrófagos preparam o tecido-alvo para a chegada das células tumorais. Em seguida, uma subpopulação diferente de macrófagos promove o extravasamento de células do tumor, sobrevivência e crescimento subsequente (CONDEELIS e POLLARD 2006).

Em uma metanálise, foi relatado que mais de 80% dos estudos mostram uma correlação entre densidade de macrófagos e um pior prognóstico dos pacientes. Esses dados foram avaliados em tumores sólidos (câncer de pulmão, tireóide e carcinoma hepatocelular) e também em linfoma folicular (QIAN e POLLARD 2010). Estudos recentes têm mostrado que no LHC um aumento no número de macrófagos associado ao tumor (do inglês, *tumor-associated macrophages*; TAM) está relacionado a um pior prognóstico e diminuição da sobrevida (STEIDL et al. 2010; GOTTI et al. 2017). Alguns autores demonstraram que a avaliação de macrófagos por CD163 pode apresentar resultados distintos no que diz respeito à predição de prognóstico, sendo CD163 um melhor biomarcador prognóstico do que CD68 (KLEIN et al. 2014). Entretanto, AZAMBUJA et al. (2012) avaliaram TAM através da expressão de CD68 e CD163, não tendo encontrado qualquer relação significativa entre número de macrófagos e sobrevida livre de doença ou sobrevida câncer específica (SCE), idade, estadiamento ou variáveis ligadas ao IPS.

1.4 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Apenas dados limitados encontram-se disponíveis sobre LHPLN no Brasil. Além disso, a constituição do microambiente imune tumoral do LHPLN foi explorada apenas de maneira pontual na literatura com relação aos padrões imunoarquiteturais. Ademais, há escassos dados sobre a relação destes parâmetros com outros fatores clínicos na avaliação prognóstica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se padrões imunoarquiteturais e microambiente celular tumoral do LHPLN possuem impacto clínico, sobretudo em relação ao prognóstico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.** Descrever características clínicas e padrões imunoarquiteturais associadas a uma coorte retrospectiva de LHPLN;
- 2.** Caracterizar células inflamatórias não neoplásicas do microambiente tumoral, considerando os padrões imunoarquiteturais do LHPLN;
- 3.** Avaliar características clínicas e imunofenotípicas do LHPLN em relação à sobrevida livre de progressão (SLP), buscando identificar possíveis biomarcadores prognósticos;
- 4.** Definir os melhores parâmetros para avaliação digital do microambiente celular tumoral em LHPLN, com base na estimativa visual.

3 METODOLOGIA

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi submetido como um dos planos de trabalho do projeto departamental “Estudo do microambiente tumoral em linfoma de Hodgkin predominância linfocitária nodular nas regiões nordeste e sudeste do Brasil”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center, sob número 2084/2015. (Anexo 1)

3.2 CARACTERÍSTICAS DO ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional analítico do tipo coorte retrospectivo, realizado no A.C.Camargo Cancer Center, centro de referência oncológica no Brasil, sobretudo dentro do estado de São Paulo. Pela falta de informações específicas sobre LHPLN em nosso meio, bem como baixa frequência na população, foram incluídas no estudo observações descritivas, principalmente relacionadas aos dados clínicos e evolutivos.

3.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

A partir da revisão dos prontuários, foram identificados pacientes acompanhados no A.C.Camargo Cancer Center no período de 1986 a 2016, sem restrição quanto a sexo ou idade, tendo sido selecionados para o estudo os que respeitaram os critérios de inclusão descritos a seguir.

3.3.1 Critérios de inclusão

Os pacientes foram incluídos no grupo de acordo com as informações e/ou amostra(s) disponível(is) para avaliação. Assim, para as observações descritivas, foram incluídos todos os pacientes com laudo confirmatório de diagnóstico histopatológico de LHPLN emitido pelo Departamento de Anatomia Patológica (DAP) do A.C.Camargo Cancer Center e/ou acompanhamento clínico no período do estudo. Para as observações analíticas, foram incluídos apenas pacientes com lâminas de hematoxilina e eosina (HE) e respectivas lâminas de imuno-histoquímica (IHQ) ou com bloco(s) de parafina disponível(is) para confecção de novas lâminas de HE e IHQ referentes às amostras selecionadas de LHPLN para confirmação diagnóstica. Para a confecção de *tissue microarray* (TMA), foram incluídos apenas pacientes com bloco(s) de parafina disponível(is). Tanto amostras obtidas anteriormente ao tratamento inicial, quanto amostras obtidas após recidivas foram incluídas no estudo, mesmo quando não pareadas.

3.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos os pacientes com diagnóstico de LHPLN sem confirmação pelo DAP, assim como os que possuíam amostra disponível para revisão histopatológica, mas que tiveram outro diagnóstico que não LHPLN. Foram excluídos das observações analíticas de SCE os pacientes que possuíam outra neoplasia. Foram excluídos da confecção do TMA pacientes cuja(s) amostra(s) poderia(m) ter algum prejuízo ou esgotamento do(s) bloco(s) de parafina.

3.4 DADOS CLÍNICOS OBTIDOS DE PRONTUÁRIOS

Dados clínicos relevantes como idade, sexo, estágio ao diagnóstico, tratamento realizado e *status* quanto à remissão completa, recidiva e óbito, dentre outros, foram obtidos dos prontuários dos pacientes, através de acesso a partir da rede interna do A.C.Camargo Cancer Center, via sistema Recruit, após registro de usuário e senha pessoal e intransferível, com base no Apêndice 1. A consulta aos prontuários foi realizada assegurando confidencialidade, privacidade, proteção da imagem e não estigmatização dos pacientes.

3.5 RESGATE DE LÂMINAS E BLOCOS DE PARAFINA

Os pacientes que preencheram os critérios de seleção tiveram suas amostras referentes às lâminas de HE e IHQ, além do(s) bloco(s) de parafina solicitados ao arquivo do DAP do A.C.Camargo Cancer Center.

3.6 CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Os casos selecionados para o estudo tiveram os seus cortes inteiros revistos por dois patologistas (LL e JV). Os critérios para classificação diagnóstica foram os mesmos estabelecidos pela OMS para LHPLN (POPPEMA et al. 2008). Todas as amostras submetidas a revisão histopatológica foram ainda subclassificadas quanto ao padrão imunoarquitetural (FAN et al. 2003), de maneira conjunta pelos dois patologistas (LL e JV), conforme esquematizado na Figura 1. Os padrões A e B foram considerados como típicos, enquanto os padrões C, D, E e F foram considerados variantes atípicas para LHPLN.

Os padrões imunoarquiteturais foram considerados como predominantes quando presentes em mais de 50% da área avaliada e como secundários quando presentes em mais de 10%, contudo, menos de 50% da área avaliada. As combinações dos padrões imunoarquiteturais predominante com ou sem secundário(s) de LHPLN foram categorizadas como: padrões típicos exclusivos (A e B, exclusivos ou associados entre si); padrões típicos predominantes (A ou B predominante, associado a C, D, E e/ou F

secundário(s)); variantes atípicas predominantes (C, D, E ou F predominante, associado a A e/ou B secundário(s)); variantes atípicas exclusivas (C, D, E ou F, exclusivos ou associados entre si). Essas combinações foram, ainda, agrupadas como padrões típicos exclusivos ou predominantes e variantes atípicas exclusivas ou predominantes para análises de SLP. Além desses, foram considerados os seguintes agrupamentos dos padrões para análise de SLP= quanto ao tipo dos padrões: típicos (A e B, exclusivos ou associados entre si) e variantes atípicas (C, D, E e F, exclusivos, associados entre si ou aos demais padrões); quanto à morfologia dos padrões: nodulares (A, B, C e D, exclusivos ou associados entre si) e difusos (E e F, exclusivos ou associados entre si ou aos demais padrões); quanto ao microambiente dos padrões: rico em células B (A, B, C e F, exclusivos ou associados entre si) e rico em células T (D e E, exclusivos, associados entre si ou aos demais padrões), como demonstrado no Quadro 1.

Quadro 1 - Agrupamentos realizados para curvas de SLP e testes estatísticos com base nas características dos padrões imunoarquiteturais.

Característica	Agrupamento realizado	Padrões imunoarquiteturais
Tipo	Típico	A e/ou B exclusivos
	Variante atípica	C, D, E e F exclusivos ou associados aos demais
Combinações	Típico exclusivo ou predominante	A e/ou B exclusivos ou predominantes
	Variante atípica exclusiva ou predominante	C, D, E e/ou F exclusivos ou predominantes
Microambiente	Rico em células B	A, B, C e/ou F exclusivos
	Rico em células T	D e E exclusivos ou associados aos demais
Morfologia	Nodular	A, B, C e/ou D exclusivos
	Difusa	E e F exclusivos ou associados aos demais

3.7 CONFEÇÃO DO TMA

Para confecção do TMA foram utilizadas amostras referentes aos blocos de parafina recuperados do arquivo do DAP do A.C. Camargo Cancer Center dos pacientes incluídos no estudo. A partir da avaliação dos pesquisadores (LL e JV), foram selecionadas duas áreas de aproximadamente 1,0mm², consideradas adequadas e representativas dos padrões imunoarquiteturais presentes em cada amostra, preferencialmente sem necrose, fibrose ou calcificação. As áreas selecionadas foram marcadas na lâmina e no bloco de parafina correspondentes e identificadas como 1 e 2 para a construção do TMA. Essas áreas foram classificadas quanto ao padrão que havia sido representado por um dos patologistas (LL), tendo as dúvidas sendo avaliadas por ambos os patologistas (LL e JV). Utilizou-se o Beecher MT1 *manual arrayer* (Beecher Instruments, Silver Spring, Silver Spring,

Maryland, Estados Unidos da América) para a confecção do TMA, tendo sido construída uma matriz com amostras de tumor medindo aproximadamente 1,0mm de diâmetro cada.

3.8 REALIZAÇÃO DE REAÇÕES IMUNOISTOQUÍMICAS

Para confecção das lâminas de imunoistoquímica, utilizou-se o seguinte protocolo: 1) cortes histológicos obtidos dos blocos de parafina de amostras ou TMA através de micrótomos, com espessura de 3µm; 2) secagem em estufa a 37,5°C por 6 horas; 3) desparafinização em solução de EZ PREP; 4) recuperação antigênica através de calor em solução CC1 com pH alto a 96°C em tempo padronizado para cada anticorpo, com respectivas especificações detalhadas no Quadro 2; 5) bloqueio da peroxidase endógena por 5 minutos, utilizando o reagente de bloqueio de peroxidase (H₂O₂, 3%) *ultraView Universal diaminobenzidine (DAB) inhibitor*; 6) passagens em soluções tampão de lavagem; 7) incubação com anticorpo primário com tempo previamente padronizado, conforme especificado no Quadro 2; 8) passagens em soluções tampão de lavagem; 9) incubação com polímero HRP *Multimer* com subseqüentes lavagens em solução tampão; 10) incubação com cromógeno DAB; 11) passagens em soluções tampão de lavagem; 12) contra coloração com hematoxilina II, lavagem em água com detergente para retirada do *liquid coverslip*, seguida de lavagem em água corrente e destilada; 13) passagem em xilol, álcool e montagem. Os anticorpos foram selecionados para identificação de populações/subpopulações celulares características:

CD20 (células linfo-histiocíticas e outros linfócitos B), CD3 (linfócitos T), CD4 (linfócitos T CD4+), CD8 (linfócitos T CD8+), CD57 (linfócitos T/células NK com diferenciação terminal), CD56 (células NK, alguns linfócitos CD8+), Granzima B (linfócitos CD8+), Perforina (linfócitos T CD8+), CD25 (linfócitos Treg), FOXP3 (linfócitos Treg), CD21 (células dendríticas foliculares), CD23 (células dendríticas foliculares e menor proporção de linfócitos B), CD68 (macrófagos M1 e M2), CD163 (macrófagos predominantemente M2), S100 (células dendríticas interdigitantes), CD1a (células de Langerhans), CD117 (mastócitos), CD138 (plasmócitos e linfócitos B com diferenciação plasmocitária terminal) e CD15 (granulócitos, sobretudo neutrófilos e eosinófilos fora da medula óssea).

Quadro 2 - Anticorpos utilizados para reações imuno-histoquímicas.

Anticorpo	Fabricante	Clone	RA	Diluição	AC	Kit detecção
CD20	VENTANA	L26	36'	ready to use	32'	UltraView Universal DAB Kit
CD3	VENTANA	2GV6	20'	ready to use	32'	UltraView Universal DAB Kit
CD4	VENTANA	SP35	36'	ready to use	32'	UltraView Universal DAB Kit
CD8	VENTANA	SP57	36'	ready to use	32'	UltraView Universal DAB Kit
CD56	CELL MARQUE	MRQ-42	36'	ready to use	32'	UltraView Universal DAB Kit
CD57	CELL MARQUE	NK-1	36'	ready to use	32'	UltraView Universal DAB Kit
GRANZIMA B	CELL MARQUE	POLICLONAL	36'	ready to use	32'	UltraView Universal DAB Kit
PERFORINA	CELL MARQUE	MRQ-23	92'	ready to use	48'	UltraView Universal DAB Kit
S100	VENTANA	POLICLONAL	36'	ready to use	32'	UltraView Universal DAB Kit
CD68	VENTANA	KP-1	36'	ready to use	32'	UltraView Universal DAB Kit
CD163	VECTOR LAB	10D6	30'	1/50	32'	OptiView Universal DAB kit
FOXP3	ABCAM	236A/E7	64'	1/100	32'	UltraView Universal DAB Kit
CD25	CELL MARQUE	4C9	92'	ready to use	68'	UltraView Universal DAB Kit
CD138	CELL MARQUE	B-A38	36'	ready to use	32'	OptiView Universal DAB kit
CD1a	CELL MARQUE	EP3622	36'	ready to use	32'	OptiView Universal DAB kit
CD21	CELL MARQUE	2G9	64'	ready to use	60'	OptiView Universal DAB kit
CD23	VENTANA	SP23	36'	ready to use	32'	OptiView Universal DAB kit
CD117	VENTANA	9.7	64'	ready to use	32'	OptiView Universal DAB kit

RA: tempo de recuperação antigénica; AC: tempo de incubação no anticorpo primário.

As reações de IHQ histoquímicas foram realizadas no departamento de patologia do A.C.Camargo Cancer Center, que conta com infraestrutura e pessoal habilitado para tanto, sendo os resultados interpretados por um dos patologistas envolvidos no estudo (LL).

3.9 ANÁLISE DAS REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS DO TMA

As lâminas de IHQ do TMA foram analisadas através de estimativa visual de um patologista (LL), bem como através do ImageScope®, versão 11.2.0.780 (ImageNav 11.02.780; Viewport 12.0.6 / 12.0.14), programa de análise de digital em patologia, associado ao sistema de digitalização de lâminas APERIO ScanScope XT® (Leica Biosystems, *Buffalo Grove, Illinois*, Estados Unidos da América). As amostras com representação inferior a 50% da área esperada no TMA não foram consideradas nas análises.

Foram utilizados os algoritmos de membrana (“IHC Membrane v1”) e núcleo (“IHC Nuclear v1”), disponíveis no Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) para análise digital pelo ImageScope®, com a utilização dos parâmetros listados nos Quadros 3 e 4, respectivamente. Os algoritmos de membrana e núcleo foram modificados a partir dos valores originais de maneira que o maior número de células fosse contado por TMA, com base na comparação visual do *markup*. O algoritmo de membrana foi utilizado para avaliação de CD20, CD3, CD4, CD8, CD56, CD57, CD25, CD68 e CD163. O algoritmo de núcleo foi utilizado para avaliação de FOXP3 e S100.

Foram obtidos percentuais referentes aos marcadores categorizados como escore 3+ 2+ 1+ e 0 no ImageScope®. Considerou-se a estimativa visual como método padrão-ouro da avaliação dos marcadores de população/subpopulação celular, haja vista que este é o método convencional para identificação de características diagnósticas e prognósticas na prática rotineira da patologia. Os resultados obtidos a partir das leituras realizada pelo ImageScope® foram categorizados como 1+ 2+, 3+ 2+/3+ (positividade forte) e 1+/2+/3+ (positividade total), sendo as duas últimas categorias calculadas com base nos somatórios dos valores para 2+ e 3+ e 1+ 2+ e 3+ fornecidos pelo ImageScope®, respectivamente. Estes agrupamentos foram realizados com base no sentido biológico da expressão dos marcadores pelas células imunes a serem avaliadas, afinal, os marcadores estão associados às linhagens celulares independentemente da sua intensidade de expressão.

Quadro 3 - Parâmetros utilizados no algoritmo do ImageScope® para avaliação de marcação membranar.

Parâmetro	Especificação	Parâmetro	Especificação
Classifier neighborhood	0	Max cell radius (um)	5
Classifier	None	Min cell size (um ²)	30
Class list		Max cell size (um ²)	2000
Averaging radius (um)	1	Min cell roundness	0,1
Blue curvature threshold	1	Min cell compactness	0,1
Threshold type	Edge threshold method	Min cell elongation	0,1
Lower blue threshold	0	Background threshold	240
Upper blue threshold	220	Weak (1+) threshold	200
Min nuclear size (um ²)	1	Moderate (2+) threshold	170
Max nuclear size (um ²)	2000	Strong (3+) threshold	105
Min nuclear roundness	0,1	Completeness threshold	50
Min nuclear compactness	0	Use mode	Analysis/tuning
Min nuclear elongation	0,1	Mark-up image type	Analysis
Cytoplasmic correction	Yes	Classifier type	IHCmembrane
Cell/nucleus requirement	All cells	Classifier definition file	IHC_membrane_training

Quadro 4 - Parâmetros utilizados no algoritmo do ImageScope® para avaliação de marcação nuclear.

Parâmetro	Especificação	Parâmetro	Especificação
Classifier neighborhood	0	Nuclear stain (red)	0,696858
Classifier	None	Nuclear stain (green)	0,643073
Class list		Nuclear stain (blue)	0,317563
Averaging radius (um)	1	Positive stain (red)	0,244583
Curvature threshold	2,5	Positive stain (green)	0,509334
Segmentation type		Positive stain (blue)	0,825081
Threshold type	Edge threshold method	3rd stain (red)	0
		3rd stain (green)	0
		3rd stain (blue)	0
Edge trimming	Weighted	Cytoplasmic intensity threshold	230
Lower threshold	0	Weak (1+) threshold	210
Upper threshold	230	Moderate (2+) threshold	188
Min nuclear size (um^2)	1	Strong (3+) threshold	162
Max nuclear size (um^2)	1000000	Black threshold	0
Min nuclear roundness	0,1	Use mode	Analysis/tuning
Min nuclear compactness	0	Mark-up image type	Analysis
Min nuclear elongation	0,1	Classifier type	IHCNuclear
Remove light objects	0	Classifier definition file	IHC_nuclear_training
Clear area intensity	240		

Além disso, tanto para os linfócitos B e T, respectivamente avaliados por CD20 e CD3, quanto para os linfócitos T CD4+ e T CD8+, consideraram-se os parâmetros com melhor coeficiente de correlação intraclass (CCI) para cada um dos marcadores, tendo sido realizada proporção entre esses parâmetros para definição em relação a um valor proporcional, a partir de uma média ponderada, cujo somatório (CD20 + CD3 e CD4 + CD8) correspondesse a 100%.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.10.1 Avaliação e categorização das células do microambiente tumoral

Para a análise por estimativa visual, foram contados os neutrófilos, eosinófilos, ambos confirmados através de CD15, assim como plasmócitos e

mastócitos, estes dois confirmados através da avaliação de CD138 e CD117, respectivamente. Para os demais marcadores de linfócitos (CD20, CD3, CD4, CD8, CD25, FOXP3, CD56 e CD57), macrófagos (CD68 e CD163) e células dendríticas interdigitantes (S100 e CD1a) foram realizados cortes a cada 5% do percentual expresso em cada área do TMA. Na estimativa visual, considerou-se a média ponderada do percentual dos marcadores CD20/CD3 e CD4/CD8 para estimar o total de linfócitos B/T e T CD4+/T CD8+, respectivamente, presentes nas amostras do TMA, sendo o somatório dos valores ponderados correspondente a 100%. De maneira similar, foram atribuídos percentuais ponderados estimados visualmente das células dendríticas interdigitantes, observadas através da expressão de S100, às morfologias estrelada e arredondada de maneira tal que a soma dos mesmos totalizasse 100%.

Utilizou-se a média aritmética entre as áreas identificadas como 1 e 2 de cada amostra selecionada, exceto para os casos em que apenas uma das áreas estava disponível para avaliação, quando apenas a área preservada foi utilizada. Os marcadores CD56, FOXP3 e CD25 apresentaram percentuais por estimativa visual muito baixos, tendo sido observada expressão igual ou inferior a 15% nas amostras avaliadas. Por isso, foram categorizados como 0 para ausência de expressão, 1 para expressão igual ou inferior a 5%, 2 para expressões entre acima de 5% e menor ou igual a 10% e 3 para expressões acima de 10%, para realização dos cálculos estatísticos. Ainda assim, ressalta-se que a avaliação percentual foi mantida para o cálculo do coeficiente de correlação intraclasse (CCI). Para as análises dicotômicas, considerou-se CD56 e CD57 entre 0 e $\leq 5\%$ e $> 5\%$ a $\leq 10\%$, enquanto CD25 e

FOXP3 foram avaliados como ausente e presente (qualquer percentual acima de 0), com base na distribuição dos casos conforme os marcadores. Para os marcadores CD68 e CD163 foram considerados por pontos de corte de 5% e 25%, com base na literatura a respeito de TAM em LH, para o cálculo da SLP. Foram, ainda, definidos os pontos de corte com base na mediana para CD68, CD163, CD4/CD8 e S100.

A avaliação dos agrupamentos por tipo, combinação, microambiente e morfologia dos padrões imunoarquiteturais foi realizada com base apenas no padrão imunoarquitetural representado no TMA, não levando em conta o padrão imunoarquitetural observado no corte inteiro, que poderia ser distinto do mesmo.

3.10.2 Avaliação dos parâmetros clínicos e sobrevidas

Os pacientes foram agrupados por idade com ponto de corte em 45 anos, haja visto este ser um fator prognóstico já reconhecido (VASSALLO et al. 2005; NOGOVÁ et al. 2008). Considerou-se o tipo de estágio como avançado para pacientes em estágio superior ao IIB ou quando em qualquer estágio se associado à presença de *bulky*, sendo os demais estágios considerados como precoces. Alguns pacientes com *bulky* $\geq 7,0$ cm foram tratados de maneira diferente no A.C.Camargo Cancer Center, com estágios avançados, tendo sido, portanto, agrupados desta forma. Resposta completa foi considerada de acordo com os métodos disponíveis em cada época nos prontuários (exame clínico, cintilografia com Gálio-67, tomografia computadorizada, tomografia de emissão de pósitrons e/ou exames anátomo-patológicos). Progressão foi considerada como aumento do volume tumoral

após início do tratamento, que necessitasse mudança de tratamento ou acréscimo de tratamento adicional, antes do registro de remissão completa. Recidiva foi considerada quando aumento do volume tumoral foi detectado após registro de remissão completa. Apenas os óbitos por LHPLN foram considerados como mortalidade específica. Foram considerados para o cálculo da SLP todos os três eventos: progressão, recidiva e óbito.

O cálculo da SLP foi baseado em HARTMANN et al. (2013), segundo informações conseguidas após contato com o autor responsável pelas estatísticas do trabalho, conforme Apêndice 2. A única diferença neste cálculo foi a data inicial, que foi considerada como a data do início do tratamento ao invés da data do estadiamento, uma vez que esta informação não era precisa nos prontuários médicos. Ressalta-se que diferença de tempo entre a data do diagnóstico e o início do tratamento foi curta (média: 3 meses e mediana: 2 meses). O seguimento foi realizado até 01/06/2017. Os escores prognósticos 1 a 7 foram calculados de acordo com a somatória dos pontos atribuídos a cada parâmetro envolvido, conforme definido na Tabela 1.

Os escores prognósticos foram criados com base em fatores prognósticos já publicados na literatura, que foram levantados dentre as informações clínicas do presente estudo, assim como com base nos agrupamentos de padrões realizados.

Tabela 1 - Cálculo dos escores prognósticos.

Variável	Parâmetro utilizado	Classificação do parâmetro	Pontos	Escore	
Variável 1	Gênero	Feminino	0	Escore 1	Variáveis 1 + 2 + 3 (somatório)
		Masculino	2		
Variável 2	Grupo etário	< 45 anos	0		
		≥ 45 anos	1		
Variável 3	Tipo de padrão imunoarquitetural	Típico	0	Escore 2	Variáveis 1 + 2 + 3 + 4 (somatório)
		Variante atípica	1		
Variável 1	Gênero	Feminino	0		
		Masculino	2		
Variável 2	Grupo etário	< 45 anos	0	Escore 3	Variáveis 1 + 2 + 3 (somatório)
		≥ 45 anos	1		
Variável 3	Tipo de padrões imunoarquiteturais	Típico	0		
		Variante atípica	1		
Variável 4	Tipo de estágio ao diagnóstico	Precoce	0	Escore 4	Variáveis 1 + 2 + 3 + 4 (somatório)
		Avançado	1		
Variável 1	Gênero	Feminino	0		
		Masculino	2		
Variável 2	Grupo etário	< 45 anos	0	Escore 5	Variáveis 1 + 2 + 3 (somatório)
		≥ 45 anos	1		
Variável 3	Combinação de padrões imunoarquiteturais	Exclusivamente ou predominantemente típicos	0		
		Exclusivamente ou predominantemente variantes atípicas	1		
Variável 1	Gênero	Feminino	0	Escore 6	Variáveis 1 + 2 + 3 + 4 (somatório)
		Masculino	2		
Variável 2	Grupo etário	< 45 anos	0		
		≥ 45 anos	1		
Variável 3	Combinação de padrões imunoarquiteturais	Exclusivamente ou predominantemente típicos	0	Escore 7	Variáveis 1 + 2 + 3 + 4 + 5 (somatório)
		Exclusivamente ou predominantemente variantes atípicas	1		
Variável 4	Tipo de estágio ao diagnóstico	Precoce	0		
		Avançado	1		
Variável 1	Gênero	Feminino	0	Escore 8	Variáveis 1 + 2 + 3 + 4 + 5 (somatório)
		Masculino	2		
Variável 2	Grupo etário	< 45 anos	0		
		≥ 45 anos	1		
Variável 3	Tipo de estágio ao diagnóstico	Precoce	0	Escore 9	Variáveis 1 + 2 + 3 + 4 + 5 (somatório)
		Avançado	1		
Variável 4	Combinação de padrões imunoarquiteturais	Exclusivamente ou predominantemente típicos	0		
		Exclusivamente ou predominantemente variantes atípicas	1		
Variável 5	Microambiente de padrões	Rico em células B	0	Escore 10	Variáveis 1 + 2 + 3 + 4 + 5 (somatório)
		Rico em células T	1		
Variável 1	Gênero	Feminino	0		
		Masculino	2		
Variável 2	Grupo etário	< 45 anos	0	Escore 11	Variáveis 1 + 2 + 3 + 4 + 5 (somatório)
		≥ 45 anos	1		
Variável 3	Tipo de estágio ao diagnóstico	Precoce	0		
		Avançado	1		
Variável 4	Combinação de padrões imunoarquiteturais	Exclusivamente ou predominantemente típicos	0	Escore 12	Variáveis 1 + 2 + 3 + 4 + 5 (somatório)
		Exclusivamente ou predominantemente variantes atípicas	1		
Variável 5	Microambiente de padrões	Rico em células B	0		
		Rico em Células T	1		

3.10.3 Tabulação de dados, análises descritas e testes estatísticos

Para tabulação dos dados, utilizou-se o programa *Excel* do pacote *Microsoft Office*, versão 2016. Intervalos de tempo foram calculados através da diferença entre datas, com resultado em dias dividido por 30,5 para meses ou dividido por 364,8 para anos, com base nos seguintes parâmetros: data de nascimento e data do diagnóstico inicial para idade ao diagnóstico, data do diagnóstico inicial e data da última consulta para tempo de seguimento, data da início do tratamento até data de progressão, recidiva ou óbito para SLP em 10 anos, data do início do tratamento e data do óbito para tempo até o óbito em 10 anos, data da recidiva e data do óbito para tempo da recidiva até óbito em 10 anos.

Utilizou-se o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 24, para o cálculo das estatísticas descritivas e testes estatísticos realizados no presente estudo. As análises descritivas incluíram medidas de frequência, média, mediana e moda. Realizaram-se análises de associação através dos testes de qui-quadrado e exato de Fisher para variáveis categóricas. O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para análise de correlações. Confiabilidade da concordância entre variáveis contínuas foi avaliada através do CCI. O teste T de Student foi utilizado para comparação de variáveis contínuas dicotômicas com distribuição paramétrica. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparação de variáveis discretas dicotômicas ou contínuas com distribuição não-paramétrica. As curvas de SCE e SLP foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier com base no

status progressão e óbito por LHPLN. As limitações dos testes foram consideradas, bem como as premissas para a realização dos mesmos.

Os cálculos do CCI e seu respectivo IC95% foram realizados com base em classificação média, consistência e modelo aleatório de duas vias, tendo os resultados sido reportados segundo KOO e LI (2016). Foram adotados erro $\alpha=5\%$ e IC95% para os testes estatísticos.

4 RESULTADOS

Dos 74 pacientes selecionados para o estudo a partir dos prontuários com diagnóstico de LHPLN, menos de um quarto (17/74) não possuía material (lâminas e/ou blocos) disponível para revisão diagnóstica (Figura 2). Dos 57 que puderam ser revisados, mais 90% tiveram diagnóstico de LHPLN confirmado (52/57), através de material referente apenas ao primário (40/52), apenas à(s) recidiva(s) (8/52) ou ao primário e à(s) recidiva(s) (4/52).

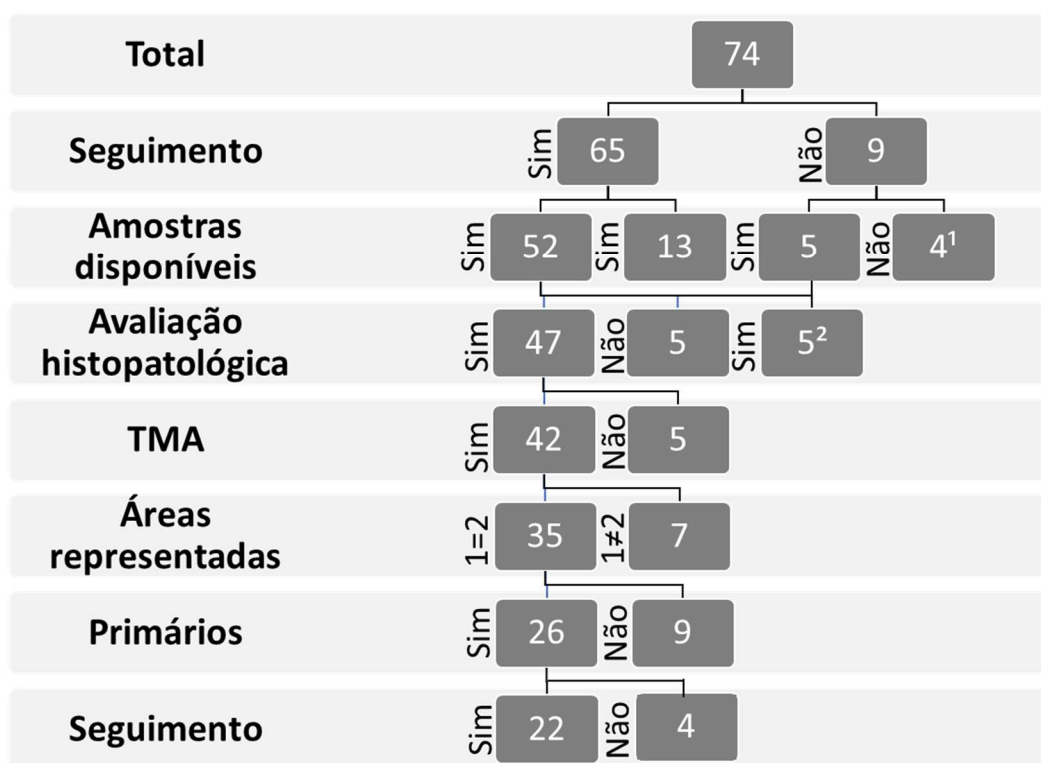


Figura 2 – Fluxograma das análises realizadas no estudo. ¹ Pacientes sem seguimento clínico no A.C.Camargo Cancer Center e sem amostras disponíveis para avaliação histopatológica, tendo sido excluídos. ² Pacientes com revisados, sem diagnóstico histopatológico compatível com LHPLN.

Apenas 5 casos foram reclassificados (8,8%), sendo estes considerados como LHC (2/5), linfoma folicular (1/5), linfoma da zona marginal nodal (1/5) e linfoma de células B de alto grau (1/5), todos excluídos do estudo.

4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Dos 69 pacientes incluídos nas análises das características clínicas, 65 possuíam amostras e/ou seguimento no A.C.Camargo Cancer Center. Cerca de 61% era do sexo masculino (39/64) e 39% era do sexo feminino (25/64), com razão entre os sexos masculino/feminino de 1,56. A distribuição da idade ao diagnóstico ocorreu de maneira normal, portanto, unimodal, com 62,5% dos pacientes entre 15 e 45 anos (40/64). Ressalta-se que mais de 78% encontrava-se abaixo dos 45 anos (50/64), contudo, apenas cerca de 15% abaixo dos 15 anos (9/64).

A média de idade foi de 32 (IC95%: 28 a 36) anos, variando entre 5 e 73 anos, enquanto a mediana foi de 31 anos. Houve média de 31 (IC95%: 26 a 37) e 33 (IC95%: 28 a 38) anos e mediana de 30 e 35 anos em relação aos sexos masculino e feminino (Figura 3), respectivamente, sem diferença estatisticamente significativa das médias entre os sexos ($p=0,603$). Para 12 de 69 pacientes as únicas informações clínicas disponíveis encontravam-se no laudo anátomo-patológico (17,4%). Houve seguimento de 61 pacientes no A.C.Camargo Cancer Center, com média de 81 meses e mediana de 64 meses, variando entre 1 e 421 meses ao longo de todo o período do estudo.

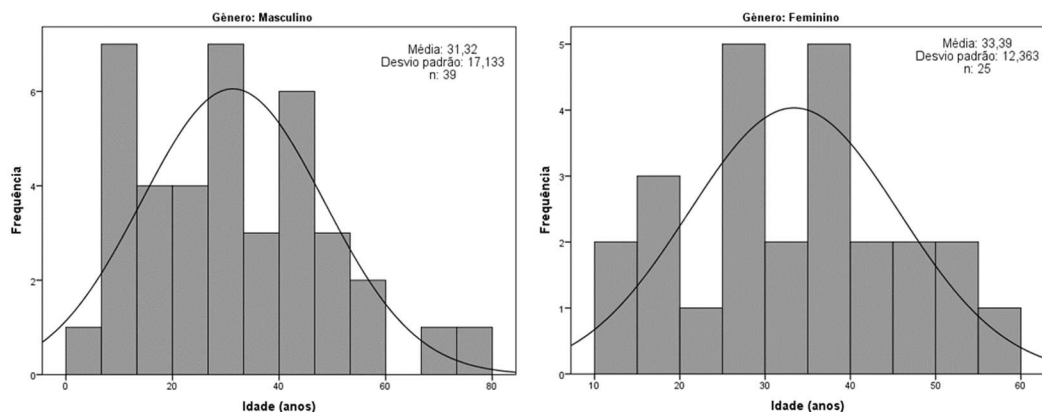


Figura 3 – Histogramas, com curva de distribuição normal para idade estratificada por gêneros. Masculino à esquerda (n= 39) e feminino à direita (n= 25).

Não houve diferença quando comparadas as médias de idade dos pacientes em relação ao tipo de estágio ao diagnóstico, gênero ou agrupamentos por tipo, combinações, morfologia ou microambiente dos padrões das amostras (Tabela 2). Além de não ter havido associação entre gênero e tipo de estágio ao diagnóstico ($p= 0,777$), não houve associação dessas variáveis com agrupamentos por tipo ($p= 0,738$ e $p= 0,084$, respectivamente), combinações ($p= 0,751$ e $p= 0,146$, respectivamente), microambiente ($p= 1,0$ e $p= 0,240$, respectivamente) ou morfologia ($p= 1,0$ para ambos) dos padrões.

Tabela 2 – Comparação da média de idade com relação a gênero, estágio e agrupamentos por tipo, combinação, microambiente e morfologia de padrões imunoarquiteturais. Valor de p referente a teste T de Student.

Parâmetro	Agrupamento	Idade	IC95%	Total	<i>p</i>
Gênero	Masculino	31,0	25,6-36,4	39	0,603
	Feminino	33,0	28,2-37,8	25	
Estádio	Precoce	33,5	28,3-38,7	38	0,549
	Avançado	31,0	25,6-36,4	19	
Tipo	Típico	34,0	24,9-43,1	15	0,664
	Variante atípica	31,5	25,7-37,3	28	
Combinação	Exclusivamente ou predominantemente típicos	32,0	25,8-38,2	27	0,933
	Exclusivamente ou predominantemente variants atípicas	32,0	23,9-40,1	16	
Microambiente	Rico em linfócitos B	32,0	25,6-38,4	27	0,815
	Rico em linfócitos T	33,0	25,2-40,8	16	
Morfologia	Nodular	29,0	23,1-34,9	30	0,054
	Difusa	40,0	32,7-47,3	13	

Dos 17 pacientes sem material disponível para revisão diagnóstica, apenas 4 (23,5%) não possuíam seguimento no A.C.Camargo Cancer Center. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre pacientes com material revisado e não revisado em relação a gênero ($p=0,169$), idade ($p=0,137$), grupo etário ($p=0,288$), tipo de estágio ($p=0,448$) e ocorrência de evento (progressão, recidiva ou óbito) ($p=0,687$), conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 – Comparação das características clínicas dos pacientes com material revisado e não revisado, referente a LHPLN.

Parâmetro		Revisão		p
		Sim	Não	
Gênero	Masculino	34 (65%)	6 (46%)	0,169
	Feminino	18 (35%)	7 (54%)	
Idade [média(IC95%)] anos		31 (27-35)	38 (31-45)	0,137 ¹
Grupo etário	< 45 anos	42 (81%)	9 (69%)	0,288
	≥ 45 anos	10 (19%)	4 (31%)	
Estádio	Precoce	30 (68%)	8 (62%)	0,448
	Avançado	14 (32%)	5 (38%)	
Evento	Não	25 (58%)	10 (83%)	0,1
	Sim	18 (42%)	2 (17%)	
Tempo de seguimento (meses)		30	32	0,687

¹ Valor de p referente a teste T de Student, sendo os demais referentes a teste exato de Fisher. Total de pacientes em cada grupo (sim e não) n (%).

Ainda assim, ressalta-se que dos 4 pacientes que não possuíam material para revisão, nem informações clínicas além das obtidas no laudo anátomo-patológico, 2 eram do sexo masculino e 2 eram do sexo feminino, com idades de 30, 39, 73 e 79 anos, havendo informação sobre o status de doença dos 2 mais novos, após 111 e 148 meses, um deles encontrava-se com LHPLN, enquanto o outro mantinha-se livre de LHPLN, respectivamente, ambos vivos. Esses 4 pacientes foram excluídos dos cálculos realizados no estudo, entretanto, os demais foram mantidos em virtude do diagnóstico prévio, bem como acompanhamento com características clínico-patológicas similares aos pacientes que tiveram confirmação através de revisão histopatológica.

Os pacientes (n= 57) foram diagnosticados em estádios I em 29,8%, II em 43,9%, III em 17,5% e IV em 8,8%, tendo sido observados sintomas B em

15,8%, infiltração esplênica em 5,3%, infiltração extranodal em 8,8%, *bulky* 10,5% (Tabela 4). Nenhum paciente apresentou infiltração de medula óssea ao diagnóstico (n= 43). Cerca de um terço dos pacientes foram diagnosticados em estádios avançados (19/57).

Tabela 4 - Estadiamento ao diagnóstico.

Ann Harbor	Massa	Extranodal	Baço	Sintomas B	Avançado		Total
					Não	Sim	
I	Não	Não	Não	Não Sim	15 2		17
II	Não	Não Sim	Não Não	Não	19	1 2 1	25
				Não	2		
	Sim	Não	Não Sim				
			Sim	Não			
III	Não	Não	Não	Não Sim		7 2	10
		Sim	Não	Não		1	
		IV	Não	Não Sim	Não Sim	Sim Não	
Sim	Não Sim			Não Sim		1 1	
Total					38	19	57

Pacientes com estágio superior a IIB ou com qualquer estágio associado a massa tumoral foram considerados como estádios avançados (n= 57).

Dentre os tratamentos de primeira linha (n= 55), foram realizados quimioterapia (QT) exclusiva (38,2%), radioterapia (RT) exclusiva (7,3%), QT+RT (47,3%), cirurgia exclusiva (1,8%) e QT seguida de transplante de medula óssea (TMO) (5,5%) (Tabela 5). Dos pacientes que fizeram QT (85,5%), 81,8% usaram ABVD (mediana de 4 ciclos) e 21,8% usaram outros regimes, com associação a Rituximabe em 12,7%. Dos 8 pacientes que foram submetidos a QT seguida de TMO, apenas 3 foram submetidos a esse tipo de

tratamento na primeira linha, sendo o restante correspondente a pacientes com recidivas, que precisavam de resgate. Essa modalidade terapêutica foi a escolha de mais de 40% dos casos de recidiva (5/12).

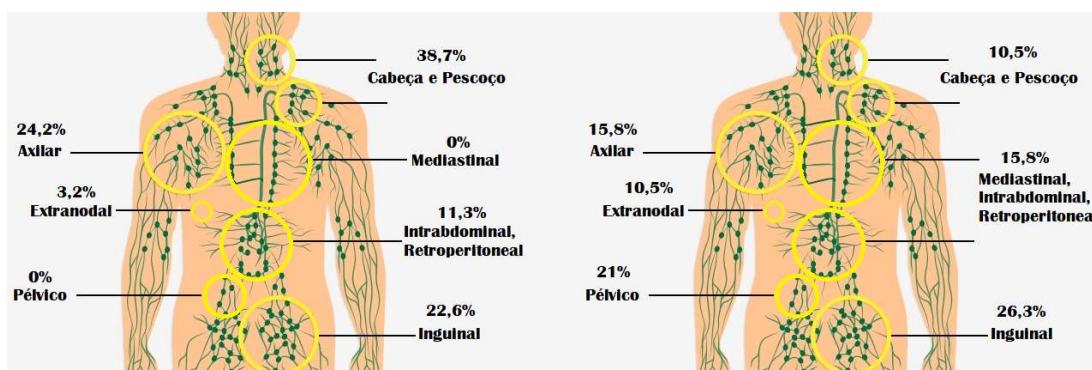
Tabela 5 – Tratamento de primeira linha realizados em pacientes com LHPLN, estratificados por estágio. (n= 55).

Tratamento	Avançado		Total
	Não	Sim	
Apenas cirurgia	1	0	1 (1,8%)
Apenas RT	4	0	4 (7,3%)
QT + RT	24	2	26 (47,3%)
Apenas QT	8	13	21 (38,2%)
QT + TMO	0	3	3 (5,5%)
Total	37	18	55

A média e a mediana de seguimento clínico dos pacientes incluídos no estudo (n= 59) foram de 79 (variando de 1 a 423, IC95%: 59,0-99,3) meses e 61 meses, respectivamente, com taxas de recidiva em 5 anos, 10 anos e durante todo o seguimento realizado de 16,4%, 20% e 21,8% (n= 55), respectivamente. Houve transformação para linfoma de alto grau 3,6% (n= 56) e 5,1% de óbito por LHPLN durante todo seguimento (n= 59). Ressalta-se que um dos pacientes que apresentou evidências de transformação para linfoma de alto grau encontrava-se em estágio avançado ao diagnóstico.

As amostras referentes ao diagnóstico primário foram obtidas das seguintes topografias: cabeça e pescoço (38,7%), região axilar (24,2%), região inguinal (22,6%), região retroperitoneal ou intrabdominal (11,3%) e extranodal (3,2%) (n=62). Doze pacientes apresentaram ao menos uma

recidiva durante todo o seguimento (21,8%), identificadas nas seguintes topografias: cabeça e pescoço (10,5%), região axilar (15,8%), região inguinal (26,3%), região pélvica (21%), regiões retroperitoneal, intrabdominal e mediastinal (15,8%) e extranodal (10,5%) (n= 19) (Figura 4). Dos 12 pacientes recidivados, 68,4% mantiveram-se livre de doença durante o seguimento após tratamento de resgate, com uma segunda recidiva identificada nos 31,6% restantes. Apenas 2 pacientes apresentaram uma terceira recidiva, tendo um deles transformado para linfoma de alto grau. Não foi identificado óbito associado ao LHPLN em nenhum dos casos recidivados.



Fonte: Adaptada de https://static.tuasaude.com/media/article/pt/fq/ganglios-linfaticos_25179_l.jpg

Figura 4 - Distribuição por topografia do diagnóstico primário e recidivas. Topografia de biópsias incisionais ou excisionais realizadas para diagnóstico primário (esquerda) e recidivas (direita) identificadas em biópsias incisionais, excisionais ou imagem.

A SLP em 5 e 10 anos foi de 62,4% (IC95%: 47,7% a 77,1%) e 56,7% (IC95%: 69,6% a 35,4%), respectivamente (Figura 5). Os tempos médio e mediano de seguimento foram 65 (IC95%: 53 a 77) e 63 (IC95%: 47 a 78) meses, respectivamente, nos primeiros 10 anos.

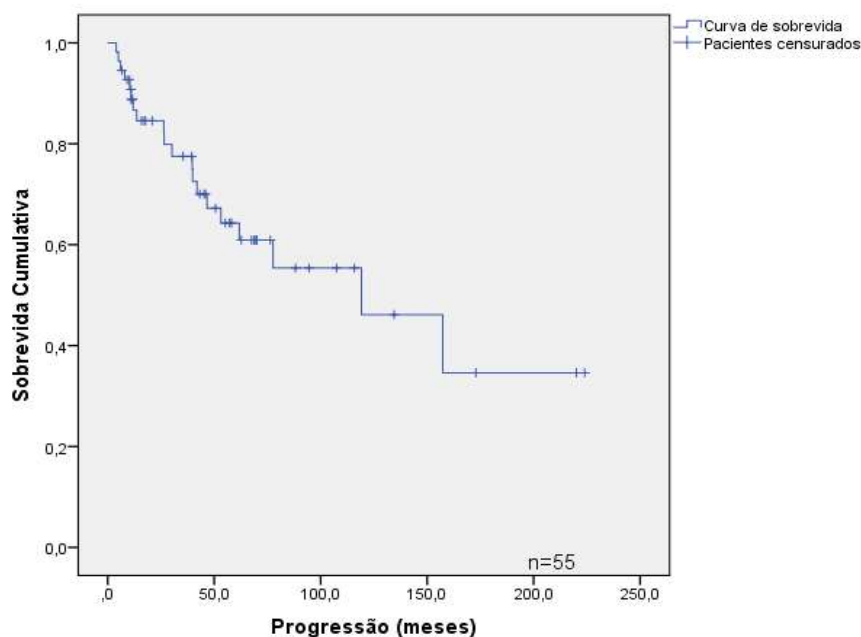


Figura 5 - Curva de SLP. (n= 55).

Observou-se uma segunda neoplasia associada em 10,3% dos casos (n= 6), tendo havido diagnóstico em 2 pacientes, anteriormente, e em 4 posteriormente ao diagnóstico de LHPLN (n= 58). A SCE foi de 95,5% (IC95%: 89% a 100%) em 5 e 10 anos (Figura 6). As duas mortes por LHPLN em pacientes sem uma segunda neoplasia ocorreram nos primeiros 2 anos após o diagnóstico, aos 11 e 15 meses. Os tempos médio e mediano de seguimento foram 58 (IC95%: 55 e 61) e 60 meses, respectivamente, nos primeiros 10 anos.

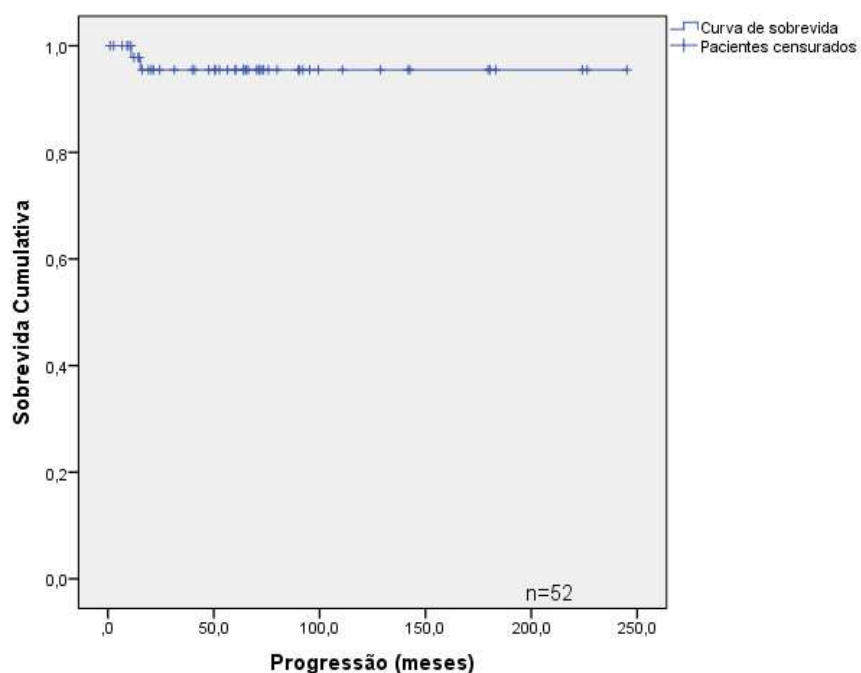


Figura 6 - Curva de SCE. (n= 52).

Nenhum dos pacientes que apresentou recidiva evoluiu para óbito durante o seguimento do estudo. Observou-se progressão da doença em 5 pacientes após o início do tratamento, tendo a progressão ocorrido entre 2 e 6 meses após o início do tratamento inicial, sem evidências de recidiva ou óbito após o tratamento de resgate instituído, com tempo de seguimento no estudo variou entre 11 e 180 meses. Não foram observados eventos (progressão, redidiva ou morte) após 80 meses até 120 meses.

4.2 CARACTERÍSTICAS IMUNOARQUITETURAIS

Todas as amostras foram revisadas por dois patologistas (LL e JV), sendo correspondentes 44 às primárias (78,6%) e 12 às recidivas (21,4%).

Seis padrões foram encontrados nas amostras avaliadas (Figura 7), com variação no que diz respeito às amostras primárias e recidivas (Tabela 6). Nas amostras primárias, observou-se apenas 1 padrão imunoarquitetural em 34,1%, 2 padrões em 54,5% e 3 padrões em 11,4%. Houve padrão predominante A em 9,1%, B em 54,6%, C em 4,5%, D em 22,7%, E em 0,0% e F em 9,1%, tendo sido atribuídos escore 1 em 34,2% 2 em 29,5%, 3 em 9,1% e 4 em 27,2% aos conjuntos de padrões encontrados em cada caso (Tabela 7).

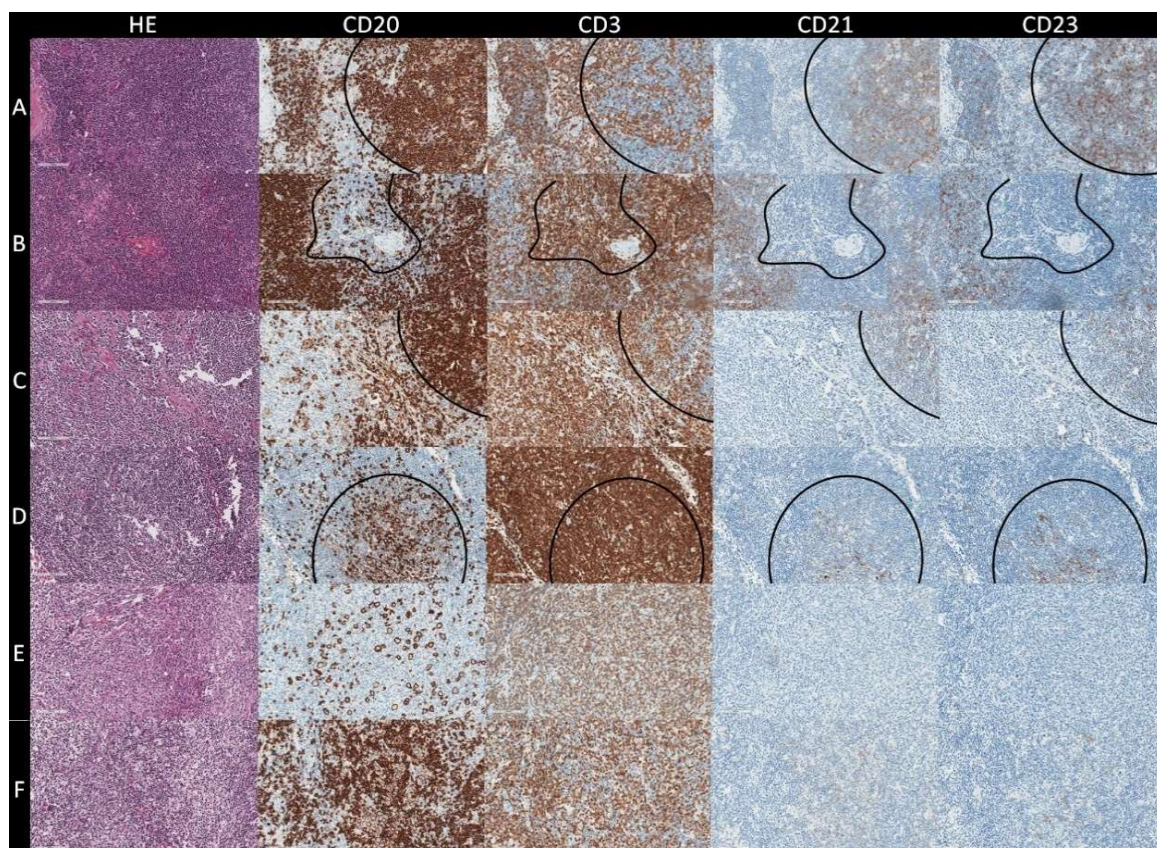


Figura 7 - Padrões imunoarquiteturais de LHPLN observados no estudo, representados de acordo com morfologia. (HE, 200x), CD20 (200x), CD3 (200x), CD21 (200x) e CD23 (200x). Contornos das áreas nodulares delimitados pelas linhas.

Tabela 6 - Comparação dos padrões predominantes de amostras primárias e recidivas.

Padrão	Primária	Recidiva
A	4 (9,1%)	4 (33,3%)
B	24 (54,6%)	4 (33,3%)
C	2 (4,5%)	1 (8,3%)
D	10 (22,7%)	1 (8,3%)
E	0 (0,0%)	2 (16,7%)
F	4 (9,1%)	0 (0,0%)
Total	44	12

Tabela 7 - Distribuição dos padrões predominante e secundário(s) nas amostras primárias.

		Secundário						Total
		A	B	C	D	E	F	
Predominante	A	1 (2,3%)	1 (2,3%)	2 (4,5%) ²	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	4 (9,1%)
	B	4 (9,1%)	9 (20,5%)	4 (9,1%)	3 (6,8%) ³	1 (2,3%)	3 (6,8%)	24 (54,6%)
	C	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (4,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (4,5%)
	D	0 (0,0%)	3 (6,8%) ¹	1 (2,3%)	2 (4,5%)	3 (6,8%)	1 (2,3%)	10 (22,7%)
	E	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	F	0 (0,0%)	1 (2,3%) ¹	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (6,8%)	4 (9,1%)
Total		5 (11,4%)	14 (31,8%)	7 (15,9%)	7 (15,9%)	4 (9,1%)	7 (15,9%)	44 (100%)

Em negrito, casos com padrão único. ¹Padrões secundários B e C (2 casos, C suprimido do quadro); ²Padrões secundários C e D (1 caso, D suprimido do quadro); ³Padrões secundários D e E (2 casos, E suprimido do quadro). A soma dos percentuais em cada quadrante delimitado pelas linhas tracejadas corresponde às combinações 1 (superior esquerdo, 34,2%) 2 (superior direito 29,5%), 3 (inferior esquerdo, 9,1%) e 4 (inferior direito 27,2%).

Nas amostras de recidivas observou-se 1 padrão imunoarquitetural em 16,7% e 2 padrões imunoarquiteturais 83,3%, não tendo sido encontrados casos com 3 ou mais padrões. Houve padrão predominante A em 33,3%, B em 33,3%, C em 8,3%, D em 8,3%, E em 16,7% e F em 0,0%, tendo sido atribuídos escore 1 em 41,6% 2 em 25,0%, 3 em 8,3% e 4 em 25,0% aos conjuntos de padrões encontrados em cada caso (Tabela 8).

Tabela 8 - Distribuição dos padrões predominante e secundário(s) nas recidivas.

		Secundário						Total
		A	B	C	D	E	F	
Predominante	A	1 (8,3%)	2 (16,7%)	0 (0,0%)	1 (8,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	4 (33,3%)
	B	1 (8,3%)	1 (8,3%)	1 (8,3%)	0 (0,0%)	1 (8,3%)	0 (0,0%)	4 (33,3%)
	C	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (8,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (8,3%)
	D	0 (0,0%)	1 (8,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (8,3%)
	E	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (8,3%)	1 (8,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (16,7%)
	F	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Total		2 (16,7%)	4 (33,3%)	2 (16,7%)	3 (25,0%)	1 (8,3%)	0 (0,0%)	12 (100,0%)

Em negrito, casos com padrão único. ¹Padrões secundários C e D (1 caso, D suprimido do quadro); ²Padrões secundários B e C (1 caso, C suprimido do quadro). A soma dos percentuais em cada quadrante delimitado pelas linhas tracejadas corresponde às combinações 1 (superior esquerdo, 41,6%) 2 (superior direito 25,0%), 3 (inferior esquerdo, 8,3%) e 4 (inferior direito 25,0%).

Tabela 9 - Distribuição dos padrões predominante e secundário(s) das amostras primárias dos pacientes que apresentaram progressão após tratamento.

		Secundário						Total
		A	B	C	D	E	F	
Predominante	A	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (16,7%) ¹	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (16,7%)
	B	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (16,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (16,7%)
	C	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	D	0 (0,0%)	2 (33,3%) ²	0 (0,0%)	2 (33,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	4 (66,6%)
	E	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	F	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Total		0 (0,0%)	2 (33,3%)	1 (16,7%)	3 (50%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	6 (100%)

¹Padrões secundários C e D (1 caso, D suprimido do quadro); ²Padrões secundários B e C (1 caso, C suprimido do quadro). Em negrito, casos com padrão único. A soma dos percentuais em cada quadrante delimitado pelas linhas tracejadas corresponde às combinações 1 (superior esquerdo, 0,0%) 2 (superior direito, 33,3%), 3 (inferior esquerdo, 33,3%) e 4 (inferior direito, 33,3%).

Nas amostras primárias que apresentaram progressão após o tratamento, observaram-se 33,3% das amostras com 1 2 e 3 padrões. Houve padrão predominante A em 16,7%, B em 16,7%, C em 0,0%, D em 33,3%, E em 0,0% e F em 0,0%, tendo sido atribuídos escore 1 em 41,6% 2 em 25,0%,

3 em 8,3% e 4 em 25,0% aos conjuntos de padrões encontrados em cada caso (Tabela 9).

Apenas 4 pacientes possuíam amostras primárias e recidivas pareadas disponíveis para avaliação histopatológica, impossibilitando uma avaliação estatística conclusiva quanto a presença ou não de diferenças entre os padrões imunoarquiteturais observados nesses grupos de maneira evolutiva. A distribuição dos padrões predominantes e secundários dessas amostras encontra-se representada no Quadro 5.

Quadro 5 - Variação dos padrões imunoarquiteturais em amostras pareadas.

Pares	Primário		Recidiva	
	Predominante	Secundário	Predominante	Secundário
Caso 1	B	A	A	A
Caso 2	B	C	B	C
Caso 3	B	B	B	A
Caso 4	D	B	B	E

Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparadas amostras primárias e recidivas com relação à média de idade, grupo etário, gênero ou tipo de estadiamento ao diagnóstico (Tabela 10). Da mesma forma, não houve diferença estatisticamente significativa quando as amostras primárias foram comparadas em relação ao tipo, combinações, microambiente ou morfologia dos padrões imunoarquiteturais (Tabela 10).

Tabela 10 - Variação de parâmetros clínicos e patológicos de LHPLN nas amostras primárias e recidivas.

Parâmetro	Agrupamento	Primária	Recidiva	Total	<i>p</i>
Idade (anos) [média (IC95%)]	Média	32 (27-37)	26 (20-32)	52	0,113
Grupo etário	< 45 anos	32 (78%)	10 (91%)	42	0,314
	≥ 45 anos	9 (22%)	1 (9%)	10	
Gênero	Masculino	26 (63%)	8 (73%)	34	0,422
	Feminino	15 (37%)	3 (27%)	18	
Estádio	Precoce	23 (68%)	7 (64%)	30	0,606
	Avançado	11 (32%)	3 (36%)	14	
Tipo	Típico	14 (34%)	5 (45%)	19	0,362
	Variante atípica	27 (66%)	6 (55%)	33	
Combinação	Exclusivamente ou predominantemente típicos	26 (63%)	6 (55%)	32	0,42
	Exclusivamente ou predominantemente variantes atípicas	15 (37%)	5 (45%)	20	
Microambiente	Rico em linfócitos B	25 (61%)	7 (64%)	32	0,58
	Rico em linfócitos T	16 (39%)	4 (36%)	20	
Morfologia	Nodular	24 (59%)	9 (82%)	33	0,142
	Difusa	17 (41%)	2 (18%)	19	

Agrupamentos de padrões imunoarquiteturais realizados com base no tipo, combinação, morfologia e microambiente. Amostra primária e recidiva expressas com base no n(%). Valor de *p* referente ao teste exato de Fisher, exceto para a comparação de médias de idade, realizada através do teste T de Student.

Estas comparações não foram realizadas entre amostras pareadas, haja vista que as mesmas representavam apenas 4 casos. As comparações foram realizadas entre amostras independentes, tendo sido incluídas as amostras referentes às recidivas de pacientes com amostras pareadas, haja vista que o grupo de recidivas apresentava menor quantidade de amostras.

4.3 MICROAMBIENTE CELULAR TUMORAL

Observou-se representação de apenas um padrão em uma ou duas áreas avaliadas no TMA em 83,3% (n= 35, A: 3, B: 16, C: 2, D: 7, E: 3, F: 4), enquanto nos 16,7% restantes (n= 7, A: 1, B: 3, C: 1, D:2, E: 0, F: 0) foram observados dois padrões distintos nas áreas avaliadas no TMA, independentemente se primário ou recidiva, tendo sido incluídas as amostras de recidivas dos casos pareados (Quadro 6). Foram utilizadas para avaliação visual e digital amostras com único padrão representado em uma ou duas áreas do TMA, sendo este, inclusive, o padrão utilizado para os agrupamentos. Houve 80% de concordância da área representada no TMA com o padrão predominante observado no corte inteiro, com 20% de divergência referentes apenas às 7 amostras primárias (Quadro 7).

Quadro 6 – Distribuição das áreas incluídas no TMA iguais e distintas por padrão imunoarquitetural.

TMA 1/2	Padrões imunoarquiteturais					
	A	B	C	D	E	F
Iguais	3	16	2	7	3	4
Distintos	1	3	1	2	0	0

Quadro 7 - Divergência de padrões imunoarquiteturais observadas entre as áreas representadas no TMA e no corte inteiro, com referência ao padrão imunoarquitetural predominante.

	Padrões imunoarquiteturais						
Primário	B	D	A	B	B	D	D
TMA	A	B	C	D	D	E	F

A avaliação visual das amostras revelou predomínio absoluto de linfócitos, independentemente do padrão avaliado, com média de contagem de neutrófilos (0,07, IC95%: 0 a 0,15) e eosinófilos (0,05, IC95%: 0 a 0,12) inferior a 1 por amostra avaliada, enquanto mastócitos (2,76, IC95%: 1,65 a 3,88) e plasmócitos (3,26, IC95%: 0,87 a 5,66) apresentaram médias de contagens de cerca de 3 por amostra avaliada, com amplitude de variação entre 0 e 16 e 0 e 30, respectivamente, independentemente do padrão imunoarquitetural da amostra. A contagem dessas células foi realizada em virtude da baixa quantidade encontrada e confirmada através de imuno-histoquímica (CD117 para mastócitos, CD138 para plasmócitos e CD15 para granulócitos, com correspondência com a morfologia).

Quando as amostras foram agrupadas por tipo de padrões, observou-se diferença estatisticamente significativa com relação à média de contagem de plasmócitos ($p=0,007$), havendo maior média nos padrões típicos. Por sua vez, não houve diferença estatisticamente significativa com relação à média de contagem de neutrófilos ($p=0,867$), eosinófilos ($p=0,052$) e mastócitos ($p=0,401$). Não houve diferença significativa quando as amostras foram agrupadas por microambiente e morfologia dos padrões, com relação à média de contagem de neutrófilos ($p=1,0$, $p=0,145$, respectivamente), eosinófilos ($p=0,320$, $p=0,116$, respectivamente), mastócitos ($p=0,364$, $p=0,357$, respectivamente) e plasmócitos ($p=0,114$, $p=0,070$, respectivamente).

A relação entre linfócitos B e T, avaliada através de CD20 e CD3, variou entre os padrões imunoarquiteturais conforme representado nas Figura 8 e Tabela 11. Não houve associação entre a relação CD20/CD3 com grupo

etário, gênero, tipo de estágio e sintomas B (Tabelas 12 e 13). Observou maior relação CD20/CD3 com o agrupamento de variantes atípicas, mas não quando as amostras foram agrupadas por microambiente ou morfologia dos padrões (Tabela 14).

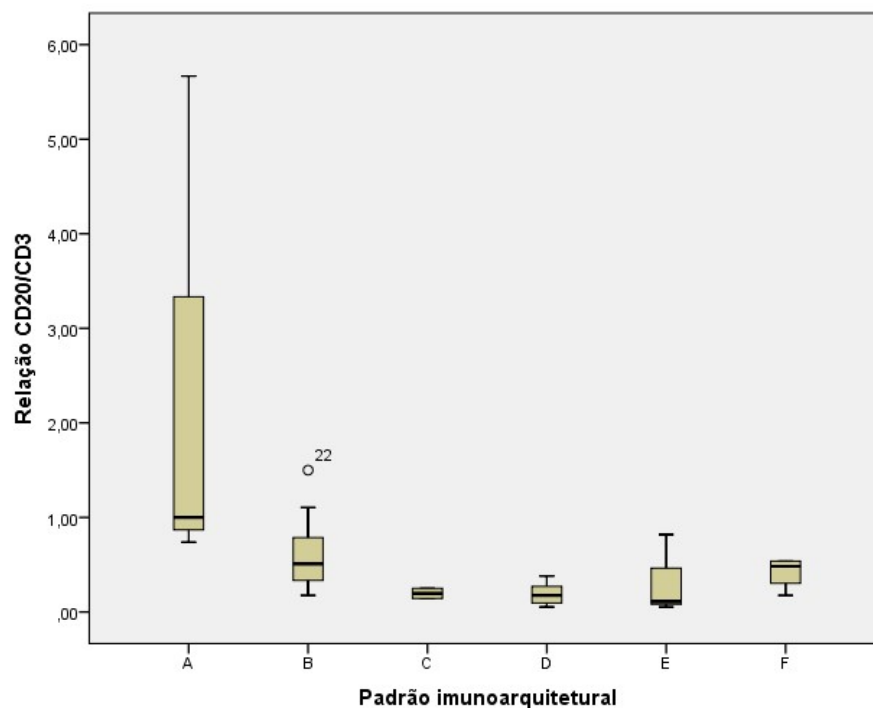


Figura 8 - Diagrama de caixa da relação de linfócitos B (CD20)/linfócitos T (CD3) por padrão imunoarquitetural. Não foi possível realizar o teste de Kruskal-Wallis para comparação entre os grupos em virtude da pequena quantidade de casos agrupados em alguns padrões.

Tabela 11 - Distribuição da relação entre linfócitos B e T, avaliados por CD20 e CD3, respectivamente, e linfócitos T CD4+ e T CD8+ de acordo com os padrões imunoarquiteturais.

Linfócitos B/T (CD20/CD3) T aux/T cit (CD4/CD8)			
Padrões	A	2,46 [IC95%: 0-9,36]	5,34 [IC95%: 3,98-6,72]
	B	0,61 [IC95%: 0-0,81]	4,7 [IC95%: 3,68-5,72]
	C	0,2 [IC95%: 0-0,88]	6,33 [IC95%: 0-14,8]
	D	0,19 [IC95%: 0,08-0,3]	6,27 [IC95%: 3,28-9,25]
	E	0,32 [IC95%: 0-1,39]	1,75 [IC95%: 0-6,68]
	F	0,42 [IC95%: 0,15-0,69]	6,0 [IC95%: 2,1-9,9]

Tabela 12 – Distribuição de relação CD20/CD3, relação CD4/CD8, CD68, CD163, S100 e relação de células dendríticas interdigitantes com morfologia estrelada/arredondada de acordo com grupo etário e gênero.

Parâmetro	Grupo etário		p	Gênero		p
	≥45 anos	<45 anos		Masculino	Feminino	
CD4/CD20 (IC95%) ¹	0,48 (0,32-0,16)	0,71 (0,32-1,11)	0,638	0,79 (0,73-0,85)	0,44 (0,42-0,45)	0,351
CD4/CD8	19,40	17,77	0,739	18,92	16,00	0,429
CD68 (IC95%) ¹	15,00 (12,32-17,68)	16,50 (12,44-20,56)	0,773	18,13 (12,5-23,75)	12,27 (8,47-16,07)	0,129
CD163	17,90	18,02	0,981	19,38	15,00	0,235
S100 (IC95%) ¹	14,30	18,62	0,376	18,60	16,68	0,601
S100CE/CA (IC95%) ¹	4,16 (0-9,11)	4,19 (2,16-6,21)	0,994	4,89 (3,28-6,5)	2,39 (1,7-3,08)	0,246

Tabela 13 – Distribuição de relação CD20/CD3, relação CD4/CD8, CD68, CD163, S100 e relação de células dendríticas interdigitantes com morfologia estrelada/arredondada de acordo com tipo de estágio e sintomas B.

Parâmetro	Estádio		<i>p</i>	Sintomas B		<i>p</i>
	Avançado	Precoce		Presente	Ausente	
CD20/CD3 (IC95%) ¹	0,47 (0,46-0,49)	0,86 (0,77-0,95)	0,369	0,49 (0,51-0,46)	0,77 (0,72-0,82)	0,643
CD4/CD8	17,03	12,45	0,172	15,96	12,50	0,457
CD68 (IC95%) ¹	21,50 (2,86-40,14)	12,00 (10,37-13,63)	0,059	25,00 (0-126)	13,65 (11,74-15,56)	0,342
CD163	12,63	21,25	0,010	25,00	14,04	0,019
S100 (IC95%) ¹	14,23	18,05	0,252	15,96	12,50	0,455
S100CE/CA (IC95%) ¹	6,16 (1,81-10,5)	3,73 (2,08-5,38)	0,321	8,00 (7-9)	4,17 (2,8-5,5)	0,369

Tabela 14 - Distribuição de relação CD20/CD3, relação CD4/CD8, CD68, CD163, S100 e relação de células dendríticas interdigitantes com morfologia estrelada/arredondada de acordo com agrupamentos por tipo, microambiente e morfologia dos padrões imunoarquiteturais.

Parâmetro	Tipo		<i>p</i>	Microambiente		<i>p</i>	Morfologia		<i>p</i>
	Típico	Variante		B	T		Nodular	Difusa	
CD20/CD3 (IC95%) ¹	1,02 (0,43-1,61)	0,28 (0,18-0,38)	0,02	0,86 (0,41-1,31)	0,23 (0,09-0,37)	0,1	0,76 (0,35-1,17)	0,38 (0,18-0,58)	0,4
CD4/CD8	17,05	19,13	0,55	18,66	16,35	0,54	18,8	14,79	0,35
CD68 (IC95%) ¹	12,9 (10,29-15,51)	20,3 (13,73-26,87)	0,05	12,6 (10,34-14,85)	25,5 (16,74-34,26)	0,02	13,93 (11,32-16,53)	25,71 (13,34-38,08)	0,11
CD163	13,79	23	0,01	15,02	25,45	0,01	24,36	16,41	0,63
S100	20,68	14,81	0,09	18,38	17,05	0,73	19,71	11,14	0,04
S100CE/CA (IC95%) ¹	3,98 (1,41-6,55)	4,48 (1,68-7,28)	0,81	4,24 (1,71-6,77)	4,06 (2,16-5,96)	0,93	4 (2,06-5,94)	5 (0-10,84)	0,69

Foram avaliados os linfócitos T CD4+ e T CD8+ (Figura 9). A relação CD4/CD8 mostrou variação entre os padrões imunoarquiteturais conforme Figura 10 e Tabela 11. Não se observou diferença estatisticamente significativa da relação CD4/CD8 com relação a grupo etário, gênero, tipo de estágio ou sintomas B, nem mesmo quando as amostras foram agrupadas por

tipo, microambiente ou morfologia dos padrões imunoarquiteturais (Tabelas 12 a 14).

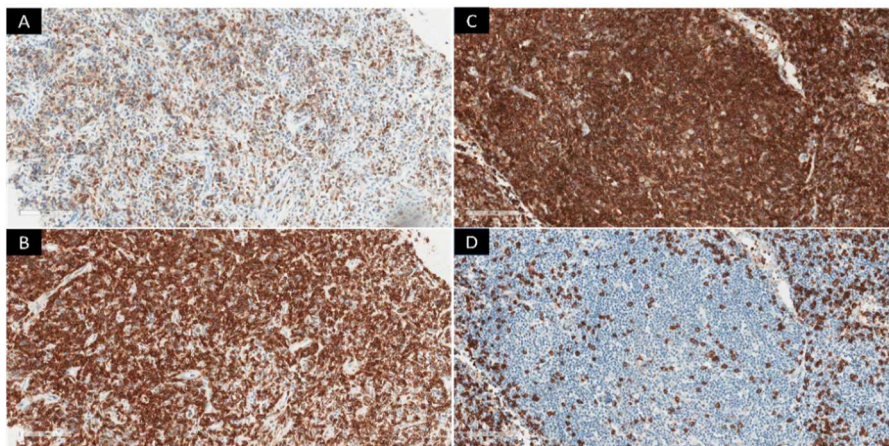


Figura 9 – Expressão de CD4 e CD8 no TMA. Mesma área do TMA mostrando casos de LHPLN com relação CD4(A e C, 200x)/CD8(B e D, 200x) menor (à esquerda) e maior (à direita) que 1.

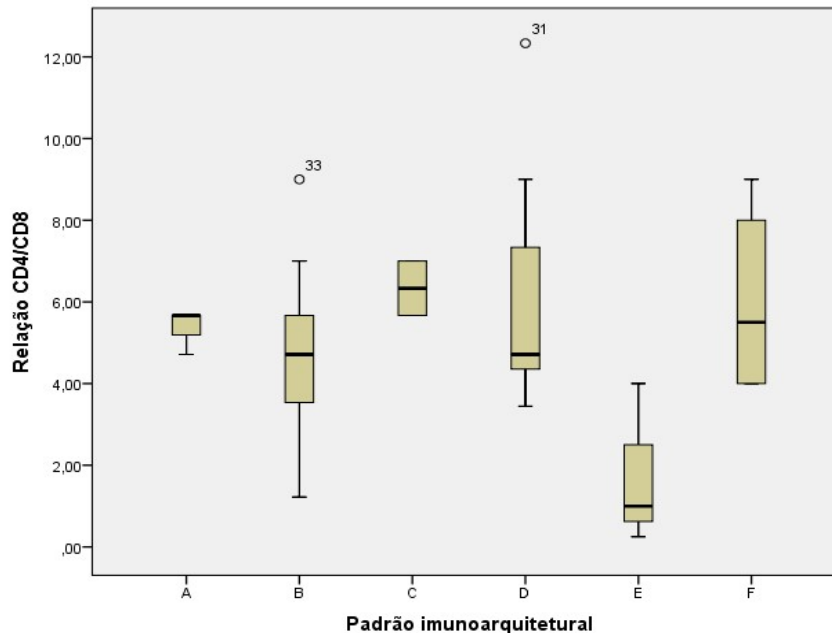


Figura 10 - Diagrama de caixa da relação de linfócitos T CD4+/T CD8+ por padrão imunoarquitetural. Não foi possível realizar o teste de Kruskal-Wallis para comparação entre os grupos em virtude da pequena quantidade de casos agrupados em alguns padrões.

Ressalta-se que não se observou expressão de perforina e granzima B nas amostras de TMA avaliadas (n= 42). A mediana de expressão de CD56 encontrava-se entre 0 e 5% nos padrões C, D e E, estando entre 5% e 10% nos padrões A, B e F (n= 35). Por sua vez, a mediana de expressão de CD57 foi 0 nos padrões C e E, encontrava-se entre 0 e 5% nos padrões B e C e entre 5% e 10% em A, D e F (Quadro 8). Não houve diferença estatisticamente significativa em relação à expressão de CD56 e CD57 com relação a grupo etário, gênero, tipo de estágio e sintomas B, assim como em relação aos agrupamentos por tipo, morfologia ou microambiente dos padrões (Tabelas 15 a 17) (Figura 11).

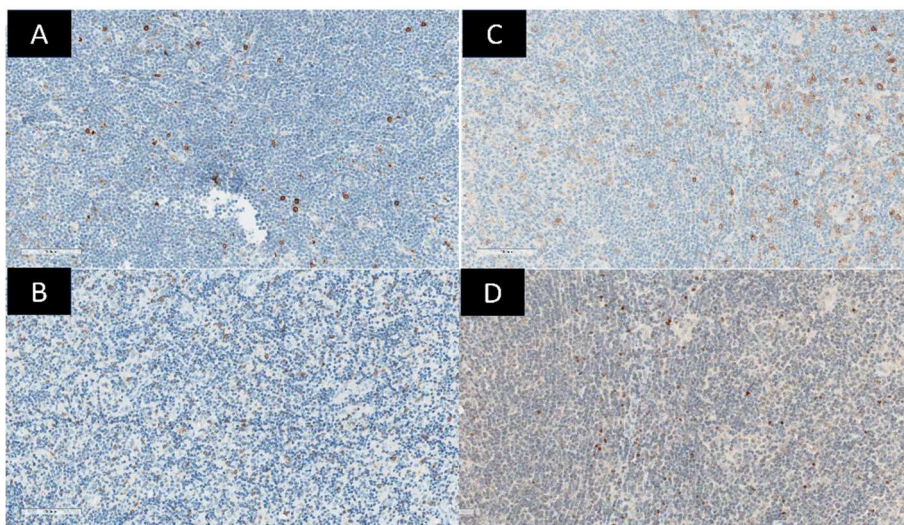


Figura 11 - Expressão mais alta de CD56, CD57, CD25 e FOXP3 em LHPLN. CD56 (A, 200x), CD57 (B, 200x), CD25 (C, 200x) e FOXP3 (200x).

Quadro 8 - Distribuição dos casos de LHPLN segundo expressão de CD56, CD57, CD25 e FOXP3 por padrão imunoarquitetural nas amostras avaliadas no TMA.

Marcador	Percentual positivo	Padrão avaliado no TMA						Total
		A	B	C	D	E	F	
CD56	Ausente	0	0	0	0	0	0	0
	0 - ≤ 5%	1	7	2	5	3	1	19
	>5 - ≤ 10%	2	9	0	2	0	3	16
	> 10% - ≤ 15%	0	0	0	0	0	0	0
CD57	Ausente	1	6	1	0	2	0	10
	0 - ≤ 5%	0	6	1	3	1	1	12
	>5 - ≤ 10%	2	2	0	3	0	3	10
	> 10% - ≤ 15%	0	2	0	1	0	0	3
CD25	Ausente	1	9	1	5	2	0	18
	0 - ≤ 5%	1	7	1	2	1	4	16
	>5 - ≤ 10%	1	0	0	0	0	0	1
	> 10% - ≤ 15%	0	0	0	0	0	0	0
FOXP3	Ausente	2	11	2	4	3	2	24
	0 - ≤ 5%	1	4	0	3	0	2	10
	>5 - ≤ 10%	0	1	0	0	0	0	1
	> 10% - ≤ 15%	0	0	0	0	0	0	0
Total		3	16	2	7	3	4	35

A mediana de expressão de CD25 foi 0 nos padrões B, C, D e E, sendo entre 0 e 5% em A e F. De maneira similar, FOXP3 apresentou mediana de expressão 0 em todos os seis padrões avaliados (Quadro 8) (Figura 11). Não houve diferença estatisticamente significativa com relação a CD25 e FOXP3, quando as amostras foram agrupadas por tipo, microambiente e morfologia dos padrões (Tabela 17).

Tabela 15 – Expressão de CD56, CD57, CD25 e FOXP3 de acordo com grupo etário e gênero.

Parâmetro	Agrupamento	Grupo etário		<i>p</i>	Gênero		<i>p</i>
		<45 anos	≥ 45 anos		Masculino	Feminino	
CD56	0-≤5%	17	2	0,415	14	5	0,364
	>5%	13	3		10	6	
CD57	0-≤5%	19	3	0,626	15	7	0,626
	>5%	11	2		9	4	
CD25	Ausente	15	3	0,528	13	5	0,454
	Presente	15	2		11	6	
FOXP3	Ausente	22	2	0,166	17	7	0,479
	Presente	8	3		7	4	

Tabela 16 – Expressão de CD56, CD57, CD25 e FOXP3 de acordo com tipo de estágio e sintomas B.

Parâmetro	Agrupamento	Estadio		<i>p</i>	Sintomas B		<i>p</i>
		Avançado	Precoce		Avançado	Precoce	
CD56	0-≤5%	9	6	0,35	13	2	0,701
	>5%	11	4		13	2	
CD57	0-≤5%	11	7	0,35	14	4	0,112
	>5%	9	3		12	0	
CD25	Ausente	9	4	0,554	11	2	0,591
	Presente	11	6		15	2	
FOXP3	Ausente	15	5	0,169	17	3	0,593
	Presente	5	5		9	1	

Tabela 17 – Expressão de CD56, CD57, CD25 e FOXP3 de acordo com tipo, microambiente e morfologia dos padrões imunoarquiteturais.

Parâmetro	Agrupamento	Tipo		<i>p</i>	Microambiente		<i>p</i>	Morfologia		<i>p</i>
		Típico	Variante		B	T		Nodular	Difusa	
CD56	0-≤5%	8	11	0,108	11	8	0,058	15	4	0,602
	>5%	11	5		14	2		13	3	
CD57	0-≤5%	13	9	0,347	16	6	0,56	15	4	0,602
	>5%	6	7		9	4		13	3	
CD25	Ausente	10	8	0,573	11	7	0,155	18	4	0,525
	Presente	9	8		14	3		10	3	
FOXP3	Ausente	13	11	0,636	17	7	0,62	19	5	0,619
	Presente	6	5		8	3		9	2	

Os macrófagos foram avaliados através do percentual de expressão de CD68 e CD163 de acordo com os padrões imunoarquiteturais, como mostram

Figura 12 e Tabela 18. Houve correlação forte entre as expressões de CD68 e CD163 (coeficiente de correlação de Spearman de 0,8, conforme Figura 13).

Tabela 18 - Distribuição de macrófagos, avaliados por CD68 e CD163, e células dendríticas interdigitantes, avaliados por S100, incluindo relação entre as morfologias estrelada e arredondada, de acordo com os padrões imunoarquiteturais.

Parâmetro Avaliado	Macrófagos		Células dendríticas interdigitantes (S100+/CD1a-) S100	
	CD68	CD163	Estreladas/	Arredondadas
Padrão imunoarquitetural	A [IC95%]	13,33% [3,85%-22,82%] 5% [0-17,42%]	10,83% [7,25%-14,42%]	1,02 [0,42-1,61]
	B [IC95%]	13,72% [9,92%-16,33%] 11,09% [8,52%-13,67%]	14,69% [10,83%-18,54%]	0,91 [0,70-1,12]
	C [IC95%]	12,5% [0-44,26%] 13,75% [0-29,63%]	7,5% [0-71,03%]	1,15 [0-6,04%]
	D [IC95%]	18,57% [11,4%-25,74%] 15,35% [9,3%-21,39%]	12,14% [6,9%-17,39]	1,24 [1,05-1,43]
	E [IC95%]	41,67% [10,41%-72,9%] 29,17% [16,24%-42,09%]	8,33% [0-17,82%]	0,81 [0-2,6]
	F [IC95%]	13,75% [9,78%-17,73%] 11,88% [3,05%-20,7%]	6,88% [0-15,7%]	5,45 [0-19,84]

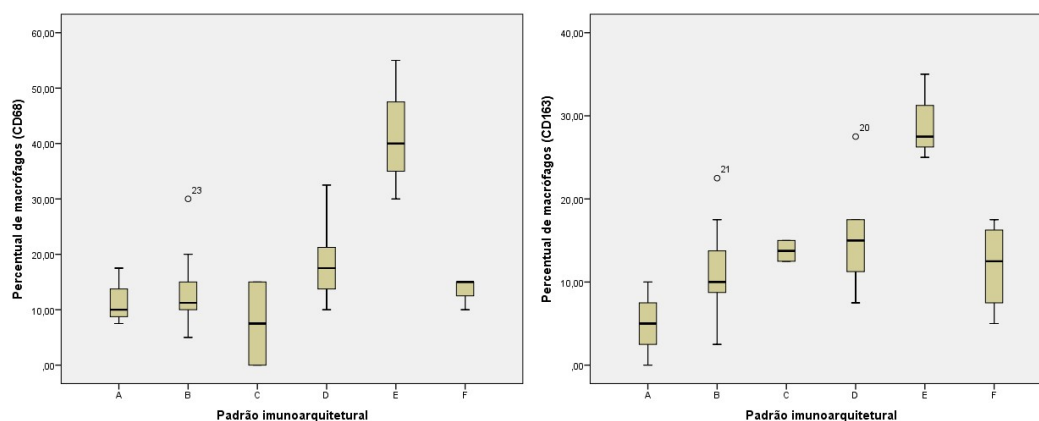


Figura 12 - Diagrama de caixa do percentual de macrófagos (CD68 e CD163) por padrão imunoarquitetural. Não foi possível realizar o teste de Kruskal-Wallis para comparação entre os grupos em virtude da pequena quantidade de casos agrupados em alguns padrões.

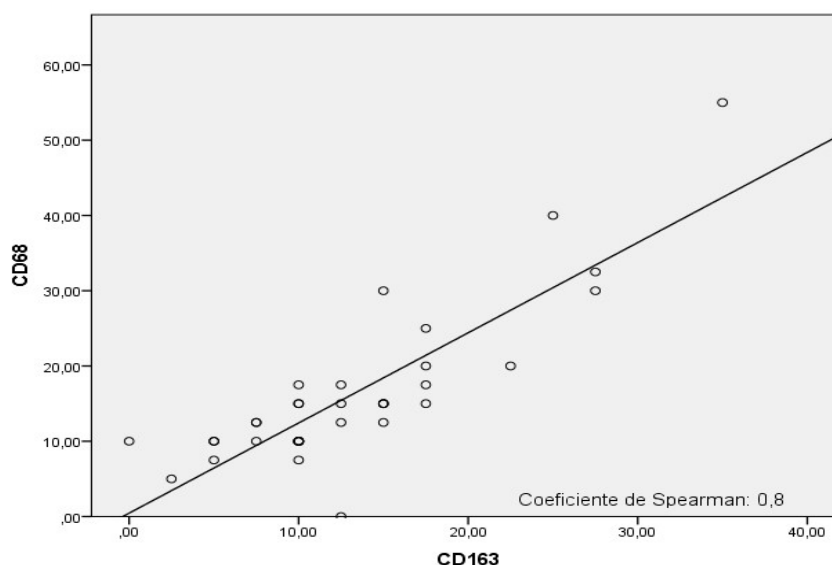


Figura 13 - Gráfico de dispersão entre CD68 e CD163. Coeficiente de Spearman de 0,8.

Não se observou diferença de expressão de CD68 e CD163 com relação ao grupo etário ou gênero (Tabela 12). Não houve diferença de médias de CD68 em relação à presença ou ausência de sintomas B, diferentemente do que se observou para CD163, que apresentou expressão diferente entre esses grupos (Tabela 13). Não houve diferença entre as médias de CD68 ou CD163 com relação ao estágio ao diagnóstico (Tabela 13). Houve diferença estatisticamente significativa com relação a CD68 e CD163, quando comparadas amostras agrupadas por tipo e microambiente dos padrões imunoarquiteturais (Tabela 14). A expressão dos imunomarcadores foi mais alta em variantes atípicas e microambiente rico em células T (Tabela 14).

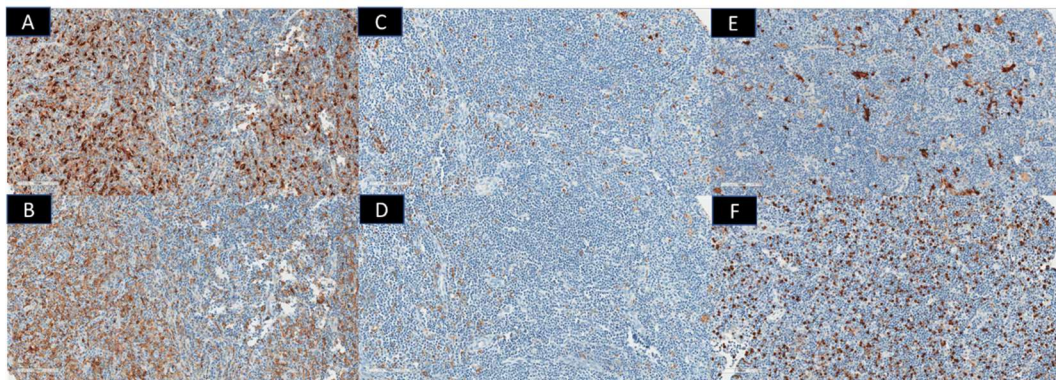


Figura 14 – Avaliação de TAM (CD68 e CD163) e células dendríticas (S100) no TMA. Mesma área do TMA com elevada quantidade de TAM avaliada por CD68 (A, 200x) e CD163 (B, 200x); mesma área do TMA com baixa quantidade de TAM avaliada por CD68 (C, 200x) e CD163 (D, 200x); células dendríticas interdigitantes estreladas (E, 200x) e arredondadas (F, 200x).

As células dendríticas interdigitantes e células de Langerhans foram avaliadas através de S100 e CD1a, com base no perfil S100+/CD1a+ e S100+/CD1a-, respectivamente. Não foram identificadas células de Langerhans expressando CD1a nas amostras avaliadas no TMA (n= 42). Entretanto, foram encontradas células dendríticas interdigitantes, com padrões morfológicos estrelado e arredondado, com percentual médio e relação dos padrões estrelado / arredondado variando entre os padrões morfológicos de acordo com a Figuras 15 e 16 e Tabela 18.

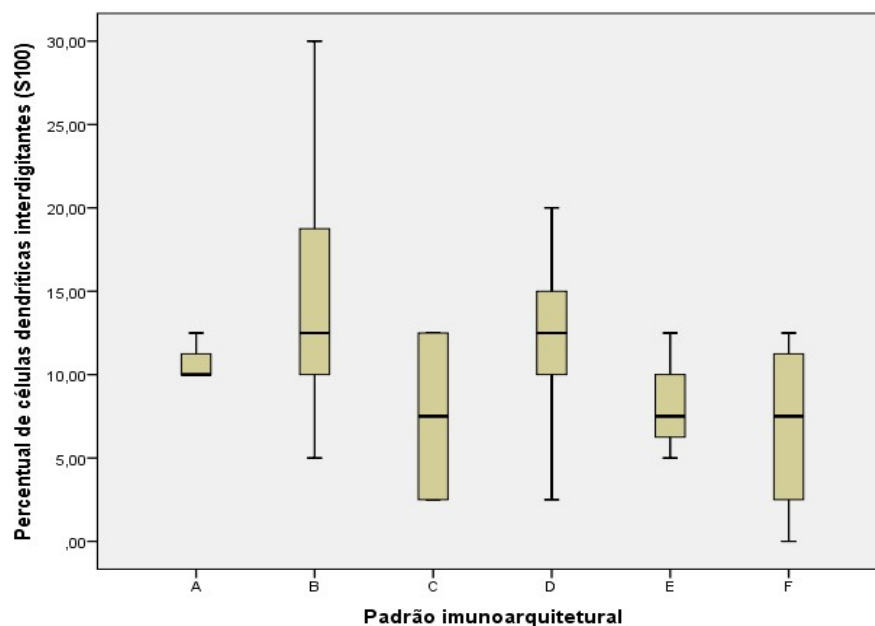


Figura 15 - Diagrama de caixa do percentual de células dendríticas interdigitantes (S100) por padrão imunoarquitetural. Não foi possível realizar o teste de Kruskal-Wallis para comparação entre os grupos em virtude da pequena quantidade de casos agrupados em alguns padrões.

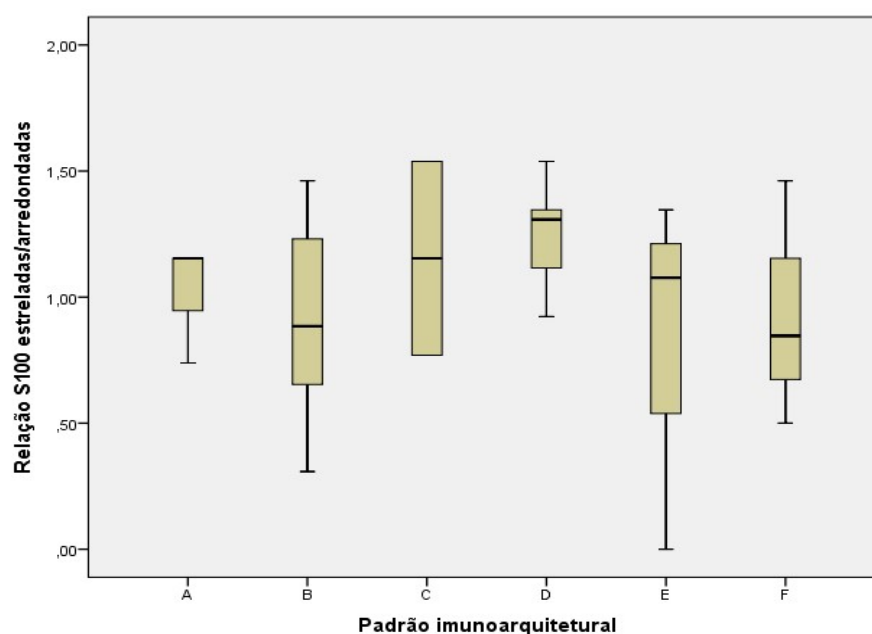


Figura 16 - Diagrama de caixa da relação entre células dendríticas interdigitantes (S100) com morfologia estreladas e arredondadas por padrão imunoarquitetural. Não foi possível realizar o teste de Kruskal-Wallis para comparação entre os grupos em virtude da pequena quantidade de casos agrupados em alguns padrões.

Não foi identificada associação entre percentual de células dendríticas digitantes ou relação células dendríticas com padrões estrelado/arredondado no que diz respeito a grupo etário, gênero, tipo de estágio ao diagnóstico ou sintomas B (Tabelas 12 e 13). De maneira similar, não houve diferença estatisticamente significativa com relação aos agrupamentos por tipo ou microambiente de padrões imunoarquiteturais. Quando as amostras foram agrupadas pela morfologia dos padrões, observou-se diferença estatisticamente significativa com relação ao percentual de células dendríticas interdigitantes ($p= 0,044$), com maior média de expressão nos padrões nodulares (Tabela 14). Contudo, não se observou tal diferença para a relação dos padrões estrelado/arredondado ($p= 0,686$).

4.4 AVALIAÇÃO DE SOBREVIVÊNCIA

Não se observou diferença estatisticamente significativa entre as curvas de SLP em 10 anos separadas com base em grupo etário ($n= 55$) ($p= 0,908$), gênero ($n= 55$) ($p= 0,593$), tipo de estágio ($n= 54$) ($p= 0,244$) ou agrupamentos dos padrões imunoarquiteturais ($n= 35$), com base em tipo ($p= 0,114$) ou morfologia ($p= 0,191$) (Figuras 17 a 21).

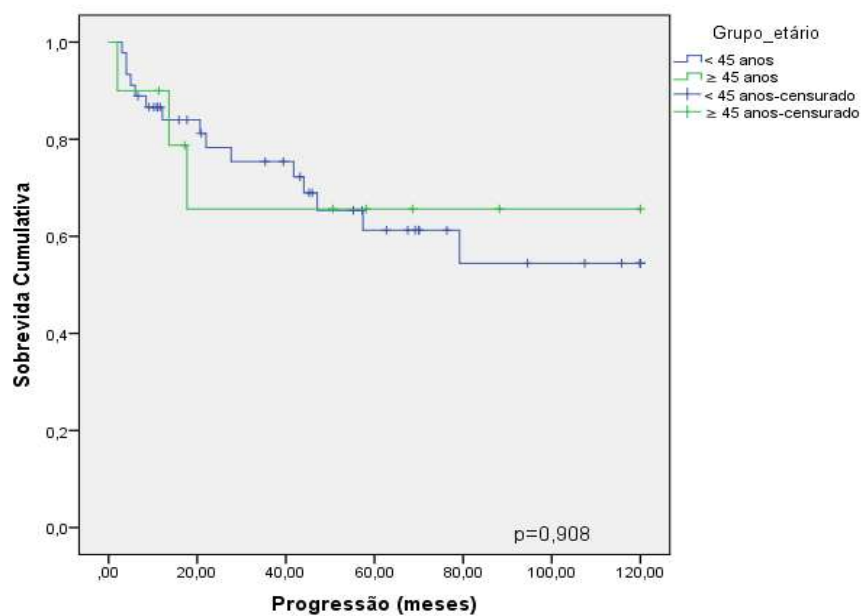


Figura 17 - Curvas de SLP por grupo etário. (n=55).

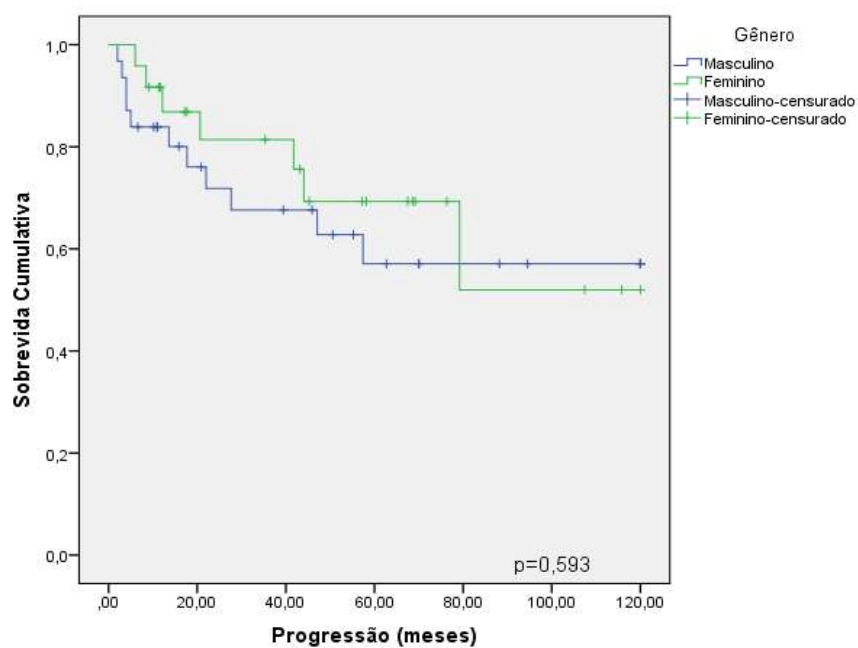


Figura 18 - Curvas de SLP por gênero. (n=55).

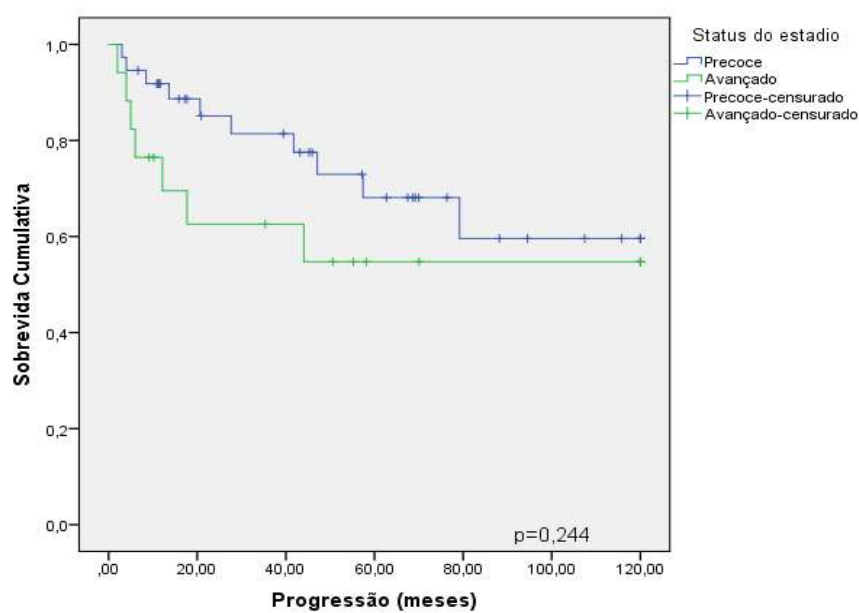


Figura 19 - Curvas de SLP por tipo de estágio. (n=54).

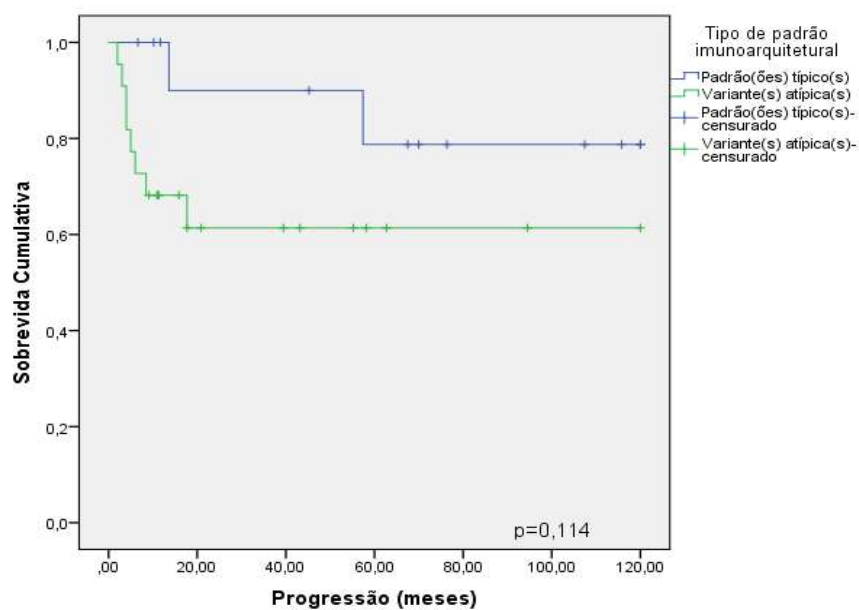


Figura 20 - Curvas de SLP por tipo de padrão imunoarquitetural. (n=35).

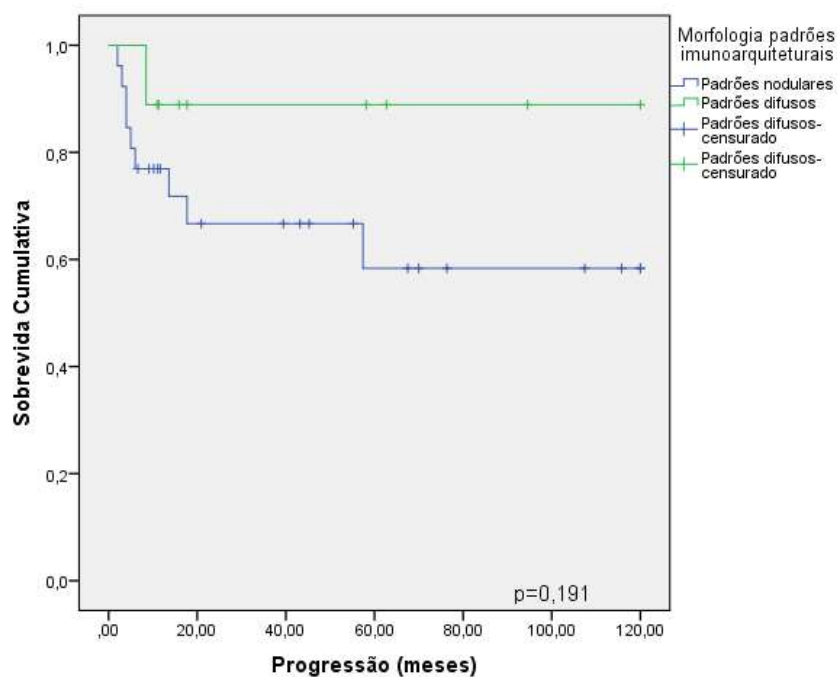


Figura 21 - Curvas de SLP por morfologia de padrões imunoarquiteturais. (n=35).

Houve diferença significativa entre as curvas de SLP em 10 anos para os agrupamentos dos padrões imunoarquiteturais com base em combinações ($p= 0,043$), microambiente ($p= 0,004$) (Figuras 22 e 23).

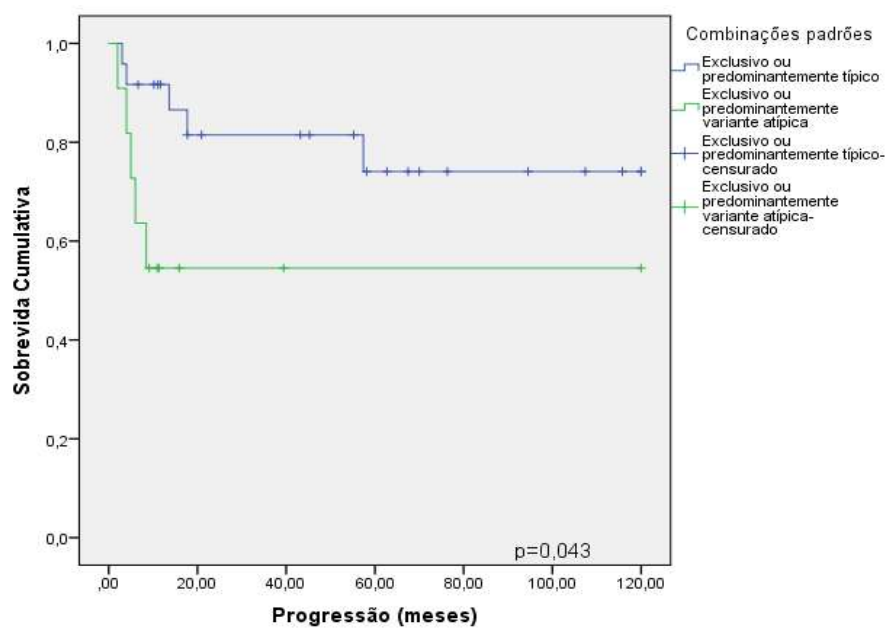


Figura 22 - Curvas de SLP por combinação de padrões imunoarquiteturais. (n=35).

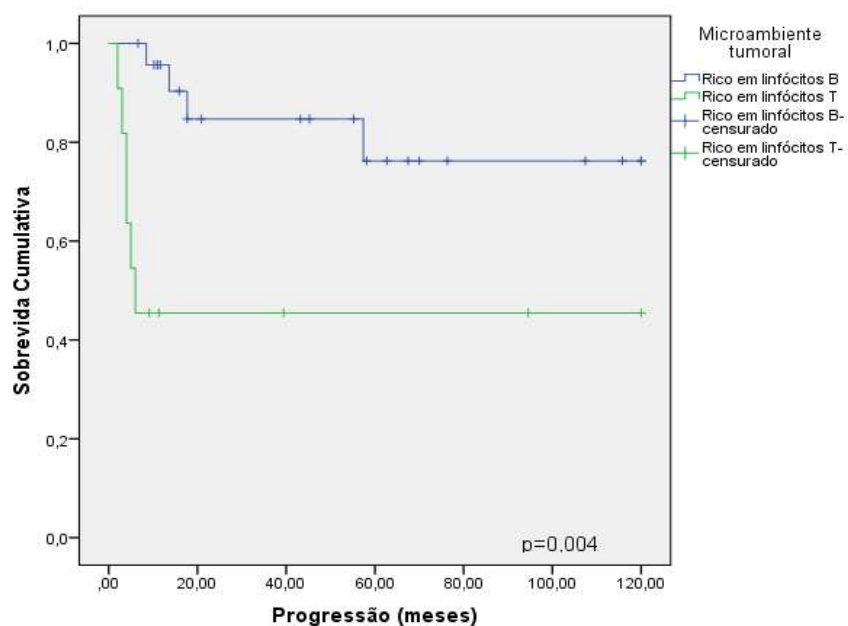


Figura 23 - Curvas de SLP por microambiente de padrões imunoarquiteturais. (n=35).

Quando foi calculado escore de pontos com base no grupo etário (< 45 anos: 0; $\geq$ 45 anos: 1), gênero (masculino: 2 e feminino: 0) e tipo de padrão arquitetural (padrão(ões) típico(s): 0 e variante(s) atípica(s): 1), não se observou diferença estatisticamente significativa entre as curvas de SLP em 10 anos ($p= 0,343$), quando separados os pacientes com escore entre 0-1 e 2-4 (escore 1) (Figura 24). De maneira similar, quando esse escore de pontos foi acrescido de tipo de estágio (precoce: 0; avançado: 1) ($p= 0,196$), não se observou diferença entre os grupos prognósticos, quando separados os pacientes com escore entre 0-2 e entre 3-5 (escore 2) (Figura 25).

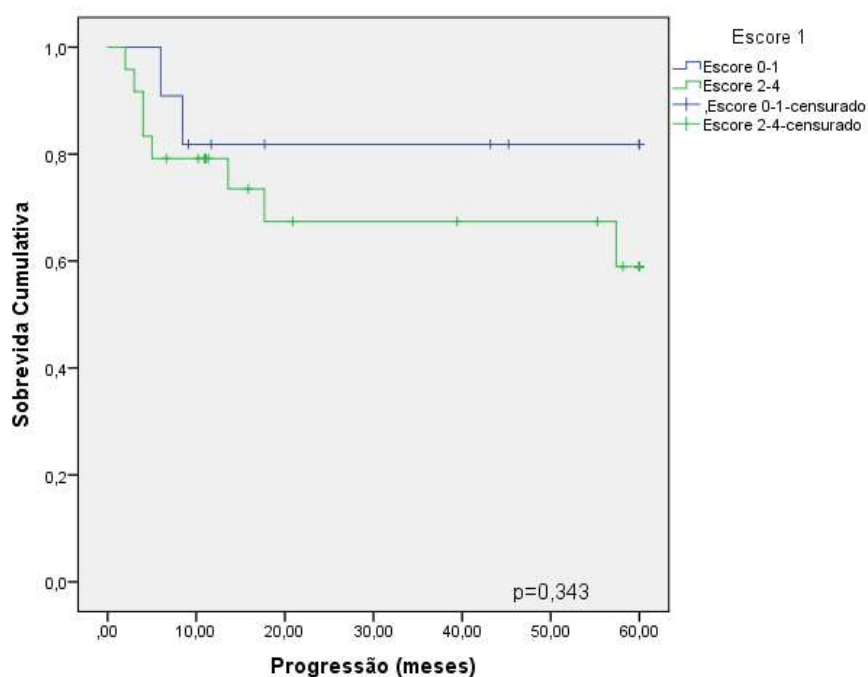


Figura 24 - Curvas de SLP para escore 1 (grupo etário, gênero e tipo dos padrões). (n=35).

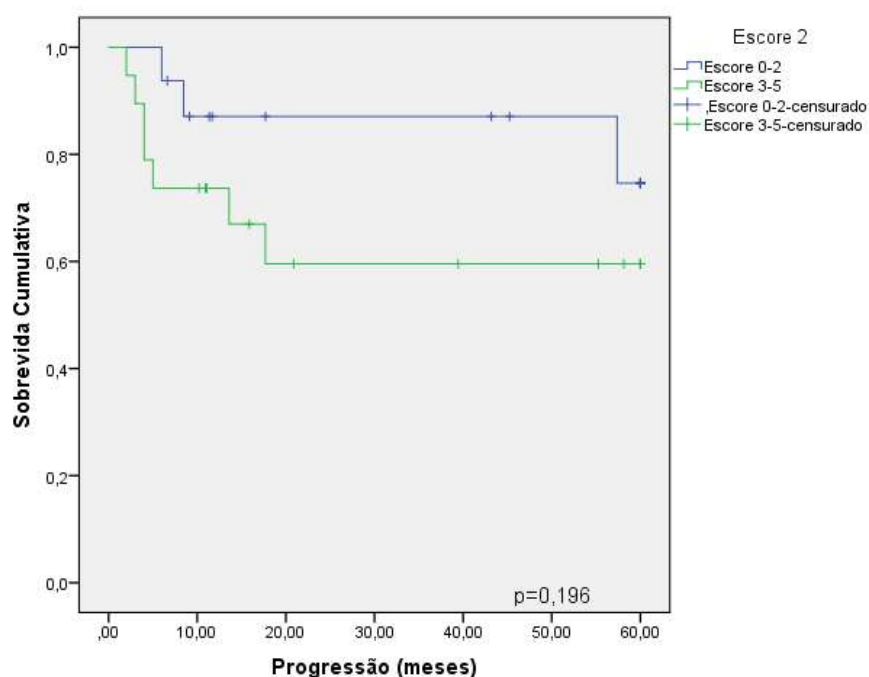


Figura 25 - Curvas de SLP para escore 2 (grupo etário, gênero, tipo dos padrões e estágio). (n=35).

Não houve diferenças nas curvas de SLP em 10 anos quando os pacientes foram agrupados de acordo com escore de pontos calculado com base no grupo etário (< 45 anos: 0; ≥ 45 anos: 1), gênero (masculino: 2 e feminino: 0) e combinações (exclusivos e/ou predominantemente típicos: 0; exclusivos e/ou predominantemente variantes atípicas: 1) (escore 3) ($p=0,234$) (Figura 26) ou microambiente (rico em linfócitos B: 0; rico em linfócitos T: 1) (escore 4) ($p=0,234$) (Figura 27), ao invés do tipo de padrões imunoarquiteturais. Diferentemente, quando esse escore foi acrescido de tipo de estágio (precoce: 0; avançado: 1), houve tendência à diferença significativa entre as curvas de SLP para 10 anos, quando consideradas as combinações (escore 5) ($p=0,051$) (Figura 28), sendo a diferença significativa quando

considerado o agrupamento por microambiente (escore 6) ($p= 0,008$) (Figura 29) dos padrões imunoarquiteturais. Além disso, quando ambas as variáveis relativas aos padrões imunoarquiteturais foram incluídas no cálculo do escore (escore 7), observou-se distinção entre as curvas de SLP em 10 anos ainda mais significativa ($p= 0,001$) (Figura 30).

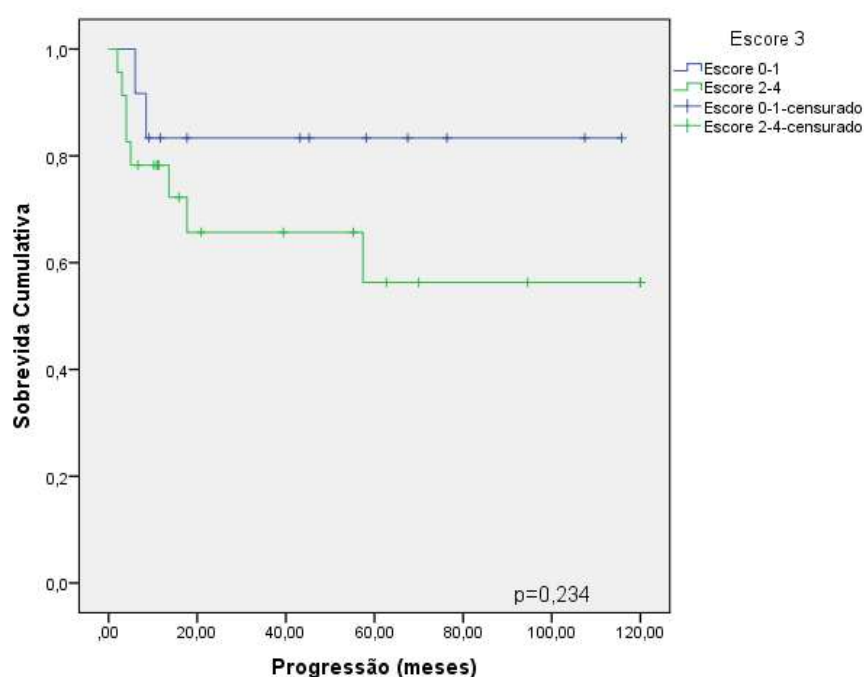


Figura 26 - Curvas de SLP para escore 3 (grupo etário, gênero, combinações dos padrões). (n=35).

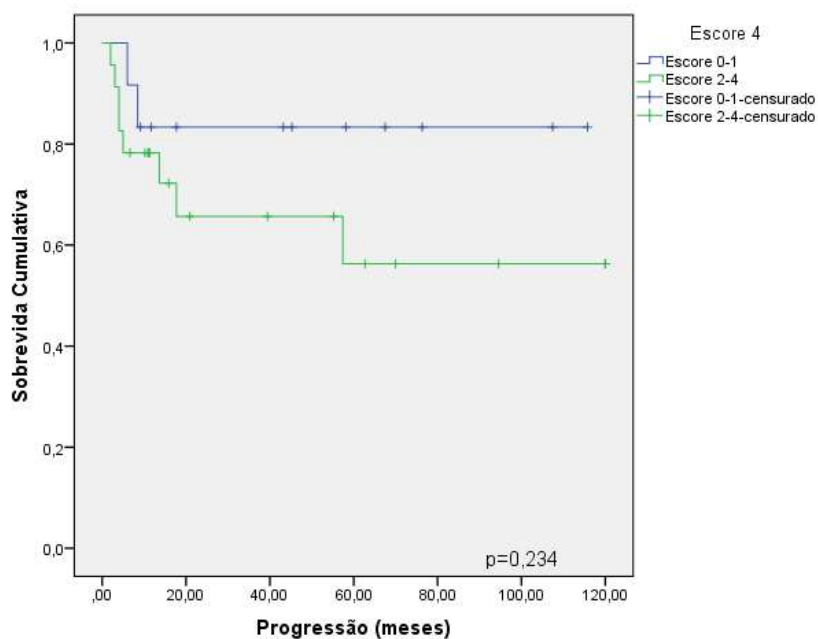


Figura 27 - Curvas de SLP para score 4 (grupo etário, gênero, microambiente dos padrões). (n=35).

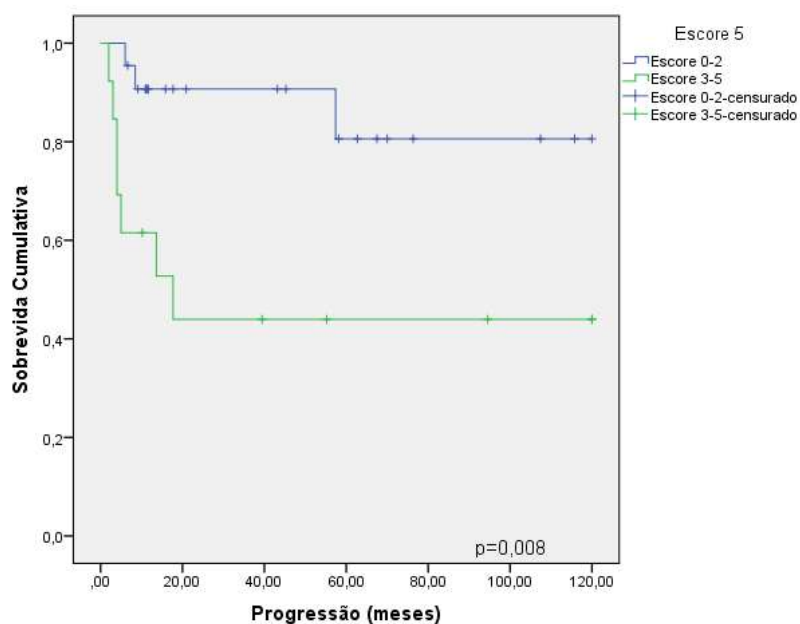


Figura 28 - Curvas de SLP para score 5 (grupo etário, gênero, combinações dos padrões e estágio). (n=35).

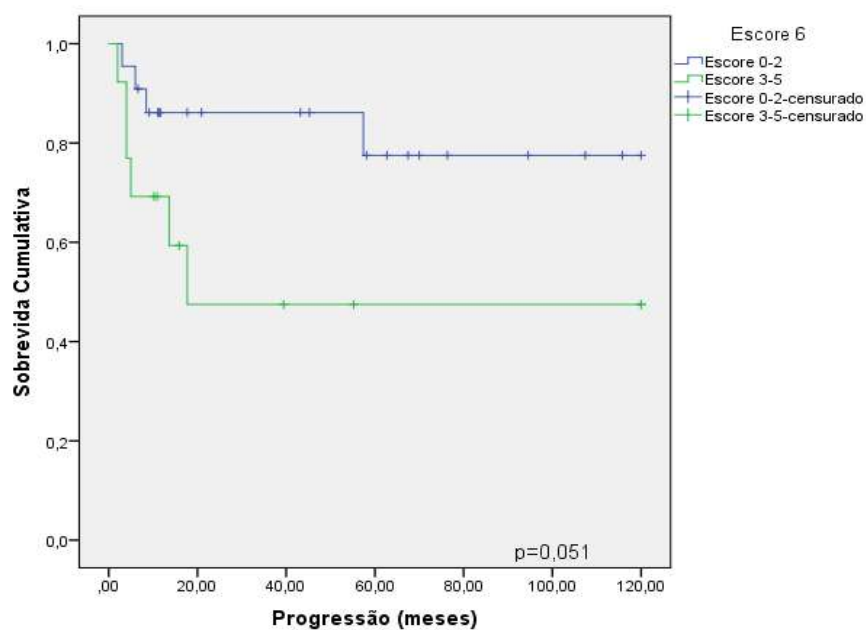


Figura 29 - Curvas de SLP para score 6 (grupo etário, gênero, microambiente dos padrões e estágio). (n=35).

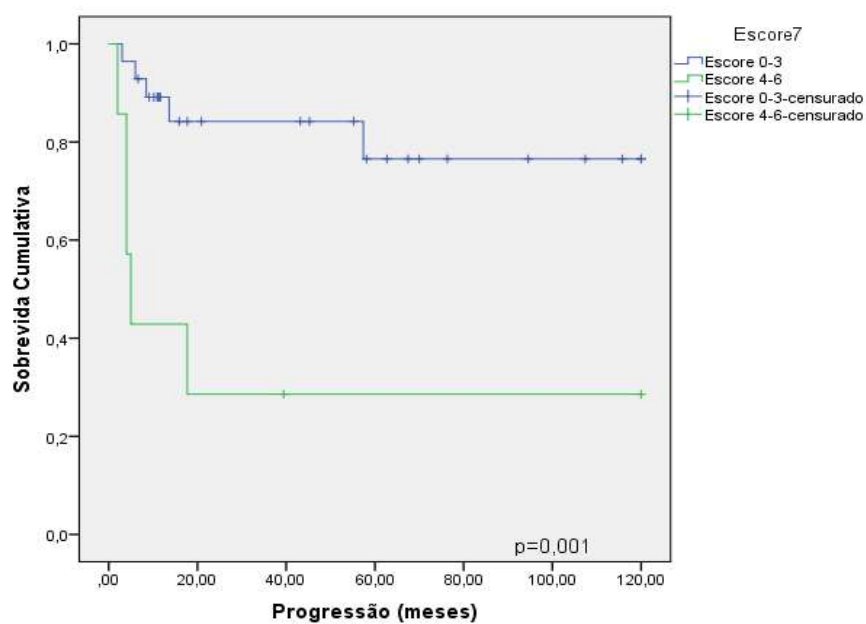


Figura 30 - Curvas de SLP para score 7 (grupo etário, gênero, combinações dos padrões, microambiente dos padrões e estágio). (n=35).

As medianas para CD68, CD163, CD4/CD8 e S100 foram de 12,5%, 15%, 5% e 10%. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação às curvas de SLP em 10 anos para CD68 e CD163 quando realizado corte em 25% ($p=0,212$ e $p=0,263$, respectivamente), 12,5% ($p=0,612$ e $p=0,332$, respectivamente) ou 5% ($p=0,586$ e $p=0,488$, respectivamente). Da mesma maneira, não foram encontradas diferenças entre as curvas de SLP em 10 anos considerando-se relação CD4/CD8 (ponto de corte em 5%, $p=0,770$) e S100 (ponto de corte em 10%, $p=0,806$). Nestas avaliações, apenas foram consideradas as amostras primárias do TMA (22), ainda que independentemente se com padrões imunoarquiteturais representados no TMA iguais ou distintos.

4.5 AVALIAÇÃO DIGITAL

Quarenta e duas amostras foram analisadas em relação ao microambiente celular tumoral do LHPLN, com base na estimativa visual de um patologista (LL) e análise digital realizada pelo ImageScope®. Os resultados da análise digital foram comparados com a estimativa visual, incluindo-se a maior parte das informações fornecidas pelo ImageScope® (positividade total, positividade forte, 3+ 2+ e 1+, bem como o valor percentual com melhor concordância pelo CCI nas relações CD20 / CD3 e CD4 / CD8).

Quadro 9 - Comparação entre estimativa visual e análise digital pelo ImageScope® com base no CCI. Confiabilidade classificada como pobre (<0,5), moderada (0,5-0,75), boa (0,75-0,9) e excelente (>0,9) de acordo com a variação observada no IC95%.

Marcador	Maior CCI	IC95%		Confiabilidade	Avaliação com maior CCI	Avaliação no mesmo grupo de
		L. inferior	L. superior			
CD20	0,928	0,867	0,962	Boa a Excelente	3+/2+ Valor percentual	3+/2+ Valor bruto 3+ Valor bruto
CD3	0,791	0,611	0,887	Moderada a Boa	3+ Valor percentual	Nenhum outro
CD4	0,750	0,536	0,866	Moderada a Boa	3+/2+ Valor percentual	Nenhum outro
CD8	0,909	0,831	0,951	Boa a Excelente	3+/2+ Valor bruto	Nenhum outro
CD56	0,514	0,096	0,739	Pobre a Moderada	1+ Valor Bruto	Nenhum outro
CD57	0,769	0,566	0,877	Moderada a Boa	1+ Valor Bruto	3+/2+/1+ Valor
CD25	0,637	0,324	0,805	Pobre a Boa	3+/2+ Valor bruto	2+ Valor bruto
FOXP3	0,742	0,521	0,862	Moderada a Boa	3+/2+/1+ Valor bruto	Nenhum outro
CD68	0,912	0,836	0,952	Boa a Excelente	3+/2+ Valor bruto	Nenhum outro
CD163	0,881	0,778	0,936	Boa a Excelente	3+/2+ Valor bruto	Nenhum outro
S100	0,917	0,846	0,956	Boa a Excelente	3+/2+/1+ Valor bruto	3+/2+ Valor Bruto

O Quadro 9 mostra os parâmetros com melhor correlação entre a estimativa visual e a análise digital pelo ImageScope®, com a respectiva tabela de confiabilidade nos resultados obtidos. Foram, ainda, incluídos parâmetros que apresentavam valores com confiabilidade dentro da mesma faixa que o melhor CCI apresentado para cada marcador.

5 DISCUSSÃO

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

O estudo realizado revelou características clínico-patológicas de pacientes com LHPLN no Brasil. Este é o primeiro estudo realizado no país com enfoque em pacientes com este subtipo de LH. Os trabalhos anteriormente realizados englobavam exclusivamente ou predominantemente os subtipos clássicos. Portanto, tendo em vista que estes subtipos correspondem a cerca de 95% dos casos de LH, considerável viés de representatividade deve ser levado em conta em relação à interpretação dos dados referentes ao LHPLN com base nas séries anteriormente descritas no país (SOUZA et al. 1997; VASSALLO et al. 2005; ARAUJO et al. 2006; ALDRED et al. 2008; GUALCO et al. 2010).

Os dados obtidos em relação aos casos de LHPLN no Brasil foram similares aos descritos em outras séries maiores americanas (GERBER et al. 2015) e europeias (NOGOVÁ et al. 2008; FARRELL et al. 2011). A média de idade nessas séries variou entre 37 e 38 anos, enquanto no Brasil esta foi de 32 (IC95%: 28 a 36) anos. Curiosamente, a razão entre os gêneros masculino e feminino no Brasil foi de 1,56, tendo sido inferior à observada tanto nas séries americanas, quanto nas europeias, que variavam entre 2,26 e 3 (NOGOVÁ et al. 2008; FARRELL et al. 2011; GERBER et al. 2015), assim como em relação à maior série brasileira, que mostrava razão de 2,5

(VASSALLO et al. 2005).

Mais de 30% dos pacientes com LHPLN no Brasil apresentavam-se em estágio avançado, percentual discretamente superior à taxa de cerca de 20% observado em outras séries (NOGOVÁ et al. 2008; FARRELL et al. 2011). Ressalta-se que nenhum paciente apresentou envolvimento de medula óssea ao diagnóstico (n= 43), diferentemente do que é apontado em outras séries de casos, cujas taxas de envolvimento medular variam entre 8,72% (KHOURY et al. 2004) e 9,09% (PANJWANI et al. 2015), contudo, quando considerados apenas os casos com diagnóstico com morfologia nodular, que não levantam dúvida em relação ao diagnóstico diferencial com LDGCB-RTH, essa taxa cai para 2,54%, como observado por KHOURY et al. (2004).

Apesar da inclusão de pacientes durante longo período de tempo, superior a 30 anos, observou-se que pouca mudança ocorreu no tratamento do LHPLN, tendo em vista que mais de 85% dos pacientes foram tratados com quimioterapia, radioterapia ou ambas as modalidades de tratamento. Dos pacientes que receberam quimioterapia, mais de 80% foram tratados com esquema ABVD, com mediana de 4 ciclos. Tratamentos diferentes foram realizados na última década, incluindo-se uso de Rituximabe (12,7%) e TMO (5,5%) como primeira linha, sobretudo em pacientes em estádios mais avançados. Esses dados encontram-se em acordo com o que se observa na literatura, inclusive com relação às novas modalidades terapêuticas utilizadas, que também apontam para a redução do uso de radioterapia nas décadas mais recentes (BONADONNA 2000; XING e SAVAGE 2013; GERBER et al. 2015). Por sua vez, realização de QT seguida de TMO foi observada em mais

de 40% dos pacientes que apresentaram recidivas.

As recidivas em LHPLN costumam ser frequentes, variando entre 10% e 60% (NOGOVÁ et al. 2008; JACKSON et al. 2010; BIASOLI et al. 2010) em 5 ou 10 anos, dependendo do estudo, tendo sido observadas em 16,4% em 5 anos, 20% em 10 anos e 21,8% durante todo o período de acompanhamento do presente estudo. Nenhum dos pacientes que apresentou recidiva no presente estudo evoluiu para o óbito durante o período avaliado. Apesar de empiricamente não se observar piora de prognóstico após recidiva do LHPLN, aspecto distinto em relação ao LHC, não foi identificado estudo avaliando especificamente esta diferença entre esses subtipos, ainda que FAN et al. (2003) também tenham observado que pacientes com recidiva sem outros fatores de risco não necessariamente requerem terapia mais agressiva.

Foram registrados 3 óbitos causados por LHPLN (5,1%), o que demonstra o excelente prognóstico deste subtipo de LH, com SCE de 95,5% em 5 e 10 anos. A SLP foi de 62,4% em 5 anos e 56,7% em 10 anos, sendo aquela muito inferior à SLP demonstrada pelo Grupo Alemão de Estudo de Hodgkin (do inglês, *German Hodgkin Study Group*) de 90,6% em 5 anos. É possível que as diferenças observadas em relação às taxas de recidiva e SLP sejam decorrentes de diferenças sócio-econômicas locais onde os estudos foram realizados, como já salientado por SOARES et al. (2007), BIASOLI et al. (2017) e JAIME-PÉREZ et al. (2017).

Ressalta-se que a taxa de transformação para LDGCB foi de 3,6%, com presença de uma segunda neoplasia após diagnóstico e tratamento de primeira linha para LHPLN em cerca de 7%. O percentual de transformação

de LHPLN para LDGCB é variável de acordo com o estudo, os mais antigos indicando taxas entre 3% e 6% (MIETTINEN et al. 1983; HANSMANN et al. 1989), enquanto os mais recentes com taxas de 8% a 14% (FAN et al. 2003; JACKSON et al. 2010; BIASOLI et al. 2010; AL-MANSOUR et al. 2010). Tal diferença pode residir no fato de que somente a partir de 1994 o LHPLN foi considerado uma entidade distinta, assim como no tipo de casuística avaliada, se casos de rotina ou enviados em consulta. No presente estudo, casos com diagnóstico anterior a 1994 foram confirmados em avaliação histopatológica. Ainda que FAN et al. (2003) tenham demonstrado que a identificação de padrões exibindo morfologia difusa (D e E) em LHPLN poderia indicar uma transformação precoce para LDGCB, tal avaliação não foi possível, haja vista que apenas dois casos apresentaram transformação no presente estudo. Um dos casos apresentava padrão F na amostra primária, enquanto o outro não apresentava amostra primária disponível para revisão histológica, apesar de apresentar padrão E na recidiva.

5.2 PADRÕES IMUNOARQUITETURAIS DE LHPLN

Os padrões imunoarquiteturais do LHPLN foram classificados como nodular e difuso por LUKES e BUTLER (1966), com maior caracterização dos mesmos por FAN et al. (2003) como A) nodular clássico, B) nodular interconectado/serpiginoso, C) nodular com acentuada quantidade de células LH extranodulares, D) nodular, rico em células T, E) difuso (similar ao LDGCB-RTH) e F) “comido por traça” (difuso), rico em células B. No presente estudo,

houve 34,1% e 16,7% dos casos com apenas um padrão imunoarquitetural em amostras primárias e recidivas, respectivamente, com representação de mais de 50% da amostra por padrões B (54,6%) e A (33,3%)/B (33,3%) nas amostras primárias e recidivas, respectivamente. Por sua vez, FAN et al. (2003) reportaram cerca de 40% de casos com apenas um padrão, enquanto HARTMANN et al. (2013) demonstraram cerca de 80%, tendo sido observado predomínio do padrão A em mais de 50% da amostra em cerca de 60% e 80%, respectivamente. Essas diferenças podem ser reais, eventualmente associadas a fatores genéticos, sócio-econômicos ou ambientais, contudo, deve-se considerar possível divergência quanto à reprodutibilidade dos padrões imunoarquiteturais.

Quadro 10 - Parâmetros imunoarquiteturais avaliados para classificação dos padrões de LHPLN.

	Morfologia	CD20	CD3	CD21/CD23	CD57
A	Nodular	+++	+	+++	+++
B	Nodular	+++	+	+++	+++
C	Nodular	++	++	++	++
D	Nodular	-/+	+++	+++	+++
E	Difusa	-/+	+++	-/+	-/+
F	Difusa	+++	+	+	+

No presente estudo, as amostras foram classificadas em relação aos padrões imunoarquiteturais com base nos parâmetros de referência definidos por FAN et al. (2003), conforme resumido no Quadro 10. A organização imunoarquitetural dos padrões evidencia uma migração das células LH para a região internodular e/ou infiltração das áreas nodulares por linfócitos T, com perda das rosetas de células T CD57+ e desorganização da trama dendrítica

folicular, evidenciada por CD21/CD23, progressivamente do padrão A para F, sequencialmente passando pelos padrões B e C, na qual se observa a migração das células LH para a região internodular. De maneira similar, observa-se progressão do padrão D para E, com perda acentuada das rosetas de células T CD57+ e trama dendrítica folicular evidenciada por CD21/CD23. No presente estudo, não foram obtidas amostras suficientes para realização de testes estatísticos entre os 6 padrões imunoarquiteturais em relação a variáveis clínicas e patológicas.

5.3 FATORES PROGNÓSTICOS ASSOCIADOS AO MICROAMBIENTE TUMORAL

A presença de células inflamatórias no microambiente tumoral é bem caracterizada no LHC (STEIN et al. 2017a), contudo, possivelmente devido ao predomínio de linfócitos, existem raros estudos avaliando a presença de neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e plasmócitos em LHPLN (ENGLUND et al. 2016). Ainda que uma maior infiltração por mastócitos tenha sido associada a estágio avançado e presença de sintomas B ao diagnóstico em LHC (ENGLUND et al. 2016), com pior SLP e SCE (ANDERSEN et al. 2016), não se observou tal associação no LHPLN, nem mesmo com relação a outras células inflamatórias avaliadas. Ressalta-se que houve associação entre média de contagem de plasmócitos e variantes atípicas, tendo este grupo apresentado contagens mais baixas.

A relação CD20/CD3 reflete alguns dos parâmetros que foram

utilizados para a classificação dos padrões, assim, era esperado que houvesse diferença entre os grupos com microambiente rico em células B ($CD20/CD3 > 1$) e células T ($CD20/CD3 < 1$). Curiosamente, esta associação não foi observada, ainda que tenha sido verificada relação maior nos padrões típicos do que nas variantes atípicas. Tal variação pode ser devida à distribuição das amostras em relação aos padrões imunoarquiteturais, assim como à forma como os agrupamentos foram realizados, uma vez que os padrões ricos em células T (D e E) estavam presentes apenas nas variantes atípicas. Não se observou diferença da relação linfócitos T $CD4^+/T CD8^+$ entre os padrões ou seus agrupamentos, ainda que tenha sido observado predomínio de células T $CD4^+$ ($CD4/CD8 > 1$), com ausência de expressão de perforina e granzima B, grânulos citotóxicos presentes em linfócitos T $CD8^+$ e células NK.

Curiosamente, alguns casos observados (4) apresentavam quantidade de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ visualmente equivalentes, variando cerca de 10%, não sendo possível distinguir se eram os mesmos linfócitos que marcavam ou apenas linfócitos próximos entre si, entremeados. Essa observação faz-se relevante diante dos dados obtidos a partir de citometria de fluxo na última década, que mostram uma elevada taxa de células com dupla marcação $CD4^+CD8^+$ (RAHEMTULLAH et al. 2006; RAHEMTULLAH et al. 2008; WU et al. 2016). Entretanto, apenas uma dupla marcação para CD4 e CD8 seria capaz de dirimir esta dúvida.

Apesar de não ter sido negativo, CD56 demonstrou expressão inferior a 10% em todos os casos. Como a expressão deste marcador é compartilhada

por linfócitos T CD8+ e células NK, não foi possível definir com segurança qual tipo celular estava expressando tal marcador. Outros marcadores associados aos linfócitos Treg (CD25, FOXP3 e CD57) também demonstraram uma baixa expressão, indicando a pequena quantidade dessas células no microambiente tumoral na série de casos avaliada. Não houve associação desses marcadores com padrões imunoarquiteturais ou agrupamentos desses padrões quando os valores foram categorizados.

Esses dados demonstram que possivelmente esta é mais uma diferença entre o microambiente do LHPLN em relação ao LHC, uma vez que ALVARO-NARANJO et al. (2005), ÁLVARO et al. (2005) e GREAVES et al. (2013) demonstraram a associação de menor número de linfócitos T CD8+, expressão de CD56 e CD57, além de aumento da expressão de FOXP3, granzima B e TIA1 com curso clínico desfavorável em LHC. A presença de linfócitos T CD57+ não mostrou relação com padrões imunoarquiteturais conforme originalmente descrito por FAN et al. (2003). Ressalta-se, entretanto, que a série avaliada é pequena, sendo necessário reavaliação numa quantidade maior de casos para que se conclusões possam ser obtidas de maneira mais precisa.

Com relação aos TAM, avaliados por CD68 e CD163, observou-se coeficiente de correlação de Spearman de 0,8 entre os marcadores. Identificou-se maior expressão de CD68 e CD163 no padrão E em comparação aos demais padrões, entretanto, não foi possível realizar avaliação estatística quanto à existência de diferença entre os grupos, em virtude da pequena quantidade de amostras em alguns padrões. Isso se

refletiu na diferença observada nos agrupamentos por tipo e morfologia para ambos os marcadores, havendo maior quantidade de macrófagos nas variantes atípicas e padrões difusos. Apesar de uma maior quantidade de TAM (superior a 5% ou 25% dependendo do estudo) ter sido identificada como fator prognóstico desfavorável para LHC (STEIDL et al. 2010; GREAVES et al. 2013; KLEIN et al. 2014), inclusive numa metanálise recente (GUO et al. 2016), não se observou tal associação na única série de casos do Brasil (AZAMBUJA et al. 2012).

Existe apenas uma série de casos do Japão que avaliou a presença de TAM em LHPLN até o momento (ELADL et al. 2015). Nessa série, observou-se que presença de CD68 > 5% mostrou associação com idade mais avançada ao diagnóstico, hemoglobina sérica baixa e menor taxa de resposta completa após tratamento inicial, enquanto CD163 > 5% mostrou associação com sintomas B. Não houve diferença entre os grupos quando avaliada SLP ou sobrevida global. No presente estudo, também não foram observadas diferenças na SLP em 10 anos, com base no ponto de corte de 5%, 12,5% e 25%, para CD68 e CD163. Ressalta-se, entretanto, que o trabalho japonês apresentava curvas de SLP com base em 19 pacientes, tendo apenas 2 eventos (uma recidiva e um óbito), portanto, não mostrando distribuição proporcional das curvas, o que torna o teste de *log-rank* não satisfatório. No presente estudo, contudo, as curvas de SLP foram calculadas para 22 pacientes, havendo 9 eventos. Assim, ainda se faz necessária avaliação de CD68 e CD163 em séries maiores, para definição mais precisa quanto a serem imunomarcadores prognósticos em LHPLN. Não houve associação

com tipo de estágio ao diagnóstico ou sintomas.

Não houve associação dos padrões imunoarquiteturais com o percentual de células dendríticas interdigitantes avaliadas por S100+/CD1a-, nem mesmo para a relação entre suas formas estrelada e arredondada. Apesar disso, notou-se associação entre percentual de células dendríticas interdigitantes e padrões nodulares, com maior média percentual das células dendríticas nestes grupo. Este achado é interessante, tendo em vista que apenas pequena quantidade de células dendríticas interdigitantes está presente em áreas ricas em células B, como a zona do manto ou folículos primários, não sendo encontradas em centros germinativos (TAKAHASHI et al. 2001). Com base nesses achados, levanta-se a hipótese da participação destas células na regulação de resposta imune mediada por células B, assim como na progressão do LHPLN das formas nodulares para as formas difusas, o que ainda precisa ser investigado de maneira mais adequada.

As curvas de SLP em 10 anos observadas no presente estudo não mostraram diferenças com relação a gênero, grupo etário, tipo de estágio ao diagnóstico ou agrupamentos de padrões imunoarquiteturais por tipo ou morfologia, contudo, observou-se diferença para os agrupamentos por combinações ou microambiente de padrões imunoarquiteturais. Possivelmente, isso se deve à quantidade de casos presentes na amostra, uma vez que o maior estudo focado em fatores prognósticos de LHPLN demonstrou estágio avançado ao diagnóstico, hemoglobina sérica baixa e linfopenia como fatores prognósticos desfavoráveis em relação ao tempo de falha de tratamento através de regressão logística de COX, assim como idade

≥ 45 anos, estágio avançado ao diagnóstico e hemoglobina sérica baixa em relação à sobrevida global através de regressão de COX múltipla (NOGOVÁ et al. 2008). Diferentemente, HARTMANN et al. (2013) demonstraram que gênero masculino, presença de variante atípica dos padrões imunoarquiteturais e baixa albumina sérica eram fatores prognósticos desfavoráveis através de regressão de COX múltipla em relação às curvas de SLP. Nesse estudo, variáveis ligadas ao estadiamento influenciaram o prognóstico na análise simples, contudo, não mostraram tal comportamento na análise múltipla no modelo de regressão aplicado. Por isso, não foram incorporadas ao cálculo do escore prognóstico. Da mesma forma, grupo etário não foi considerado nesse cálculo.

Devido à pequena quantidade de casos, não foi possível realizar análises de regressão múltipla no presente estudo. Ainda assim, essas variáveis foram incluídas nos cálculos dos escores no presente estudo, com bases em escores anteriormente validados e fatores de risco para LHPLN. Os escores 1, 2, 3 e 4 não foram úteis para diferenciar grupos prognósticos com relação à SLP em 10 anos. Contudo, os escores 5, 6 e 7 conseguiram identificar grupos de pacientes com pior sobrevida nesse período. As diferenças entre os escores 1, 2, 3 e 4 e escores 5, 6 e 7 fundamentalmente residem na variável de agrupamento dos padrões. Diferentemente do que foi proposto por HARTMANN et al. (2013), foram realizados os agrupamentos com base nas combinações dos padrões imunoarquiteturais (predominante e secundário(s)), bem como no microambiente, para avaliar o prognóstico. O fato da estratificação das curvas de SLP ocorrer quando baseada em

combinação e microambiente dos padrões, mas não quando baseada no tipo dos mesmos pode indicar que o microambiente tenha um papel mais preponderante na determinação do prognóstico do apenas a presença das variantes atípicas, haja vista que mesmo quando variantes atípicas estão presentes, como na combinação predominantemente típica, ainda se observa melhor prognóstico.

Infelizmente, as informações clínicas relativas a outros fatores prognósticos relevantes em LHPLN, como concentração de hemoglobina sérica, presença de linfopenia e IPS (NOGOVÁ, et al. 2008), não foram encontradas de maneira precisa nos prontuários dos pacientes selecionados para o estudo, não tendo sido avaliadas até o momento. Apesar disso, ressalta-se que os escores 5, 6 e 7 são relativamente simples de serem calculados, não necessitando de variáveis relativas ao hemograma, o que pode facilitar sua utilização.

5.4 AVALIAÇÃO DIGITAL

A avaliação de LH por TMA foi motivo de questionamentos quanto à reprodutibilidade, devido às diferenças na representividade das áreas, até GLIMELIUS et al. (2012) publicarem um estudo comparativo entre TMA e corte inteiro, demonstrando que as variações observadas entre esses dois tipos de avaliação são decorrentes da própria heterogeneidade tumoral, o que não restringe a avaliação do microambiente através do TMA. A correlação observada entre a avaliação digitalizada realizada pelo sistema APERIO® e

a contagem manual foi referida como boa, apesar das variáveis serem quantitativas e não ter sido utilizado o CCI. Entretanto, os parâmetros utilizados pelo sistema APERIO® como referência para o cálculo da correlação não foram informados, assim como para outros sistemas de digitalização utilizados para estudo de biomarcadores imuno-histoquímicos em LH (ÁLVARO et al. 2005; ANDERSEN et al. 2016).

No presente estudo, buscou-se estabelecer uma correlação entre estimativa visual, rotineiramente utilizada na prática diagnóstica da patologia, e avaliação digital realizada pelo ImageScope®, tendo em vista que os algoritmos frequentemente utilizados são voltados para células maiores, geralmente com citoplasma suficiente que permite clara distinção entre núcleo e membrana citoplasmática, o que reduz a chance de leituras errôneas pelo ImageScope®. Neste programa, são fornecidas 4 estimativas percentuais (3+ 2+ 1+ e 0), com base na intensidade de marcação. Como tal intensidade não é relevante num estudo de microambiente celular inflamatório, como no caso do LH, a identificação de quais parâmetros correlacionam-se com a estimativa visual torna-se relevante, sobretudo considerando-se alguns valores discrepantes observados nas leituras do ImageScope®.

Assim, o presente estudo, além das considerações no que diz respeito às características clínico-patológicas do LHPLN, seus padrões imunoarquiteturais e microambiente tumoral, permite que trabalhos futuros sejam realizados com base na utilização da análise digital pelo ImageScope® de uma maneira mais padronizada. Sua utilização pode ser útil, tendo sido observada pelo menos uma boa correlação na maioria dos imunomarcadores

avaliados, ainda que seja necessário definir com melhor precisão quais parâmetros de estimativas percentuais devem ser consideradas em casos com baixa expressão na IHQ, cenário no qual a estimativa visual parece não ser confiável suficiente, inclusive para comparação com o ImageScope®.

5.5 LIMITAÇÕES

O presente estudo, apesar de ser o maior realizado no Brasil acerca de LHPLN, incluiu pacientes durante mais de 30 anos, assim, alguns deles apresentavam longo tempo de seguimento, enquanto outros, apenas informações disponíveis para 1 ou 2 anos. Além disso, houve cerca de 40% de censura até 5 anos, com mais de 60% até 10 anos. Apenas 4 amostras eram pareadas, o que impossibilitou a avaliação evolutiva dos pacientes. Apesar disso, realizou-se a comparação entre os padrões encontrados em amostras primárias e recidivas, não tendo sido observadas diferenças entre os mesmos ou seus agrupamentos. Mesmo que diferenças não tenham sido identificadas entre os grupos, pode existir algum fator que influencie o microambiente tumoral e, consequentemente o padrão imunoarquitetural, das amostras de recidivas, como a realização de tratamento, por exemplo.

As estratificações necessárias para as análises estatísticas (primário e recidiva, padrões imunoarquiteturais A, B, C, D, E e F, 4 combinações de padrões, além de 2 agrupamentos por tipo, microambiente e morfologia dos padrões imunoarquiteturais) não permitiram a realização de alguns testes estatísticos, como o teste de Kruskal-Wallis para a comparação dos padrões

com relação aos marcadores celulares, bem como possivelmente influenciaram alguns outros. Além disso, apenas 22 pacientes possuíam amostras com avaliação satisfatória de imunomarcadores através do TMA que eram primárias, tendo informação sobre seguimento clínico. A dificuldade de levantamento de informações clínicas relevantes, como IPS e dados de hemograma ao diagnóstico, também foi um fator limitante no presente estudo. Apesar disso, ressalta-se que com a pequena quantidade de casos, não seria possível realização de regressão múltipla.

A falta de um algoritmo específico para citoplasma também pode ter prejudicado a avaliação dos marcadores CD68, CD163 e S100, ainda que visualmente houvesse uma similaridade entre os resultados fornecidos pelo ImageScope®, tendo sido esta similaridade relevante para escolha quanto à utilização dos algoritmos de membrana e núcleo de maneira substitutiva.

6 RESUMO DOS ACHADOS

Pacientes com LHPLN no Brasil apresentam distribuição etária unimodal, com razão M/F de 1,56 e estadio avançados em ~30%. A SLP em 5 e 10 anos é de 62,4% e 56,7%, respectivamente, com SEC de 95,5% para 5 e 10 anos.

Combinações de padrões compostas de maneira exclusiva ou predominantemente por variante(s) atípica(s) e os padrões com microambiente rico em células T apresentaram-se como fatores prognósticos desfavoráveis.

Houve predomínio de mais de um padrão imunoarquitetural nas amostras primárias (66,9%) e recidivas (83,3%), tendo sido observado mais frequentemente padrões predominantes B (54,6%) e A (33,3%)/B (33,3%), respectivamente.

Variantes atípicas foram associadas a contagem de plasmócitos, percentual de TAM e percentual de linfócitos T mais elevados, estando os padrões difusos associados a maior percentual de TAM e menor percentual de células dendríticas interdigitantes.

Avaliação de TAM por CD68 e CD163 mostrou boa correlação (0,8), estando esses presentes em maior percentual em pacientes com estadios avançados e sintomas B.

A avaliação digital possui confiabilidade variando de excelente (CD20, CD8, CD68, CD163 e S100) até pobre (CD56 e CD25).

7 CONCLUSÕES

Os padrões imunoarquiteturais estão associados à composição celular do microambiente imunes tumoral do LHPLN, mostrando valor prognóstico quando em conjunto com variáveis clínicas como idade, gênero e estágio ao diagnóstico.

O desenho do estudo e os resultados obtidos contribuem de forma original para o conhecimento desta doença pouco frequente, não apenas no Brasil.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aldred V, Vassallo J, Froes M Campos AHJ, Soares FA. CD20 expression by Hodgkin-Reed-Sternberg cells in classical Hodgkin lymphoma is related to reduced overall survival in young adult patients. **Leuk Lymphoma** 2008; 49:2198-202.

Al-Mansour M, Connors JM, Gascoyne RD, Skinnider B, Savage KJ. Transformation to aggressive lymphoma in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's Lymphoma. **J Clin Oncol** 2010; 28:793-9.

Álvaro T, Lejeune M, Salvadó MT, et al. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. **Clin Cancer Res** 2005; 11:1467-73.

Alvaro-Naranjo T, Lejeune M, Salvadó-Usach MT, et al. Tumor-infiltrating cells as a prognostic factor in Hodgkin's lymphoma: a quantitative tissue microarray study in a large retrospective cohort of 267 patients. **Leuk Lymphoma** 2005; 46:1581-91.

Andersen MD, Kamper P, Nielsen PS, et al. Tumour-associated mast cells in classical Hodgkin's lymphoma: correlation with histological subtype, other tumour-infiltrating inflammatory cell subsets and outcome. **Eur J Haematol** 2016; 96:252-9.

Araujo I, Bittencourt AL, Barbosa HS, et al. The high frequency of EBV infection in pediatric Hodgkin lymphoma is related to the classical type in Bahia, Brazil. **Virchows Arch** 2006; 449:315-9.

Azambuja, D, Natkunam, Y, Biasoli I, et al. Lack of association of tumor-associated macrophages with clinical outcome in patients with classical hodgkin's lymphoma. **Ann Oncol** 2012; 23:736-42.

Biasoli I, Castro N, Delamain M, et al. Lower socioeconomic status is independently associated with shorter survival in Hodgkin Lymphoma patients- An analysis from the Brazilian Hodgkin Lymphoma Registry. **Int J Cancer** 2017; Oct 11. [Epub ahead of print]

Biasoli I, Stamatoullas A, Meignin V, et al. Nodular, lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma: a long-term study and analysis of transformation to diffuse large B-cell lymphoma in a cohort of 164 patients from the Adult Lymphoma Study Group. **Cancer** 2010; 116:631-9.

Bonadonna G. Historical review of Hodgkin's disease. **Br J Haematol** 2000; 110:504-11.

Boudová L, Torlakovic E, Delabie J. et al. Nodular lymphocyte - predominant Hodgkin lymphoma with nodules resembling T-cell / histiocyte-rich B-cell lymphoma : differential diagnosis between nodular lymphocyte - predominant Hodgkin lymphoma and T-cell / histiocyte-rich B-cell lymphoma. **Blood** 2003; 102:3753-8.

Bröckelmann PJ, Angelopoulou MK, Vassilakopoulos TP. Prognostic factors in Hodgkin lymphoma. **Semin Hematol** 2016; 53:155-64.

Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. **Cell** 2006; 124:263-6.

de Oliveira DE, Bacchi MM, Abreu, ES, Niero-Melo L, Bacchi CE. Hodgkin disease in adult and juvenile groups from two different geographic regions in Brazil: characterization of clinicopathologic aspects and relationship with Epstein-Barr virus infection. **Am J Clin Pathol** 2002; 118:25-30.

de Souza CA, Vassallo J, Lorand-Metze I. Hodgkin's disease in Brazil: a clinicopathologic study. **Haematologica** 1997; 82:127-8.

Eladl AE, Satou A, Elsayed AA., et al. Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma: clinicopathological study of 25 cases from Japan with a reappraisal of tissue associated macrophages. **Pathol Inter** 2015; 65:652-60.

Englund A, Molin D, Enblad G, et al. The role of tumour-infiltrating eosinophils, mast cells and macrophages in classical and nodular lymphocyte predominant Hodgkin Lymphoma in children. **Eur J Haematol** 2016; 97:430-8.

Fanale MA, Cheah CY, Rich A, et al. Encouragin activity for R-CHOP in advanced stage nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. **Blood** 2017; 27: 130: 472-7.

Fan Z, Natkunam Y, Bair E, Tibshirani R, Warnke RA. Characterization of variant patterns of nodular lymphocyte predominant Hodgkin Lymphoma with immunohistologic and clinical correlation. **Am J Surg Pathol** 2003; 27:1346-56.

Farrell K, McKay P, Leach, M. Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma behaves as a distinct clinical entity with good outcome: evidence from 14-year follow-up in the West of Scotland Cancer Network. **Leuk Lymphoma** 2011; 52:1920-8.

Gerber NK, Atoria CL, Elkin EB, Yahalom J. Characteristics and outcomes of Giesta RP. **Estudo do valor preditivo e prognóstico de marcadores imunológicos no linfoma de Hodgkin clássico, no Ceará - Brasil**. São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente e Escola Cearense de Oncologia - ECO].

Glimelius, I, Qvarnström F, Simonsson M, et al. Tissue microarray and digital image analysis: A methodological study with special reference to the microenvironment in Hodgkin Lymphoma. **Histopathology** 2012; 61:26-32.

Gotti M, Nicola M, Lucioni M. Independent prognostic impact of tumour-infiltrating macrophages in early-stage Hodgkin's Lymphoma. **Hematol Oncol** 2017; 35:296-302.

Greaves P, Clear A, Coutinho R. Expression of FOXP3, CD68, and CD20 at diagnosis in the microenvironment of classical Hodgkin Lymphoma is predictive of outcome. **J Clin Oncol** 2013; 3:256-62.

Gualco G, Klumb CE, Barber GN, Weiss LM, Bacchi CE. Pediatric lymphomas in Brazil. **Clinics** 2010; 65:1267-77.

Guo B, Cen H, Tan X, Ke Q. Meta-analysis of the prognostic and clinical value of tumor-associated macrophages in adult classical Hodgkin Lymphoma. **BMC Med** 2016; 14:159.

[HMRN] Haematological Malignancy Research Network. **Incidence**. Available from: <URL:<https://www.hmrn.org/statistics/incidence>> [2017 out 13]

Hansmann ML, Stein H, Fellbaum C, Hui PK, Parwaresch MR, Lennert K. Nodular paraganuloma can transform into high-grade malignant lymphoma of B type. **Hum Pathol** 1989; 20:1169-75.

Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. **Blood** 1994; 84:1361-92.

Hartmann S, Eichenauer D A, Plütschow A, et al. The prognostic impact of variant histology in nodular lymphocyte- predominant Hodgkin Lymphoma: A report from the German Hodgkin Study Group (GHSg). **Blood** 2013. 122:4246-52.

Hicks EB, Rappaport H, Winter WJ. Follicular lymphoma: a re-evaluation of its position in the scheme of malignant lymphoma based on a survey of 253 cases. **Cancer** 1956; 9:792-821.

Jackson C, Sirohi B, Cunningham D, Horwich A, Thomas K, Wotherspoon, A. Lymphocyte-predominant Hodgkin Lymphoma--clinical features and treatment outcomes from a 30-year experience. **Ann Oncol** 2010; 21:2061-68.

Jackson H, Parker F. Hodgkin's disease. **N Engl J Med** 1944; 230:1-8.

Jaffe ES, Campo E, Harris NL, Pileri SA, Stein H, Swerdlow SH. Introduction and overview of the classification of lymphoid neoplasms. In= Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, editors, et al. **WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. Lyon, França: IARC Press; 2017. p.189-98.

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. **WHO classification of tumours: pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. Lyon= IARC Press; 2001. (WHO/IARC Classification of Tumours, 3rd ed., v. 3)

Jaime-Pérez JC, Gamboa-Alonso CM, Padilla-Medina JR, et al. High frequency of primary refractory disease and low progression-free survival rate of Hodgkin's lymphoma: a decade of experience in a Latin American center. **Rev Bras Hematol Hemoter** 2017; 39:325-30.

Josting A. Prognostic factors in Hodgkin lymphoma. **Expert Rev Hematol** 2010; 3:583-92.

Kapp U, Dux A, Schell-Frederick E, et al. Disseminated growth of Hodgkin's-derived cell lines L540 and L540cy in immune-deficient SCID mice. **Ann Oncol** 1994;5 Suppl 1:121-6.

Khoury JD, Jones D, Yared MA, et al. Bone marrow involvement in patients with nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. **Am J Surg Pathol** 2004; 28:489-95.

Klein JL, Nguyen TDT, Bien-Willner GA, et al. CD163 immunohistochemistry is superior to CD68 in predicting outcome in classical Hodgkin Lymphoma. **Am J Clin Pathol** 2014;141:381-87.

Koo TK, Li MY. A guideline of selecting and reporting intraclass correlation coefficients for reliability research. **J Chiropr Med** 2016; 15:155-63.

Küppers R. New insights in the biology of Hodgkin Lymphoma. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program** 2012; 2012:328-34.

Linabery AM, Erhardt EB, Fonstad RK, et al. Infectious, autoimmune and allergic diseases and risk of Hodgkin lymphoma in children and adolescents: a Children's Oncology Group study. **Int J Cancer** 2014; 135:1454-69.

Lukes RJ, Butler JJ. The pathology and nomenclature of Hodgkin's disease. **Cancer Res** 1966; 26:1063-83.

Mack TM, Cozen W, Shibata DK, et al. Concordance for Hodgkin's disease in identical twins suggesting genetic susceptibility to the young-adult form of the disease. **N Eng J Med** 1995; 332:413-8.

Marshall NA, Christie LE, Munro LR, et al. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. **Blood** 2004; 103:1755-62.

Miettinen M, Franssila KO, Saxén E. Hodgkin's disease, lymphocytic predominance nodular. Increased risk for subsequent non-Hodgkin's Lymphomas. **Cancer** 1983; 51:2293-300.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2016.

Montes-Moreno S. Hodgkin's Lymphomas: a tumor recognized by its microenvironment. **Adv Hematol** 2011; 2011:142395.

[NCI] National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. **Cancer stat facts: Hodgkin lymphoma**. Available from: <URL:<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/hodg.html>> 2017 out 12]

Nakatsuka S, Aozasa K. Epidemiology and pathologic features of Hodgkin lymphoma. **Int J Hematol** 2006; 83:391-7.

Nakatsuka S, Aozasa K. Epidemiology and pathologic features of Hodgkin lymphoma. **Int J Hematol** 2006; 83:391-7.

Nathwani BN, Vornanen M, Winkelmann R, et al. Intranodular clusters of activated cells with T follicular helper phenotype in nodular lymphocyte predominant Hodgkin Lymphoma: a pilot study of 32 cases from Finland. **Hum Pathol** 2013; 44:1737-46.

Niens M, Visser L, Nolte IM. Serum chemokine levels in Hodgkin Lymphoma patients: highly increased levels of CCL17 and CCL22. **Br J Haematol** 2008; 140:527-36.

Nogová L, Reineke T, Brilliant C, et al. Lymphocyte-predominant and classical Hodgkin's Lymphoma: a comprehensive analysis from the German Hodgkin Study Group. **J Clin Oncol** 2008; 26:434-39.

Panjwani P, Epari S, Sengar M, Laskar S, Menon H, Shet T. Bone marrow involvement in nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma occurs in tumors with a variant pattern. **Leuk Lymphoma** 2015; 56:236-38.

patients with nodular lymphocyte-predominant Hodgkin Lymphoma versus those with classical Hodgkin Lymphoma: a population-based analysis. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2015; 92:76-83.

Poppema S, Delsol G, Pileri SA, Stein H, Swerdlow SH, Warnke RA, Jaffe ES. Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. In= Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., editors, et al. **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. Lyon, França: IARC Press; 2008. p.323-

Poppema S, Kaiserling E, Lenner K. Hodgkin's disease with lymphocytic predominance, nodular type (nodular paragranuloma) and progressively transformed germinal centres? a cytohistological study. **Histopathology** 1979; 3:295-308.

Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. **Cell** 2010; 141:39-51.

Rahemtullah A, Harris NL, Dorn ME, Preffer FI, Hasserjian RP. Beyond the lymphocyte predominant cell: CD4+CD8+ T-cells in nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. **Leuk Lymphoma** 2008; 49:1870-8.

Rahemtullah A, Reichard KK, Preffer FI, Harris NL, Hasserjian RP. A double-positive CD4+CD8+ T-cell population is commonly found in nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. **Am J Clin Pathol** 2006; 126:805-14.

Roman E, Smith AG. Epidemiology of lymphomas. **Histopathology** 2011; 58:4-14.

Santos S, Melo LR, Koifman RJ. Cancer incidence, hospital morbidity, and mortality in young adults in Brazil. **Cad Saúde Pública** 2013; 29:1029-40.

Schmitz R, Stanelle J, Hansmann ML, Küppers R. Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant hodgkin lymphoma. **Annu Rev Pathol** 2009; 4:151-74.

Soares A, Biasoli I, Scheliga A, et al. Socioeconomic inequality and short-term outcome in Hodgkin's lymphoma. **Int J Cancer** 2007; 120:875-79.

Steidl C, Lee T, Shah SP, et al. Tumor-Associated Macrophages and Survival in Classic Hodgkin's Lymphoma. **N Eng J Med** 2010; 362:875-85.

Stein H, Pileri SA, Weiss LM, Poppema S, Gascoyne RD, Jaffe ES. Hodgkin lymphomas: introduction. In= Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, editors, et al. **WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. Lyon, França: IARC Press; 2017a. p.424-30.

Stein H, Swerdlow SH, Gascoyne RD, Poppema S, Jaffe ES, Pileri SA. Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. In= Swerdlow SH,

Campo E, Harris NL, editors, et al. **WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. Lyon= IARC Press; 2017b. p.4231-34.

Swerdlow SH, Campo, E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon= IARC Press; 2008.

Takahashi K, Kenji A, Norihiro T. Morphological interactions of interdigitating dendritic cells with B and T cells in human mesenteric lymph nodes. **Am J Pathol** 2001; 159:131-8.

Thomsen H, Inacio da Silva Filho M, Fuchs M, et al. Evidence of inbreeding in Hodgkin Lymphoma. **PLoS One** 2016; 11:e0154259.

Vassallo J, Paes RP, Soares FA, et al. Histological classification of 1,025 cases of Hodgkin's lymphoma from the State of São Paulo, Brazil. **Sao Paulo Med J** 2005; 123:134-6.

Visser L, Wu R, Rutgers B, Diepstra A, van den Berg A. Characterization of the microenvironment of nodular lymphocyte predominant Hodgkin Lymphoma. **Int J Mol Sci** 2016; 17:2127.

Wu D, Thomas A, Fromm JR. Reactive T cells by flow cytometry distinguish Hodgkin lymphomas from T cell/histiocyte-rich large B cell lymphoma. **Cytometry Part B: Cytometry B Clin Cytom** 2016; 90: 424-32.

Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature** 2013; 496:445-55.

Xing KH, Savage KJ. Modern management of lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. **Br J Haematol** 2013; 161:316-29.

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



A.C. Camargo Cancer Center
Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA - CEP

São Paulo, 05 de dezembro de 2017.

Ao

Dr. José Vassallo

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em reunião de **05/12/2017**, após analisarem a carta apresentada pelo pesquisador, datada de 29/11/2017, a qual justifica o motivo da não apresentação ao CEP do projeto afiliado intitulado “*Estudo do Microambiente tumoral em Linfoma de Hodgkin Predominância Linfocitária Nodular*”, do aluno de Mestrado Leonardo Lordello de Melo, tomaram ciência de que o referido projeto está contemplado no projeto Departamental apresentado e aprovado neste CEP em 04/08/2015, intitulado: **Estudo do microambiente tumoral e da infecção pelo EBV no linfoma de Hodgkin nas regiões nordeste e sudeste do Brasil**, registro CEP: 2084/15.

Atenciosamente,

Dr. Jefferson Luiz Gross
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Apêndice 2 - Formulário de Coleta de Dados Clínicos - LHPLN

Iniciais:

RGH:

Sexo:

Idade ao diagnóstico:

Data do diagnóstico:

Estádio ao diagnóstico:

Diagnóstico histopatológico no A.C.Camargo Cancer Center:

() sim () não

Número do AP=

Lâminas disponíveis: () sim, especificar:

() não

Blocos disponíveis: () sim, especificar:

() não

Topografia do primário:

Tratamento realizado:

Início do tratamento:

Total de ciclos QT / dose de RT:

Progressão durante o tratamento: () sim, data: / / () não

Remissão completa: () sim, data: / / () não

Recidiva: () sim, data: / / () não

Total de ciclos QT / dose de RT (recidiva):

Início do tratamento (recidiva):

Topografia da recidiva:

Óbito: () sim, data: / / () não

Data da última consulta:

Status última consulta: () vivo, livre de doença () vivo, com doença ()

morto, por outras causas () morto, pela doença () desconhecido

Apêndice 3 - Critérios do Grupo de Estudos de Hogkin Alemão para o Cálculo da SLP

Leonardo Lordello <leomelo@gmail.com> Fri, Oct 28 2016 at 1:27 PM

To: Dennis.eichenauer@uk-koeln.de

Dear Denis Eichenauer,

I'm writting to you to ask for some information about the paper entitled "The prognostic impact of variant histology in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma: a report from the German Hodgkin Study Group (GHSg)", published on Blood 2013.

In your paper, there is no further information about what was considered as progression or relapse, and you have considered progression/relapse as endpoint for calculating progression free survival. What have you considered as your start and end points for statistics?

I'm trying to reproduce your work here in Brazil, and this info would be really relevant for me. I've already contacted Dr Hartmann, but she couldn't provide me this info, but shared your email address with me. Thank you in advance for any help with this issue, Best,

Leonardo Lordello

Dennis Eichenauer <dennis.eichenauer@uk-koeln.de> Sat, Oct 29 2016 at 6:39 PM

To: Leonardo Lordello <leomelo@gmail.com>

Dear Dr. Lordello,

Thank you for your mail.

Progression or relapse included:

- disease progression during treatment or within the first 3 months after treatment (primary disease progression)
- relapse 3 to 12 months after the end of treatment (early relapse)
- more than 12 months after the end of treatment (late relapse)

PFS was defined as time between the completion of all staging examinations and progression, relapse or death.

OS was defined as time between the completion of all staging examinations and

death.

I hope this information helps. If you need any additional information, please contact me.

Best regards,
Dennis

Apêndice 4 – Coeficiente de correlação intraclass (CCI) dos imunomarcadores avaliados. Comparação entre estimativa visual e percentuais informados na avaliação digital através do ImageScope®.

CCI (médias)					
Marcador	Parâmetro	Resultado	IC		p
			95% L.Inf.	95% L.Sup.	
CD20 TMA	3+/2+/1+ Valor bruto	,867 ^c	0,752	0,928	0,000
	3+/2+/1+ Percentual	,707 ^c	0,455	0,843	0,000
	3+/2+ Valor Bruto	,905 ^c	0,824	0,949	0,000
	3+/2+ Percentual	,928 ^c	0,867	0,962	0,000
	3+ Valor Bruto	,912 ^c	0,836	0,953	0,000
	3+ Percentual	,791 ^c	0,611	0,887	0,000
	2+ Valor Bruto	-,119 ^c	-1,082	0,398	0,640
	2+ Percentual	-,654 ^c	-2,077	0,111	0,944
	1+ Valor Bruto	,103 ^c	-0,669	0,518	0,365
	1+ Percentual	-,224 ^c	-1,277	0,342	0,740
CD3 TMA	3+/2+/1+ Valor bruto	,570 ^c	0,201	0,769	0,004
	3+/2+/1+ Percentual	,707 ^c	0,455	0,843	0,000
	3+/2+ Valor Bruto	,688 ^c	0,420	0,833	0,000
	3+/2+ Percentual	,033 ^c	-0,800	0,480	0,458
	3+ Valor Bruto	,462 ^c	-0,001	0,711	0,025
	3+ Percentual	,791 ^c	0,611	0,887	0,000
	2+ Valor Bruto	,313 ^c	-0,277	0,631	0,116
	2+ Percentual	-,654 ^c	-2,077	0,111	0,944
	1+ Valor Bruto	-,681 ^c	-2,127	0,096	0,950
	1+ Percentual	-,224 ^c	-1,277	0,342	0,740
CD4 TMA	3+/2+/1+ Valor bruto	-,114 ^c	-1,073	0,401	0,634
	3+/2+/1+ Percentual	,429 ^c	-0,062	0,693	0,038
	3+/2+ Valor Bruto	-,104 ^c	-1,054	0,407	0,623
	3+/2+ Percentual	,750 ^c	0,536	0,866	0,000
	3+ Valor Bruto	,283 ^c	-0,333	0,615	0,145
	3+ Percentual	,463 ^c	0,000	0,711	0,025
	2+ Valor Bruto	-1,320 ^c	-3,316	-0,247	0,996
	2+ Percentual	-,078 ^c	-1,005	0,421	0,594
	1+ Valor Bruto	,024 ^c	-0,816	0,475	0,469
	1+ Percentual	-,099 ^c	-1,045	0,409	0,618

CD8 TMA	3+/2+/1+ Valor bruto	,612 ^c	0,278	0,791	0,002
	3+/2+/1+ Percentual	,432 ^c	-0,057	0,695	0,037
	3+/2+ Valor Bruto	,909 ^c	0,831	0,951	0,000
	3+/2+ Percentual	,748 ^c	0,532	0,865	0,000
	3+ Valor Bruto	,887 ^c	0,791	0,939	0,000
	3+ Percentual	,439 ^c	-0,044	0,698	0,034
	2+ Valor Bruto	,223 ^c	-0,445	0,583	0,211
	2+ Percentual	-,068 ^c	-0,987	0,426	0,583
	1+ Valor Bruto	-,257 ^c	-1,338	0,324	0,766
	1+ Percentual	-,055 ^c	-0,963	0,433	0,568
CD56 TMA	3+/2+/1+ Valor bruto	,489 ^c	0,049	0,725	0,017
	3+/2+ Valor Bruto	,427 ^c	-0,066	0,692	0,039
	3+ Valor Bruto	,027 ^c	-0,809	0,477	0,465
	2+ Valor Bruto	,413 ^c	-0,092	0,684	0,046
	1+ Valor Bruto	,514 ^c	0,096	0,739	0,012
CD57 TMA	3+/2+/1+ Valor bruto	,740 ^c	0,512	0,861	0,000
	3+/2+ Valor Bruto	,519 ^c	0,099	0,744	0,011
	3+ Valor Bruto	,047 ^c	-0,787	0,492	0,440
	2+ Valor Bruto	,497 ^c	0,056	0,732	0,016
	1+ Valor Bruto	,769 ^c	0,566	0,877	0,000
CD25 TMA	3+/2+/1+ Valor bruto	,096 ^c	-0,681	0,514	0,373
	3+/2+ Valor Bruto	,637 ^c	0,324	0,805	0,001
	3+ Valor Bruto	,019 ^c	-0,824	0,473	0,475
	2+ Valor Bruto	,633 ^c	0,317	0,803	0,001
	1+ Valor Bruto	,098 ^c	-0,678	0,515	0,371
FOXP3 TMA	3+/2+/1+ Valor bruto	,742 ^c	0,521	0,862	0,000
	3+/2+ Valor Bruto	,520 ^c	0,106	0,742	0,011
	3+ Valor Bruto	,287 ^c	-0,327	0,616	0,142
	2+ Valor Bruto	,334 ^c	-0,240	0,642	0,099
	1+ Valor Bruto	,552 ^c	0,167	0,759	0,006
CD68 TMA	3+/2+/1+ Valor bruto	,736 ^c	0,508	0,858	0,000
	3+/2+ Valor Bruto	,912 ^c	0,836	0,952	0,000
	3+ Valor Bruto	,649 ^c	0,347	0,811	0,001
	2+ Valor Bruto	,845 ^c	0,712	0,917	0,000
	1+ Valor Bruto	,745 ^c	0,525	0,863	0,000
CD163 TMA	3+/2+/1+ Valor bruto	,696 ^c	0,434	0,836	0,000
	3+/2+ Valor Bruto	,881 ^c	0,778	0,936	0,000
	3+ Valor Bruto	,644 ^c	0,338	0,809	0,001
	2+ Valor Bruto	,847 ^c	0,715	0,918	0,000

S100 TMA	1+ Valor Bruto	,772 ^c	0,575	0,877	0,000
	3+/2+/1+ Valor bruto	,917 ^c	0,846	0,956	0,000
	3+/2+ Valor Bruto	,877 ^c	0,772	0,934	0,000
	3+ Valor Bruto	,755 ^c	0,544	0,868	0,000
	2+ Valor Bruto	,470 ^c	0,014	0,715	0,022
	1+ Valor Bruto	,352 ^c	-0,206	0,652	0,085

Em destaque os maiores CCI.