

Mariângeles Auat

**INVESTIGAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DOS MARCADORES
IMUNOFENOTÍPICOS CD150 E CD307a PARA O
DIAGNÓSTICO DE NEOPLASIAS DE CÉLULAS
LINFOIDES B MADURAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Farmácia, Área de concentração Análises Clínicas.
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Cláudia Santos da Silva

FLORIANÓPOLIS
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Auat, Mariângeles

Investigação da importância dos marcadores
imunofenotípicos CD150 e CD307a para o diagnóstico de
neoplasias de células linfóides B maduras /
Mariângeles Auat ; orientadora, Maria Cláudia
Santos da Silva - SC, 2017.

119 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis,
2017.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Imunofenotipagem por citometria
de fluxo. 3. CD150. 4. CD307a . 5. Neoplasias de
células linfóides B maduras. I. Santos da Silva ,
Maria Cláudia . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III.
Titulo.

Mariângeles Auat

**INVESTIGAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DOS MARCADORES
IMUNOFENOTÍPICOS CD150 E CD307A PARA O
DIAGNÓSTICO DE NEOPLASIAS DE CÉLULAS LINFOIDES B
MADURAS**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Farmácia e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia, pela orientadora e pelos membros da Banca Examinadora.

Florianópolis, 23 de fevereiro de 2017.

Profª. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Banca Examinadora:

Profª. Drª. Maria Cláudia Santos da Silva (Orientadora)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Mário Steindel
Universidade Federal de Santa Catarina (Membro Titular)

Dr. Alex Freire Sandes
Fleury Medicina e Saúde (Membro Titular)

Profª. Drª. Iara Fabricia Kretzer
Universidade Federal de Santa Catarina (Membro Suplente)

Dedico este trabalho à minha família que sempre me acompanha sem importar onde eu esteja e ao meu namorado Marcelo que me trouxe até aqui

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Dr^a. Maria Cláudia Santos da Silva, pela oportunidade e ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC e ao Hospital Universitário.

À CAPES, e à FAPESC pelo financiamento.

Ao HEMOSC, em especial ao pessoal do Laboratório de Marcadores Celulares.

Ao Professor Dr. Antonio de Pádua Carobrez e aos colegas do Laboratório de Neurobiologia do Comportamento.

À Professora Ana Carolina Rabello de Moraes pelo auxílio com a estatística.

Aos colegas do Laboratório de Oncologia Experimental e Hematologia (LOEH), em especial à Renata pela parceria.

Às estagiárias mais legais Bárbara e Jéssica

Aos colegas da Divisão de Análises Clínicas do Hospital Universitário da UFSC, em especial e às bioquímicas do setor de hematologia Adriana e Marlene pela boa predisposição e colaboração.

Um agradecimento muito especial às bioquímicas Camila, Chandra e Iris que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À Malu pela ajuda com o português e ao meu primo Dani pela ajuda com o inglês.

Às Churras, que são minha família brasileira e que fizeram mais leve a falta da família argentina.

“A verdadeira ciência ensina sobretudo a duvidar e a ser ignorante”

(Miguel de Unamuno)

RESUMO

O diagnóstico das neoplasias de células linfóides B maduras (NCLBM) é baseado nos exames histopatológicos, imunofenotípicos, citogenéticos e moleculares. Atualmente, a imunofenotipagem por citometria de fluxo é considerada uma ferramenta fundamental para o diagnóstico dessas neoplasias e existe uma tendência de tentar alcançar a subclassificação correta das NCLBM com apenas a avaliação do imunofenótipo. No entanto, devido à sobreposição fenotípica, esse propósito não pode ser atingido em todos os casos. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar a importância dos novos marcadores imunofenotípicos CD150 e CD307a para o diagnóstico diferencial das NCLBM. Por conseguinte, foi avaliada a expressão de ambos antígenos por meio da citometria de fluxo em 120 amostras de pacientes portadores de NCLBM. As amostras foram marcadas com o painel anticorpos monoclonais pela técnica de marcação direta e a expressão de CD150 e CD307a foi avaliada por meio da intensidade de fluorescência média (IFM) nas células B neoplásicas e qualitativamente por meio da comparação com o controle negativo interno. Os resultados mostram que existe uma expressão diferencial do antígeno CD150 entre os casos de linfoma de Burkitt (LB) e as neoplasias de células B precursoras, portanto, a expressão de CD150 parece ser útil na identificação dos casos de LB com características fenotípicas de precursor B. A forte expressão de CD150 nos dois casos de linfoma folicular (LF) grau 3A avaliados sugerem que esse marcador é importante para o diagnóstico diferencial desse subtipo de NCLBM e o LF de baixo grau. A perda da expressão de CD150 observada nos plasmócitos clonais dos linfomas com diferenciação plasmocitária (LDP), representa um achado inédito e a única alteração fenotípica observada em todos os casos de LDP estudados. Foi observado que todos os casos de linfoma de células do manto (LCM) apresentaram diminuição da expressão de CD307a em relação aos linfócitos B normais. Em contrapartida, a expressão desse marcador no grupo das leucemias linfóides crônicas (LLC) foi heterogênea com casos totalmente negativos até casos com expressão forte e maior à observada nos linfócitos B normais. Assim, pode ser inferido que a expressão moderada e forte desse marcador poderia excluir o diagnóstico de LCM. Foi corroborado que tanto o marcador CD150 quanto o CD307a apresentam menor expressão nos casos de LLC com marcadores prognósticos desfavoráveis. Em vista dos resultados obtidos, a inclusão desses marcadores no painel imunofenotípico de rotina pode contribuir

com o aprimoramento da imunofenotipagem por citometria de fluxo para o diagnóstico diferencial das NCLBM.

Palavras chaves: CD150, CD307a, imunofenotipagem por citometria de fluxo, neoplasias de células linfoides B maduras.

ABSTRACT

Diagnosis of mature B cell neoplasms (MBCN) is based on results yielded by histopathological, immunophenotypic, cytogenetic and molecular analysis. Consequently, flow cytometric immunophenotyping is deemed fundamental as a tool for B cell neoplasms diagnosis. Given the advantages this methodology provides, there exists a tendency to attempt to fully subclassify MBCN solely on the basis of flow cytometric immunophenotyping results. However, due to the existence of overlapping phenotypes this aim is not achieved in every single case. Because of that, the goal of the present study was to investigate on the importance of novel immunophenotypic markers CD150 and CD307a in the differential diagnosis of the MBCN. To accomplish that, the expression of both antigens was analyzed in 120 samples taken from patients diagnosed with MBCN. Samples were assessed with a panel of monoclonal antibodies using a direct staining protocol and the CD150 and CD307a expression was quantitated by calculating the mean fluorescence intensity (MFI) for neoplastic B cell in each case, and was also ascertained in qualitative terms in comparison with internal negative control. A differential expression of CD150 has been proven to exist between Burkitt lymphoma (BL) and precursor B cell neoplasms cases; therefore, the expression of CD150 might identify BL patients with phenotypic features of B cell precursors. Both follicular lymphoma (FL) grade 3A cases studied showed high homogenic levels of that marker, which becomes relevant in differential diagnosis of that entity with low grade FL. Neoplastic plasma cells of B cell lymphomas with plasmacytic differentiation (LPD) showed a loss of expression of CD150 when compared to normal polyclonal plasma cells. Such decrease was the only phenotypic aberration observed in every LPD sample evaluated. It was also ascertained that every mantle cell lymphoma (MCL) case showed lower levels of CD307a in comparison to normal B cell population. Differently, a spectrum of CD307a expression, from negative to bright, was seen in chronic lymphocytic leukemia (CLL). Thus, moderate and bright CD307a expression virtually excludes MCL diagnosis. A lower expression of both markers in CLL patients with unfavorable prognosis was confirmed in this study. In conclusion, these results suggest that the inclusion of both markers in an immunophenotypic panel could improve the differential diagnosis of MBCN by flow cytometry.

Keywords: CD150, CD307a, flow cytometry immunophenotyping, mature B cells neoplasms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Origem celular das principais neoplasias de células linfoides B maduras.	35
Figura 2. Algoritmo de Hans para a classificação dos subtipos de LDGCB por meio da técnica de IHQ.	41
Figura 3. Expressão qualitativa dos resultados.	56
Figura 4. Estratégia de <i>gating</i> para a identificação das subpopulações de linfócitos.	57
Figura 5. Análise dos controles negativos para cada um dos anticorpos monoclonais em estudo.	62
Figura 6. Expressão do antígeno CD150 no SP de um caso representativo do grupo controle.	63
Figura 7. Expressão do antígeno CD150 nas subpopulações de células T CD8 no SP.	64
Figura 8. Expressão de CD150 em linfócitos T e B após a ativação.	65
Figura 9. Expressão de CD150 nas subpopulações de células B no SP.	66
Figura 10. Expressão de CD307a no SP de um caso representativo do grupo controle.	67
Figura 11. Expressão dos antígenos CD150 e CD307a nos diferentes estágios de diferenciação B em MO do grupo controle.	68
Figura 12. Expressão de CD150 nas diferentes NCLBM.	71
Figura 13. Diagrama APS dos casos de LF grau 3A versus LF grau 1 e 2 e LDGCB CD10 positivo.	72
Figura 14. Distribuição da expressão de CD150 de acordo a expressão de marcadores de prognóstico nos pacientes portadores de LLC.	73
Figura 15. Identificação de células B normais residuais em uma amostra de LLC negativa para CD307a.	75
Figura 16. Expressão de CD307a nas diferentes NCLBM.	76
Figura 17. Distribuição da expressão de CD307a de acordo a expressão dos marcadores prognósticos nos pacientes portadores de LLC.	77
Figura 18. Expressão de CD307a segundo o local anatômico em pacientes com amostras pareadas.	78
Figura 19. Expressão de CD150 e CD307a na população plasmocitária.	79
Figura 20. Comparação da expressão de CD150 e CD307a na população plasmocitária.	80

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Classificação da OMS das neoplasias de células linfóides B maduras.	29
Quadro 2. Perfis imunofenotípicos característicos das principais NCLBM.....	39
Quadro 3. Sistema de pontuação para LLC.	40
Quadro 4. Abordagem da imunofenotipagem por citometria de fluxo na classificação das NCLBM.....	46
Quadro 5. Painéis com a combinação de anticorpos monoclonais utilizados.	53
Quadro 6. Marcadores usados para a identificação dos estágios de diferenciação das células B.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cálculo amostral para os subtipos de neoplasias de células linfoides B maduras.....	50
Tabela 2. Valores da mediana de IFM para cada população celular no SP do grupo controle.	64
Tabela 3. Valores de medianas IFM para cada subpopulação de precursores linfoides B na MO.....	67
Tabela 4. Resultados da análise qualitativa e quantitativa da expressão de CD150 nas NCLBM.....	69
Tabela 5. Resultados da análise qualitativa e quantitativa da expressão de CD307a nas NCLBM.	75
Tabela 6. Resultados da análise quantitativa da expressão de CD150 e CD307a na população plasmocitária.	79

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	aloficocianina (do inglês <i>allophycocyanin</i>)
BCR	receptor de células B
CD	do inglês <i>cluster of differentiation</i>
CG	centro germinativo
CRAB	do inglês <i>calcium, renal failure, anemia, bone lesions</i>
DACL	Divisão de Análises Clínicas
HU/UFSC	Hospital Universitário. Universidade Federal de Santa Catarina
DRM	doença residual mínima
EGIL	do inglês <i>European Group for the Immunological Characterization of Leukemias</i>
FAB	do inglês <i>French-American-British group</i>
FcRH	do inglês <i>Fc receptor homologs</i>
FcRL	do inglês <i>Fc receptor like</i>
FISH	do inglês <i>fluorescence in situ hybridization</i>
FITC	isotiaocianato de fluoresceína
FMO	do inglês <i>fluorescence minus one</i>
GMSI	gamopatia monoclonal de significado indeterminado
HEMOSC	Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina
HLDA	do inglês <i>Human Leucocyte Differentiation Antigens</i>
HMS	hipermutação somática
IFM	Intensidade de fluorescência média
Ig	imunoglobulina
IGH	genes da cadeia pesada de imunoglobulina
IGV	genes da região variável das cadeias da imunoglobulina
IGVH	genes da região variável da cadeia pesada de imunoglobulina
IHQ	imuno-histoquímica
IRTA	do inglês <i>immunoglobulin superfamily receptor translocation-associated genes</i>
LB	linfoma de Burkitt
LCB	linfoma de células B
LCM	linfoma de células do manto
LCP	leucemia de células plasmocitárias
LDGCB	linfoma difuso de grandes células B

LDGCB-ABC	linfoma difuso de grandes células B de tipo células B ativadas
LDGCB-GCB	linfoma difuso de grandes células B de tipo células B do centro germinativo
LDP	linfomas com diferenciação plasmocitária
LF	linfoma folicular
LL	linfoma linfocítico de células B pequenas
LLA-B	leucemia linfoblástica aguda B
LLC	leucemia linfoide crônica
LLPL	linfoma linfoplasmocítico
LNH	linfoma não Hodgkin
LP-B	leucemia prolinfocítica
LZM	linfomas da zona marginal
LZME	linfoma B da zona marginal esplênica
LZMN	linfoma da zona marginal nodal
MALT	linfoma da zona marginal extranodal do tecido linfoide associado à mucosa
MM	mieloma múltiplo
MO	medula óssea
NCB	neoplasias de células B
NCLBM	neoplasias de células linfoides B maduras
NCP	neoplasias de células plasmocitárias
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAAF	punção aspirativa por agulha fina
PE	ficoeritrina
PHA	fito-hemaglutinina
RMC	recombinação de mudança de classe
SFB	soro fetal bovino
SLAMF	do inglês <i>Signaling Lymphocytic Activation Molecule</i>
SP	sangue periférico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TRL	tricoleucemia
UA	unidades arbitrárias

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	25
2.	REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1	Neoplasias de células linfoides	27
2.2	Classificação das neoplasias de células linfoides	27
2.3	Patogênese e origem celular das NCLBM	30
2.3.1	Maturação das células B	30
2.3.2	Eventos transformantes nas NCLBM	31
2.3.3	Origem celular das NCLBM	32
2.4	Epidemiologia	36
2.5	Diagnóstico.....	37
2.6	Imunofenotipagem por citometria de fluxo nas NCLBM.....	38
2.7	Avaliação imunofenotípica das NCP.....	41
2.8	Novos marcadores imunofenotípicos	43
3.	JUSTIFICATIVA	45
4.	OBJETIVOS.....	47
4.1	Objetivo geral	47
4.2	Objetivos específicos.....	47
5.	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	49
5.1	Crterios de inclusão e exclusão	49
5.2	Local e população de estudo.....	49
5.3	Grupo controle do estudo	51
5.4	Estudo genético e molecular	51
5.5	Imunofenotipagem por citometria de fluxo	52
5.5.1	Procedimento de marcação.....	52
5.5.2	Controles de marcação.....	54
5.5.3	Expressão dos resultados	55
5.5.4	Análise e identificação das diferentes populações celulares.....	56
5.6	Ativação de Linfócitos in vitro	58
5.7	Análise estatística dos dados	59
6.	RESULTADOS.....	61
6.1	Avaliação dos controles de marcação	61
6.2	Caracterização dos marcadores CD150 e CD307a no grupo controle. 63	
6.3	Expressão de CD150 nas NCLBM.....	69
6.4	Expressão de CD307a nas NCLBM	73
6.5	Expressão de CD150 e CD307a nas NCP	78
7.	DISCUSSÃO	81
8.	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS.....	91
	APÊNDICES.....	103

1. INTRODUÇÃO

Os tumores originados no tecido linfóide compreendem um grupo diverso de doenças com características morfológicas, imunológicas, genéticas e clínicas bastante diferentes entre si. As neoplasias de células B (NCB) incluem as proliferações clonais das células B maduras e imaturas. Devido a ampla variedade de entidades compreendidas dentro desses grupos de doenças foram realizadas ao longo dos anos múltiplas classificações para tentar agrupar essas neoplasias de acordo com as suas características representativas, específicas e clinicamente relevantes e, dessa forma, obter as bases clínicas para o diagnóstico, terapia e prognóstico das mesmas. Os modelos de classificação estão baseados nas possibilidades metodológicas e como estão sujeitas a mudança e evolução contínua, também existe uma alteração constante nas classificações (NIERMANN et al., 2013).

As primeiras classificações das NCB, nas décadas dos anos 60 e 70, eram baseadas apenas na análise citomorfológica e histológica, como por exemplo, a classificação proposta pelo grupo FAB (do inglês *French-American-British group*) no ano 1976 ou a classificação Rappaport em 1964. Posteriormente, surgiram as técnicas imunológicas que permitiram conhecer o fenótipo das células neoplásicas. Assim, as novas classificações, como a EGIL (do inglês *European Group for the Immunological Characterization of Leukemias*) e Kiel, estavam fundamentadas nos dados morfológicos e imunofenotípicos (ISAACSON, 2000). Nas últimas décadas, as técnicas citogenéticas e moleculares se converteram em ferramentas cruciais na classificação das neoplasias hematológicas, pois proporcionam informação relevante para a compreensão da patogênese dessas doenças. Além disso, permitem o diagnóstico preciso e o prognóstico dessas doenças, o que facilita a escolha das terapias e o desenvolvimento de novas formas de tratamento (BAIN, 2010). Sendo assim, atualmente, a classificação das neoplasias hematológicas aceita mundialmente é a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), que combina os critérios clínicos, morfológicos, imunofenotípicos e genéticos para definir os subtipos de tumores dos tecidos hematopoiético e linfóide (ISAACSON, 2000; SWERDLOW et al., 2008). Dessa forma, a imunofenotipagem das células neoplásicas é essencial para o diagnóstico e classificação das neoplasias linfóides, e pode ser realizada por meio de duas técnicas: a imuno-histoquímica (IHQ) e a citometria de fluxo. Na comparação de ambas metodologias, percebe-se que a citometria de fluxo apresenta várias

vantagens em relação ao IHQ como, por exemplo, a análise de um maior número de células por amostra, o que aumenta a sensibilidade, menor variabilidade dependente do operador, avaliação multiparamétrica das células, identificação e detecção simultânea de antígenos intracelulares e de superfície na mesma célula e uma maior rapidez na obtenção dos resultados. Nos últimos anos, muitos progressos foram alcançados em instrumentação, novos anticorpos, fluorocromos e programas de análise. Por esse motivo, a imunofenotipagem por citometria de fluxo é atualmente uma ferramenta imprescindível para o diagnóstico hematopatológico (REGO & SANTOS, 2009). No entanto, apesar dessa metodologia fornecer conclusões excelentes na maioria dos casos, existem algumas situações nas quais, devido à sobreposição das características imunofenotípicas, o diagnóstico diferencial não pode ser concluído, necessitando-se de outras metodologias. Em vista disso, o foco do presente estudo foi a avaliação por citometria de fluxo de novos marcadores imunofenotípicos que possam contribuir para o diagnóstico diferencial das neoplasias de células linfoides B maduras (NCLBM).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Neoplasias de células linfoides

As neoplasias de células linfoides abrangem um espectro amplo de linfomas e leucemias derivadas de linfócitos B, T ou NK e são caracterizadas pela proliferação clonal dessas células. O processo de diferenciação linfoide inclui uma série de etapas de recombinação do DNA a fim de criar o extenso repertório das imunoglobulinas (linfócitos B) ou receptores TCR (linfócitos T). As neoplasias linfoides desenvolvem-se como resultado da aquisição de anormalidades genéticas durante a diferenciação normal, portanto, podem ser divididas em neoplasias de células linfoides precursoras ou neoplasias de células linfoides maduras (SWERDLOW et al., 2008; BOTTCHEER et al., 2010; MALONEY, 2012). Também podem ser subdivididas de acordo com o local onde ocorre a proliferação clonal em leucemias e linfomas. A leucemia linfoide é uma neoplasia que compromete a medula óssea (MO) e geralmente o sangue periférico (SP), já o termo linfoma se refere à doença caracterizada pela proliferação das células neoplásicas de origem linfoide nos tecidos extramedulares, tais como linfonodo, baço, timo e pele (BAIN, 2010).

2.2 Classificação das neoplasias de células linfoides

Segundo a literatura, o primeiro linfoma descrito foi o linfoma de Hodgkin no ano 1832 pelo médico inglês Thomas Hodgkin (STONE, 2005). Posteriormente, em 1967, Alan C. Aisenberg propôs o termo linfoma não Hodgkin (LNH) para denominar as doenças linfoides com características histológicas diferentes daquelas encontradas no linfoma de Hodgkin (ROBB-SMITH, 1982).

Inicialmente, a classificação das neoplasias linfoides era baseada na morfologia das células, mas com os avanços na tecnologia essa classificação tem evoluído a um processo multimodal, o qual combina a informação morfológica, imunofenotípica e genética, além de considerar os dados clínicos, como a forma de apresentação e o curso da doença. A classificação de tumores dos tecidos hematopoiético e linfoide da OMS, publicada em 2001 e atualizada em 2008, tornou-se o consenso internacional para o diagnóstico das neoplasias hematológicas, e é o primeiro sistema de classificação aceito mundialmente (TUTE, 2011). Já está disponível a revisão da classificação da OMS-2016 das neoplasias linfoides (SWERDLOW et al., 2016a), a qual incorpora a nova

informação coletada das publicações dos últimos 8 anos, importantes para o diagnóstico, prognóstico e terapias dessas doenças. A OMS subclassifica as neoplasias linfoides de forma hierárquica, primeiro de acordo com o estágio de maturação da célula em expansão e em seguida de acordo com a linhagem celular (SWERDLOW et al., 2008). Dentro das neoplasias de células linfoides maduras, 85% a 90% são originadas de células B e as restantes derivam de células T ou NK (SHANKLAND et al., 2012; KUPPERS, 2005).

A maioria das NCLBM são descendentes clonais dos linfócitos B nos diferentes estágios da diferenciação normal. Esse fato pode ser observado pela semelhança no imunofenótipo, aspecto histológico e perfis de expressão gênica das células neoplásicas. A OMS baseia-se nesse princípio para a classificação dos aproximadamente 30 subtipos de linfomas B (SWERDLOW et al., 2008; SCOTT & GASCOYNE, 2014; MALONEY, 2012; SWERDLOW et al., 2016a). O Quadro 1 mostra a classificação da OMS das NCLBM de acordo com a revisão do 2016, que apresenta algumas modificações e novas entidades provisionais em relação à classificação de 2008.

Ao contrário das neoplasias de células linfoides B precursoras, que comumente se manifestam como leucemias, a maioria das NCLBM geralmente se apresentam como linfomas, mas podem desenvolver uma fase leucêmica durante o curso da doença. Isso frequentemente se observa no linfoma de células do manto (LCM) e às vezes no linfoma folicular (LF). Existem algumas NCLBM que são primariamente leucêmicas, a leucemia linfóide crônica (LLC), a tricoleucemia (TRL) e a leucemia prolinfocítica, (LP-B). No caso da LLC pode apresentar uma proliferação neoplásica homóloga nos tecidos, a qual é denominada de linfoma linfocítico (LL) de células pequenas, onde não se observa linfocitose no SP (BAIN, 2010).

Quadro 1 Classificação da OMS das neoplasias de células linfoides B maduras.

Leucemia linfóide crônica/linfoma linfocítico (LLC/LL)
Linfocitose monoclonal de células B
Leucemia prolinfocítica B (LP-B)
Linfoma B da zona marginal esplênica (LZME)
Tricoleucemia (TRL)
<i>Linfoma/leucemia esplênica de células B, inclassificável.</i>
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Linfoma esplênico difuso da polpa vermelha, de linfócitos B pequenos.</i> • <i>Tricoleucemia variante (TRL-V)</i>
Linfoma linfoplasmocítico (LLPL)
<ul style="list-style-type: none"> • Macroglobulinemia de Waldenström (MW)
Gamopatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS) IgM
Doença da cadeia pesada alfa
Doença da cadeia pesada gama
Doença da cadeia pesada mu
Gamopatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS), IgG/IgA
Mieloma múltiplo (MM)
Plasmocitoma solitário do osso
Plasmocitoma extraósseo
Doença de deposição de imunoglobulinas monoclonais
Linfoma da zona marginal extranodal do tecido linfóide associado à mucosa (Linfoma MALT)
Linfoma da zona marginal nodal (LZMN)
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Linfoma da zona marginal nodal pediátrico (LZMN-P)</i>
Linfoma folicular (LF)
<ul style="list-style-type: none"> • Neoplasia folicular in situ • Linfoma folicular tipo duodenal • Linfoma folicular pediátrico (LF-P)
<i>Linfoma de grandes células B com rearranjo IRF4</i>
Linfoma centrofolicular primário da pele (LF-Pele)
Linfoma de células do manto (LCM)
<ul style="list-style-type: none"> • Neoplasia de células de manto in situ
Linfoma difuso de grandes células B, SOE (LDGCB,SOE)
<ul style="list-style-type: none"> • Linfoma difuso de grandes células B de tipo células B do centro germinativo (LDGCB-GCB) • Linfoma difuso de grandes células B de tipo células B ativadas (LDGCB-ABC)
Linfoma de grandes células B rico em células T e histiócitos
Linfoma difuso de grandes células B do sistema nervoso central
Linfoma difuso de grandes células B da pele, tipo “da perna”
Linfoma difuso de grandes células B EBV-positivo sem outras especificações
Úlcera mucocutânea EBV-positiva
Linfoma difuso de grandes células B associado à inflamação crônica (LDGCB-IC)
Granulomatose linfomatoide (GL)
Linfoma de grandes células B do mediastino (tímico) (LGCB-Med)
Linfoma de grandes células B intravascular (LGCB-IV)
Linfoma de grandes células B ALK-positivo (LGCB-ALK+)
Linfoma plasmoblástico (LPb)
<i>Linfoma de grandes células B com origem na D. de Castlemann multicêntrica associada ao IIIIV-8, SOE</i>
Linfoma primário de efusões (LPE)
Linfoma de Burkitt (LB)
<i>Linfoma Burkitt like com aberração 11q</i>
Linfoma de células B de alto grau com rearranjos MYC, BCL2 c/ou BCL6
Linfoma de células B de alto grau sem outras especificações
Linfoma de células B inclassificável, com características intermediárias entre o LDGCB e o Linfoma de Hodgkin (LBI-LDGCB/LH).

Fonte: SWERDLOW et al., 2016a; ZERBINI et al., 2011. Nota: Texto em itálico: entidades provisionais. Texto em negrito: câmbios respeito da classificação 2008.

2.3 Patogênese e origem celular das NCLBM

2.3.1 Maturação das células B

A maturação das células B começa nos precursores na MO e para alcançar a correta formação do receptor de antígenos (BCR) é necessária a modificação do DNA. O principal componente do BCR é a molécula de imunoglobulina (Ig) expressa na membrana da célula cujos genes se encontram em uma configuração germinal sob a forma de segmentos gênicos que precisam ser recombinados para a produção do receptor antigênico. Dessa forma, acontece o rearranjo da região variável dos genes das cadeias pesadas e leves das Ig (IGV) por meio de um mecanismo denominado recombinação V(D)J. As células que expressam o BCR funcional se diferenciam em células B virgens (que ainda não foram expostas a nenhum antígeno) as quais abandonam a MO e migram para os órgãos linfoides secundários, onde podem entrar em contato com algum antígeno (KUPPERS, 2005).

Após o encontro com o antígeno as células B virgens são ativadas graças à interação com as células T CD4 nos tecidos linfoides e, dessa forma, formam dentro dos folículos primários os centros germinativos (CG). Dentro do CG, as células B sofrem modificações no DNA genômico por meio de dois mecanismos: a hipermutação somática (HMS) e a recombinação de mudança de classe (RMC). A HMS modifica as regiões variáveis da Ig mediante a introdução de mutações pontuais, deleções ou duplicações nos genes IGV previamente rearranjados a fim de gerar células B de memória e plasmócitos com a capacidade de produzir anticorpos com maior afinidade pelo antígeno. A RMC permite a troca da cadeia pesada de Ig, assim a classe de Ig pode variar de IgM para IgG, IgA ou IgE (KUPPERS, 2005; NOGAI et al., 2011). Histologicamente, o CG é composto por uma zona escura que contém as células B em proliferação (centroblastos) onde ocorre a HMS, e pela zona clara, a qual é rica em centrócitos, e é o local onde acontece a seleção positiva das células B de acordo com a afinidade pelo antígeno e, na maioria dos casos, sofrem a RMC. As células B que após a HMS perdem a capacidade de união com o antígeno são selecionadas negativamente e morrem por apoptose (LENZ & STAUDT, 2010; BASSO & DALLAFAVERA, 2015).

2.3.2. Eventos transformantes nas NCLBM

Um grande número de NCLBM está associado a translocações cromossômicas entre os loci da Ig e o lócus de um proto-oncogene e, como consequência da translocação, ocorre a desregulação e a expressão constitutiva do oncogene. Os três mecanismos que modificam o DNA e estão implicados na maturação normal das células B, são também os que estão envolvidos na transformação maligna das células. Assim, as translocações associadas às NCLBM podem ser divididas em três grupos de acordo com o mecanismo que foi gerada, o qual pode ser identificado a partir do local dos pontos de quebra nos loci da Ig, como segue abaixo:

1. Translocações derivadas de erros durante a recombinação V(D)J como, por exemplo, a t(14;18) observada na maioria dos casos de LF, na qual estão implicados o lócus da cadeia pesada da Ig (IGH) e o gene BCL2. Os pontos de quebra nesses casos são observados nos segmentos gênicos J_H ou D_H da região variável da IGH.
2. Translocações que ocorrem como subprodutos da HMS, onde os pontos de quebra se encontram dentro ou adjacente aos genes V(D)J rearranjados. O processo da HMS também pode ser responsável por introduzir mutações pontuais nos oncogenes. Esse mecanismo pode ter como alvo ocasional outros genes além das regiões variáveis da Ig como, por exemplo, o gene BCL6
3. Os pontos de quebra na região constante da Ig são resultado de eventos ocorridos durante a RMC (KUPPERS et al., 1999; NOGAI et al., 2011)

Dois dos mecanismos moleculares que podem causar translocações cromossômicas ou mutações nos genes das Ig ocorrem no CG. Esse aspecto pode ser a causa pela qual a maioria das NCLBM derivam de células B do CG ou pós-CG. A HMS e a RMC não ocorrem no DNA das células T, o que pode explicar a razão das células B serem mais suscetíveis a transformação maligna (KUPPERS, 2005).

As translocações cromossômicas que ocorrem nos linfomas interrompem a homeostase normal por três mecanismos. O primeiro é um aumento na proliferação das células B observado, por exemplo, nos linfomas de Burkitt (LB), onde estão presentes translocações que envolvem o fator de transcrição c-MYC, o qual promove a expansão clonal das células B. O bloqueio da apoptose devido à super-expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 é observada no LF e alguns casos de linfoma difuso de grandes células B (LDGCB). A inibição da apoptose, também pode ser consequência da ativação do fator de transcrição NF-

κ B, a qual é observada no LDGCB e nos linfomas da zona marginal (LZM). O terceiro mecanismo descrito é o bloqueio na diferenciação, o qual é o produto de translocações e mutações no gene BCL6 que impedem a diferenciação plasmocitária e promovem a proliferação das células B no CG (SHAFFER et al., 2002).

2.3.3 Origem celular das NCLBM

A origem celular das NCLBM pode ser avaliada pelas semelhanças morfológicas, imunofenóticas e o estado mutacional dos genes IGV das células neoplásicas em relação às células B normais. Desse modo, acredita-se que as células com presença de mutações nos genes IGV são derivadas das células que passaram pela reação no CG (KUPPERS et al., 1999). Consequentemente, os LCM que exibem quase exclusivamente ausência de mutações nos genes IGV são derivados de células B virgens (pré-CG) da zona do manto (NOGAI et al., 2011). No entanto, na revisão da classificação da OMS das neoplasias linfoides foram reconhecidas variantes indolentes dos LCM, o que revela a participação de duas vias no desenvolvimento do LCM. Assim, foi observado que o LCM também pode ser derivado de células B com mutações nos genes IGV, caracterizado pelo comprometimento da MO, SP e baço. Essa neoplasia é denominada LCM leucêmico não nodal e apresentam um curso clínico menos agressivo (SWERDLOW et al., 2016a).

Os LZM são originados a partir de células B pós-CG, que estão presentes na zona marginal dos folículos linfoides e são reconhecidos três subtipos dentro dessa categoria: o LZM extranodal do tecido linfoide associado à mucosa (linfoma MALT), o linfoma da zona marginal esplênica (LZME) e o linfoma da zona marginal nodal (LZMN) (SWERDLOW et al., 2008; ZINZANI, 2012). As células da TRL apresentam mutações somáticas e troca da classe de Ig, o que indica que são derivadas de células pós-CG que sofreram HMS e RMC (BASSO et al., 2004; TIACCI et al., 2006). Acredita-se que a origem celular dos linfomas linfoplasmocíticos (LLPL) são células B que passaram pela reação no CG, as quais são detidas antes da diferenciação final a plasmócitos. Essas células sofreram HMS, porém houve uma falha na RMC (NEPARIDZE & DHODAPKAR, 2009; GHOBRIAL, 2012), razão pela qual a maioria dos LLPL estão associados à expressão de IgM, e menos frequentemente de IgG ou de IgA (LIN et al., 2011). Além disso, considera-se que o bloqueio na diferenciação final a plasmócitos é incompleto e apresentam diferenciação plasmocitária, a qual é

evidenciada pela presença de plasmócitos e células plasmocitoides (SWERDLOW et al., 2016b).

Atualmente, sabe-se que podem ser produzidas células B de memória fora do CG em respostas imunes independentes das células T, onde raramente ocorre a RMC, mas pode haver HMS, embora não seja obrigatória nesses tipos de respostas (SHAFFER et al., 2002). Esse fato questiona a origem celular de várias das NCLBM, entre elas a LLC. O estado mutacional dos genes da região variável da cadeia pesada de Ig (IGVH) nas LLC é diverso, e são encontradas LLC mutadas e não mutadas, o que dificulta a avaliação da origem celular nessa doença. Não há dúvida que as LLC com mutações somáticas nos genes IGVH derivam de células B de memória pós-CG, mas existem incertezas da origem celular das LLC não mutadas (FERRARINI, 2009). A avaliação dos perfis de expressão gênica demonstrou semelhanças entre ambos subtipos de LLC. Todas essas informações conduzem à atual hipótese que as LLC são derivadas de células B que tiveram contato com o antígeno, porém os tipos de encontro com eles ocorreram de forma diferente. Considera-se que as LLC sem evidência de HMS adquiriram um fenótipo de célula B de memória fora do CG e independente das células T (CHIORAZZI et al., 2005; FABBRI & DALLA FAVERA, 2016).

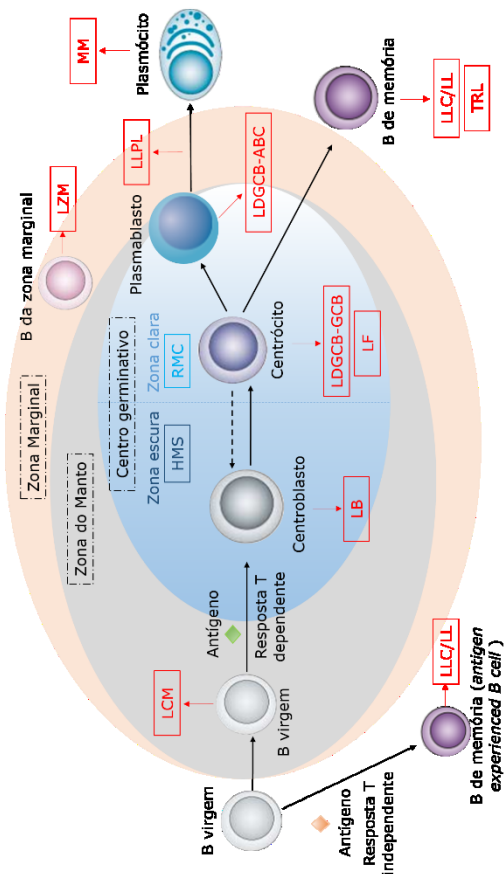
Os estudos dos perfis de expressão gênica representam um grande avanço no reconhecimento da origem de muitas neoplasias de células B. Esses estudos identificaram dois subtipos moleculares LDGCB denominados GCB (do inglês *germinal center B cell-like*) e ABC (do inglês *activated B cell-like*), os quais também exibem diferenças na evolução clínica e na sobrevida global dos pacientes (ALIZADEH et al., 2000). Esses subtipos parecem se originar de diferentes estágios de diferenciação linfocitária e possuem mecanismos patogênicos diferentes. Particularmente, o LDGCB-GCB se assemelha às células B da zona clara do CG, enquanto que o LDGCB-ABC parece derivar das células B pós-CG detidas nos estágios iniciais da diferenciação plasmocitária (plasmablasto). A patogênese desse subtipo de linfoma é caracterizada por eventos moleculares que impedem a expressão de BLIMP1, uma proteína regulatória chave na diferenciação terminal das células B a plasmócitos e, como resultado, observa-se uma incapacidade de concluir essa diferenciação. O LB é derivado das células B da zona escura do CG e o LF das células B da zona clara. A t(14;18) é detectada em 80% dos LF e o mecanismo de formação dessa alteração ocorre nos estágios iniciais da diferenciação B. No entanto, a desregulação do gene BCL2 contribui na gênese do linfoma, acontece durante a reação do CG,

provavelmente como consequência da estimulação antigênica (BASSO & DALLA-FAVERA, 2015).

As neoplasias de células plasmocitárias (NCP) incluídas na classificação da OMS compreendem mieloma múltiplo (MM) e suas variantes [leucemia de células plasmocitárias (LCP), mieloma indolente e mieloma não secretor] plasmocitoma, doença de deposição de Igs monoclonais e gamopatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI). Essas doenças são caracterizadas pela proliferação clonal de plasmócitos e, na maioria dos casos, estão associadas a produção de uma Ig monoclonal, também denominada proteína M ou paraproteína, que é detectável no soro ou urina. O MM e as demais neoplasias de células plasmocitárias são derivadas de uma célula B pós-CG que tem sofrido HMS e RMC com sucesso. Essa é a razão pela qual apenas 1% dos MM estão associados a proteína M de tipo IgM (LORSBACH et al., 2011). Quase todos os pacientes com MM desenvolvem a doença a partir de uma condição pré-maligna e assintomática denominada GMSI, que é caracterizada pela presença de Ig clonal com concentração < 3g/dl e menos de 10% de plasmócitos na MO. A condição clínica intermediária, denominada mieloma indolente (*smoldering*), é caracterizada pela presença de Ig clonal com concentração > 3g/dl e mais de 10% de plasmócitos na MO. Essa doença apresenta maior risco de progressão para MM em comparação à GMSI. Os critérios laboratoriais para o diagnóstico do mieloma indolente são os mesmos que para o MM, com a diferença que não deve haver evidência das lesões típicas CRAB (do inglês *Calcium, Renal, Anemia and Bone lesions*), as quais são: anemia, hipercalcemia, lesões ósseas e insuficiência renal. (KYLE et al., 2007; BLADE et al., 2009).

A Figura 1 exibe as diferentes etapas na maturação normal das células B e mostra o estágio de diferenciação do qual são derivadas as principais NCLBM.

Figura 1. Origem celular das principais neoplasias de células linfoides B maduras.



Fonte: Adaptado de (LENZ & STAUDT, 2010; BASSO & DALLA-FAVERA, 2015). Notas: As setas e os retângulos vermelhos indicam a célula B normal que dá origem às diferentes neoplasias de células linfoides B maduras. LLC/LL: Leucemia linfocítica crônica/linfoma linfocítico, LCM: linfoma de células do manto, LB: linfoma de Burkitt; LDGCB-GCB linfoma difuso de grandes células B de tipo centro germinativo, LDGCB-ABC: linfoma difuso de grandes células B de tipo células B ativadas, LF: linfoma folicular, TRL: tricoleucemia, LLPL: linfoma linfoplasmacítico, LZM: linfoma da zona marginal, MM: mieloma múltiplo. O termo em inglês *antigen experienced B cell* é usado para definir às células B de memória derivadas da estimulação antigênica T independente.

2.4 Epidemiologia

Os padrões de incidência das neoplasias de células B variam entre as populações, mas é amplamente conhecido que os linfomas são mais frequentes nos países desenvolvidos. Nos Estados Unidos, estima-se uma taxa de incidência de NCLBM de 26,13 casos para cada 100 mil indivíduos. Segundo dados da OMS, no ano 2003 a incidência mundial de linfomas, principalmente de linfomas B, era crescente, com ocorrência de aproximadamente 280.000 casos por ano no mundo (STEWART, 2003). A causa desse aumento não é clara, mas considera-se que pode ser devido ao maior número de infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). No entanto, nos últimos anos, esse aumento se estabilizou, porém as causas dessa tendência são desconhecidas (BOYLE, 2008; SHANKLAND et al., 2012).

No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) publicou as estimativas da incidência de todos os tipos de câncer para o biênio 2016-2017 no país. Estima-se 5.210 casos novos de LNH em homens e 5.030 em mulheres. Tais valores correspondem a um risco estimado de 5,27 casos a cada 100 mil homens e 4,88 a cada 100 mil mulheres. Para o estado de Santa Catarina espera-se 380 novos casos de LNH (210 para homens e 170 para mulheres) com taxas de incidência de 6,62 e 5,21 para homens e mulheres por 100.000 habitantes, respectivamente. Para a cidade de Florianópolis espera-se taxas de incidência de 9,49 e 5,37 por cada 100.000 habitantes para homens e mulheres com um cálculo de 20 novos casos em homens e menos de 15 em mulheres (INCA, 2015).

O fator de risco mais importante para o desenvolvimento dos linfomas é a imunossupressão. Os pacientes soropositivos para o HIV, transplantados, indivíduos com imunodeficiências hereditárias ou doenças autoimunes e pacientes com altas doses de quimioterapia apresentam um risco aumentado (50-100 vezes) de desenvolver linfomas em relação a população normal (EVANS & HANCOCK, 2003; SHANKLAND et al., 2012).

Atualmente as causas das diferenças geográficas nos padrões de incidência de LNH permanecem sem explicação. Embora existam muitas investigações epidemiológicas, ainda se desconhece a contribuição da dieta, os estilos de vida e outros fatores ambientais no desenvolvimento dessas doenças (BASSIG et al., 2012).

Os linfomas de células B (LCB) representam 4% de todos os casos de câncer e 3% das mortes relacionadas ao câncer nos Estados Unidos. O LDGCB é o subtipo mais comum dos casos de linfoma na Europa e na América, e é considerado um câncer agressivo que requer

tratamento imediato. O LF é o segundo mais comum, e a diferença em relação ao LDGCB, é que esse subtipo se apresenta clinicamente indolente no início, mas exibe tendência à recaída após os tratamentos padrões (MALONEY, 2012). De acordo com esses dados, um estudo realizado no HU-UFSC, que avaliou a frequência das NCLBM entre 2011 e 2014, observou que as neoplasias linfoproliferativas B mais frequentes foram a LLC/LL seguida do LDGCB e do LF (CARDOSO et al., 2016).

2.5 Diagnóstico

Atualmente, o diagnóstico das NCLBM é realizado baseado na combinação das características morfológicas, imunofenotípicas e clínicas, além da presença de alterações citogenéticas, porém nem todas as metodologias são utilizadas para o diagnóstico em todos os casos. As características genéticas das células neoplásicas são consideradas como um marcador importante para a classificação das neoplasias linfoides. Para muitos linfomas B, as alterações genéticas recorrentes têm sido identificadas como, por exemplo, a t(11;14) no LCM, a t(14;18) no LF, a t(8;14) e variantes no LB e a t(11;18) no linfoma MALT. Na revisão da classificação da OMS das neoplasias linfoides de 2016 foram reconhecidas outras alterações moleculares específicas como, por exemplo, as mutações BRAF V600E na TRL ou as mutações no gene MYD88 L265P no LLPL, entre outras. Essas anormalidades genéticas são importantes para a determinação das características biológicas das diferentes neoplasias e podem ser usadas no diagnóstico diferencial pela alta especificidade (SWERDLOW et al., 2008; BOTTCHEER et al., 2010, SWERDLOW et al., 2016a).

Em geral, o primeiro passo para o diagnóstico é a avaliação cuidadosa da histologia e da citologia das células neoplásicas (BAIN, 2010). A análise morfológica e imunofenotípica das células neoplásicas geralmente são suficientes para o diagnóstico e a caracterização de grande parte das NCLBM (CRAIG, 2007). Dessa forma, a imunofenotipagem por citometria de fluxo tornou-se uma estratégia diagnóstica fundamental para essas neoplasias. A maior parte dos LCB tem perfis imunofenotípicos característicos que são muito úteis para o diagnóstico (SWERDLOW et al., 2008). Porém, não há antígenos específicos capazes de identificar um único subtipo de NCLBM, assim a combinação das características morfológicas em conjunto com um painel de marcadores antigênicos é necessária para um diagnóstico correto.

2.6 Imunofenotipagem por citometria de fluxo nas NCLBM

A citometria de fluxo é uma metodologia que permite a análise das propriedades físicas e da expressão antigênica de células em suspensão por meio do uso de anticorpos monoclonais conjugados a corantes fluorescentes (fluorocromos). Na última década, a imunofenotipagem por citometria de fluxo evoluiu com avanços na instrumentação e com aumento na disponibilidade de novos anticorpos e de fluorocromos. Portanto, sua utilidade tem sido expandida na investigação de antígenos presentes nas células hematopoiéticas normais e neoplásicas (TUTE, 2011).

No estudo das NCLBM, a imunofenotipagem por citometria de fluxo é indispensável, visto que essa metodologia permite estabelecer o fenótipo das células em proliferação mediante a identificação da expressão de antígenos específicos da linhagem B (CD19, CD20 e CD22), e possibilita a distinção dos linfócitos B neoplásicos dos reacionais pela identificação de duas anormalidades fenotípicas principais: a restrição de cadeia leve de Ig e a expressão antigênica aberrante. Ao contrário do que ocorre com as populações de linfócitos B normais ou reacionais, os linfócitos neoplásicos presentes nos LCB representam um clone de células que expressam um único tipo de cadeia leve de Ig, kappa ou lambda (CRAIG, 2007). Porém, a restrição de cadeia leve nem sempre indica monoclonalidade, pois existem exemplos na literatura de populações não clonais de células B reacionais que exibem apenas um tipo de cadeia leve (TUTE, 2011). Alterações nos padrões de expressão normal dos marcadores celulares também podem ser observadas nas células neoplásicas. Pode-se identificar assincronismo da expressão de proteínas relacionadas com a maturação celular como, por exemplo, a expressão de Bcl-2 em células B CD10 positivas, ou alterações na intensidade de fluorescência dos antígenos associados à linhagem (CD19, CD20, CD22 ou CD79b). Do mesmo modo, pode ser observada a presença de antígenos que não são expressos normalmente nos linfócitos B. A expressão de CD5 em células B é um fenótipo aberrante bem frequente nas NCLBM, mas existem pequenas populações de linfócitos B não neoplásicos CD5 positivos no SP e nos linfonodos, especialmente em pacientes com doenças autoimunes. Portanto, a expressão de CD5 em linfócitos B deve ser avaliada conjuntamente com outras anormalidades (CRAIG & FOON, 2008).

Como visto, a imunofenotipagem por citometria de fluxo permite a avaliação simultânea de vários antígenos o que aumenta a especificidade da classificação imunofenotípica. Isso, de fato, aumenta a sensibilidade e

possibilita a detecção e a identificação de populações muito pequenas em uma mistura complexa de células. Com essa metodologia pode-se obter um imunofenótipo detalhado da população celular, o que permite a comparação dessa informação com os perfis fenotípicos específicos identificados nas NCLBM. Para alguns antígenos é relevante apenas a determinação da positividade ou negatividade, porém para outros é importante a avaliação da intensidade da expressão. Nesses casos, a imunofenotipagem por citometria de fluxo permite essa quantificação e apresenta vantagens em relação a IHQ para tal fim (TUTE, 2011).

No Quadro 2 se mostram as NCLBM que apresentam perfis imunofenotípicos típicos. Provavelmente, a LLC seja a NCLBM mais estudada e melhor definida imunofenotipicamente.

Quadro 2. Perfis imunofenotípicos característicos das principais NCLBM.

Subtipo de NCLBM	Fenótipo Típico	Expressão atípica
Leucemia Linfóide Crônica (LLC)	CD19+, CD20+ (fraco), CD5+, CD10-, CD23+, CD79b- (ou + fraco), sIg+ (fraco), CD200+	Existem casos CD5-, CD23- e/ou CD20 ++
Linfoma das Células do Manto (LCM)	CD19+, CD20+, CD5+, CD10-, CD23-, sIgD+, sIgM+, CD200-	Existem casos CD5-, CD23+ e/ou CD200+
Tricoleucemia (TRL)	CD19++, CD20++, CD5-, CD10-, CD11c+, CD103+, sIg++, CD200+, CD25+	Podem apresentar expressão de CD10. Os casos CD25- são classificados como TRL variante.
Linfoma Folicular (LF)	CD19+ (fraco), CD20+, CD5-, CD10+, CD38+, CD43-	Podem ter ausência da expressão de CD10.

Adaptado de TUTE, 2011. Notas: NCLBM: neoplasias de células linfóides B maduras. + positivo, ++ positivo forte, - negativo.

Para LLC, foram elaborados sistemas de pontuação que levam em consideração essas características distintivas e permitem conhecer a probabilidade de que uma NCLBM seja LLC a partir dos dados da imunofenotipagem por citometria de fluxo (Quadro 3). Assim, com uma pontuação > 4 é confirmado o diagnóstico de LLC. Adicionalmente, foi observado que 96% das LLC apresentam pontuações > 3 e que a maioria dos casos que não são LLC apresentam pontuação < 3 (MOREAU et al., 1997; BAIN, 2010; LEACH et al., 2013).

Como se mostra no Quadro 2, o antígeno CD103 apresenta uma certa especificidade para a identificação dos casos de TRL. Infelizmente, marcadores como o CD103 são raros e o diagnóstico é baseado nos complexos perfis de expressão imunofenotípicos. Algumas das NCLBM (LDGCB, LZM, LLPL) não possuem fenótipos específicos e apresentam grande heterogeneidade entre os casos (TUTE, 2011).

Alguns casos de LLC e LCM apresentam expressão atípica nos perfis imunofenotípicos e o diagnóstico diferencial entre essas entidades pode ser complexo. O antígeno CD200 tem sido identificado como um marcador útil para diferenciar LLC (CD200 positivo) do LCM (CD200 negativo) (SANDES et al., 2014; CHALLAGUNDLA et al., 2014).

Quadro 3. Sistema de pontuação para LLC.

Antígeno	Expressão	Pontuação
CD5	Positiva	1
CD23	Positiva	1
FMC7/CD20	Negativa	1
Ig superfície	Fraca	1
CD79b	Negativa ou Fraca	1

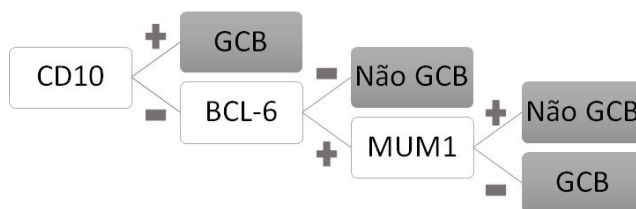
Fonte: Adaptado de MOREAU et al., 1997 e MORICE et al., 2008.

Essa metodologia também pode ser utilizada para reconhecer a expressão antigênica que tenha significado prognóstico. Existem vários antígenos que têm sido identificados como marcadores prognósticos para a LLC como o CD38, CD49d, CD305 (LAIR1) e CD69. (DAMLE et al., 1999; GATTEI et al., 2008; DEL POETA et al., 2012; PERBELLINI et al., 2014).

Como visto anteriormente, existem dois subtipos moleculares de LDGCB, o GCB e o ABC que são diferentes entre si (ALIZADEH et al., 2000). Subsequentemente, foi identificado o LDGCB tipo três com características heterogêneas e pouco definidas, porém apresenta um prognóstico desfavorável semelhante ao grupo LDGCB-ABC (ROSENWALD et al., 2002). Visto que as metodologias de investigação do perfil de expressão gênica não estão disponíveis como exames de rotina clínica, têm sido desenvolvidos algoritmos diagnósticos por IHQ, baseados na expressão fenotípica de CD10, BCL6 e MUM1 para diferenciar os subgrupos GCB (CD10 positivo) e não GCB (CD10 negativo) (HANS et al., 2004; ANDERSON et al., 2009) (Figura 2). Embora não tenham uma correlação exata com as categorias moleculares, a OMS recomenda o uso desses algoritmos, principalmente o algoritmo

de Hans, para a identificação dos subtipos de LDGCB (SWERDLOW et al., 2016a). Dessa forma, por meio da aplicação da imunofenotipagem por citometria de fluxo, é possível identificar o subgrupo de bom prognóstico (LDGCB-GCB) com a positividade do antígeno CD10.

Figura 2. Algoritmo de Hans para a classificação dos subtipos de LDGCB por meio da técnica de IHQ.



Fonte: Adaptado de (HANS et al., 2004).

Nota: GCB: subgrupo de LDGCB do tipo células B do centro germinativo. Nos retângulos brancos estão os marcadores recomendados e nos retângulos cinza os subtipos de LDGCB.

A imunofenotipagem também é utilizada para confirmar a expressão de um antígeno específico para ser usada a imunoterapia com anticorpos monoclonais, por exemplo o tratamento com rituximabe, um anti-CD20. Adicionalmente, essa metodologia é amplamente usada para monitorar a doença residual mínima após tratamento.

Uma das limitações dessa metodologia é que, às vezes, devido à semelhança fenotípica entre os diferentes subtipos de linfomas, o imunofenótipo não é suficiente para a correta classificação das diferentes NCLBM, mas a informação obtida da imunofenotipagem pode ser usada para catalogar as diferentes possibilidades diagnósticas e direcionar os testes adicionais para o diagnóstico definitivo da neoplasia (CRAIG & FOON, 2008).

2.7 Avaliação imunofenotípica das NCP

As NCP apresentam características clínicas e imunofenotípicas claramente distinguíveis das outras NCLBM (BOTTCHEER et al., 2010). Essas doenças são caracterizadas pela presença de plasmócitos clonais na MO capazes de secretar Ig clonal que pode ser detectada no soro ou urina. A informação mais importante fornecida pela imunofenotipagem por citometria de fluxo nessas neoplasias é a identificação dos plasmócitos

monoclonais e a diferenciação deles dos plasmócitos policlonais normais (VAN DONGEN et al., 2012). Os plasmócitos normais são caracterizados pela expressão intensa de CD38 e C138, positividade para os antígenos CD19 e CD45 e ausência da expressão de CD56 e CD20. No entanto, os plasmócitos neoplásicos mostram alterações no perfil imunofenotípico e pode ser observada a ausência ou baixa expressão de CD19 e CD45 (em 99% dos casos), positividade para CD56 (70% dos casos) e, em alguns casos, a expressão aberrante de CD117. Além disso, os plasmócitos mielomatosos apresentam restrição de cadeia leve intracitoplasmática (SEEGMILLER et al., 2011; KUEHL & BERGSAGEL, 2012). O fenótipo nas GMSI apresenta sobreposição com as outras NCP. Devido à perda dos plasmócitos durante o processamento das amostras, a quantificação deles por meio da imunofenotipagem por citometria de fluxo não é precisa, portanto, o porcentual de plasmócitos clonais determinado por essa metodologia, não deve ser usado para a distinção entre GMSI e MM (CRAIG & FOON, 2008). No entanto, tem sido reportado que a presença de plasmócitos fenotipicamente normais residuais misturados com os plasmócitos neoplásicos é um achado constante nos pacientes com GMSI. Na maioria dos casos (80%) é observado mais de 5% de plasmócitos normais entre o total da população plasmocitária. A identificação de plasmócitos não neoplásicos também pode ocorrer no MM, mas a proporção encontrada é menor. Assim, a identificação de mais de 5% de plasmócitos policlonais é um parâmetro preciso para a discriminação de MM e GMSI (OCQUETEAU et al., 1998, PAIVA et al., 2010).

A presença de plasmócitos clonais e de proteína M também pode ser observada em alguns linfomas. A maioria dos linfomas apresentam um bloqueio na sequência de maturação normal, porém em alguns deles esse bloqueio é incompleto e pode ser observada a presença de células B pequenas, células plasmocitoides e plasmócitos. Essa diferenciação plasmocitária é característica do LLPL e, embora seja mais rara, também pode ser observada nos LZM com uma frequência moderada, e mais raramente nas LLC, nos LF e nos LCM. Nesses casos, é utilizado o termo linfomas com diferenciação plasmocitária (LDP) (SWERDLOW et al., 2016b). A relação clonal entre os plasmócitos e as células B é fundamentada na restrição de cadeia leve de Ig. Acredita-se que as células linfoides e plasmócitos com expressão da mesma cadeia leve de Ig são derivadas de uma célula de origem comum. Assim, é possível estabelecer se o componente plasmocitário é parte da mesma neoplasia ou um processo independente (LIN et al., 2011). A imunofenotipagem por citometria de fluxo é muito útil para a diferenciação dessas neoplasias,

pois têm sido identificadas diferenças entre os plasmócitos mielomatosos e os plasmócitos neoplásicos dos LDP. O imunofenótipo das células nos LDP é semelhante ao encontrado nos plasmócitos normais (CD19 e CD45 positivos CD56 e CD117 negativos), com a exceção da restrição de cadeia leve. As maiores diferenças observadas são na expressão de CD19 e CD56, e a combinação de ambos marcadores pode distinguir com precisão (96%) ambas doenças (SEEGMILLER et al., 2011). No entanto, percebe-se que a natureza clonal dessas células pode ser determinada apenas pela identificação da restrição de cadeia leve, visto que não apresentam alterações imunofenotípicas em relação aos plasmócitos normais, com exceção de alguns casos nos quais foram reportados expressão de CD20 e CD5 nas células plasmocitárias clonais (EVANS et al., 2000; LEACH et al., 2013).

2.8 Novos marcadores imunofenotípicos

Vários grupos estudam as diferentes formas de investigar novos alvos imunofenotípicos para o diagnóstico de NCLBM, entre eles, o Consórcio Internacional *Euroflow*, o qual estabeleceu estratégias para a eleição dos melhores marcadores para investigar essas neoplasias. Essas estratégias consistem em pesquisar antígenos que estejam associados com os estágios normais de desenvolvimento e de maturação dos linfócitos B e, desse modo, se apoia o conceito da OMS na classificação das NCLBM. Também podem ser usados marcadores associados ao *homing* de células B, com a hipótese de que os receptores de *homing* poderiam regular a predisposição das células neoplásicas em infiltrar a MO, linfonodos ou baço (COSTA et al., 2006). A palavra *homing* refere-se à migração e alojamento das células em algum tecido ou localização específica. De acordo com esse critério, para este estudo foram escolhidos dois marcadores que poderiam ser relevantes para o diagnóstico das NCLBM.

O antígeno CD150 é uma molécula presente na superfície celular de linfócitos B e T, células dendríticas maduras e monócitos ativados (ROMERO et al., 2004). Esse receptor é uma glicoproteína que pertence à família de receptores SLAM (do inglês *Signaling Lymphocytic Activation Molecule*) dentro da superfamília de Ig (DE SALORT et al., 2011). Foi observado que a expressão do CD150 aumenta após a ativação dos linfócitos *in vitro* (COCKS et al., 1995). Além disso, foi demonstrado por meio da técnica de imuno-histoquímica em amostras de amígdalas e linfonodos, populações de células CD150 positivas localizadas preferencialmente nos centros germinativos dos folículos linfóides (SIDORENKO et al., 1992). Consequentemente, esse marcador poderia

ser útil no diagnóstico diferencial dos linfomas derivados do centro germinativo (LF, LDGCB, LB).

Para a escolha do segundo marcador a ser utilizado neste trabalho foram analisados os marcadores propostos pelo “*HLDA 9 Workshops*”. Os estudos das moléculas presentes na superfície dos leucócitos têm sido organizados por uma série de seminários internacionais conhecidos como “*Human Leucocyte Differentiation Antigens (HLDA) Workshops*”. A primeira conferência foi realizada em Paris no ano 1982, onde foram avaliados anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos na superfície dos leucócitos. Assim, foi derivada desses *workshops* tanto a nomenclatura CD (“*Cluster of Differentiation*”) como a caracterização das moléculas desde CD1 ao CD350. No “*HLDA 9 Workshops*”, em 2010, foram identificados 18 novos CD na superfície dos linfócitos, entre os quais apenas três deles (CD307a, CD307b e CD307d), membros da família dos receptores *Fc like* (FcRL), tiveram expressão restrita nos linfócitos B (MATESANZ-ISABEL et al., 2011). Essa família de receptores tem sido denominada de várias formas, até o ano 2006 onde a nomenclatura foi unificada. Algumas das antigas denominações são: família de receptores *Fc homologs* (FcRH) e superfamília de receptores de Ig associados a translocação de genes (IRTA) (CAPONE et al., 2016).

Foi demonstrado que o antígeno CD307a tem uma expressão diferencial conforme a maturação das células B, a qual começa no estágio Pré-B com um pico de expressão nas células B virgens, e logo uma diminuição nas células do CG e plasmócitos (LEU et al., 2005). Ademais, foi observado a presença do CD307a na membrana de várias linhagens celulares de LNH e nas células neoplásicas de pacientes com NCLBM (DU et al., 2008) e, em alguns estudos, apresentaram uma expressão aumentada e presumivelmente específica desse marcador em LLC (ZUCCHETTO et al., 2011). Com base nessas informações o marcador CD307a foi selecionado para ser avaliado no presente trabalho.

3. JUSTIFICATIVA

Na classificação da OMS estão definidas as características imunofenotípicas comuns de cada subtipo de NCLBM, o que permite a criação de painéis de anticorpos para imunofenotipagem por citometria de fluxo que possam detectar as células neoplásicas com alta sensibilidade e especificidade. Alguns LCB têm perfis imunofenotípicos bem característicos, enquanto outros são mais heterogêneos.

Na avaliação do imunofenótipo das NCLBM é conveniente considerar quatro grupos principais determinados pela expressão dos antígenos CD5 e CD10. Assim, é possível direcionar e limitar as possibilidades diagnósticas (Quadro 4). Dentro de cada subgrupo existem subtipos de NCLBM facilmente reconhecíveis, devido aos perfis aberrantes típicos, como por exemplo, a LLC. Também existem algumas entidades que expressam antígenos com algum grau de especificidade, por exemplo, a TRL que apresenta expressão de CD103 e CD123 (CRAIG, 2007). Apesar disso, algumas dessas neoplasias apresentam um fenótipo variável e a subdivisão desses grandes subgrupos reduz os prováveis diagnósticos, que para serem confirmados necessitam da abordagem multimodal definida pela OMS. Quando não é possível realizar uma subclassificação precisa de alguma NCLBM, utiliza-se o termo LCB junto com a descrição do fenótipo CD5 e CD10 para definir dentro de qual subgrupo se encontra a neoplasia não especificada.

Quando a imunofenotipagem por citometria de fluxo é usada como ferramenta isolada, observa-se que os maiores desafios para o diagnóstico diferencial são, entre os casos de LLC e LCM com perfil de expressão atípicos e entre os linfomas derivados do CG (LDGCB CD10 positivo, LF e LB). Também observa-se dificuldade no diagnóstico definitivo nos casos de LZM, LDGCB e LLPL que apresentam fenótipos heterogêneos e podem exibir semelhanças na expressão antigênica com qualquer subtipo de NCLBM.

Conforme mencionado anteriormente, nos casos onde existe sobreposição fenotípica, a informação fornecida pela imunofenotipagem por citometria de fluxo não é suficiente para concluir o diagnóstico. Atualmente, os protocolos de tratamento dependem, em grande parte, do subtipo específico NCLBM, portanto, o diagnóstico correto ganha importância adicional na assistência ao paciente (BOTTCHEER et al., 2010; TUTE, 2011).

Quadro 4. Abordagem da imunofenotipagem por citometria de fluxo na classificação das NCLBM.

	CD5-	CD5+
CD10-	TRL LZM LDGCB LF LCM	LLC/LL LCM LP-B LZM LDGCB LLPL
CD10+	LF LDGCB LB TRL	LF LDGCB LCM LB

Fonte: adaptado de (CRAIG & FOON, 2008). Nota: LLC/LL: Leucemia linfoide crônica/linfoma linfocítico, LP-B: leucemia prolinfocítica, LZM: linfoma da zona marginal, TRL: tricoleucemia, LLPL: linfoma linfoplasmacítico, LF: linfoma folicular, LCM: linfoma de células do manto, LDGCB: linfoma difuso de grandes células B, LB: linfoma de Burkitt, - negativo, + positivo.

Considerando o exposto, torna-se clara a necessidade da investigação de novos marcadores imunofenotípicos que sejam informativos e não redundantes para melhorar a utilidade da imunofenotipagem por citometria de fluxo para o diagnóstico e classificação das NCLBM. A pesquisa de novos antígenos também tem como objetivo a elaboração de painéis mais precisos, que sejam adequados e suficientes como única ferramenta para o diagnóstico diferencial dos linfomas B, principalmente naqueles casos onde não estejam disponíveis testes citogenéticos e moleculares (BOTTCHEER et al., 2010; SANDES et al., 2014; LESESVE et al., 2015).

A partir deste estudo, pretende-se investigar novos alvos imunofenotípicos que possam ser aplicados no diagnóstico diferencial das neoplasias de células B. Esses resultados serão obtidos por meio da determinação dos padrões de expressão dos marcadores CD150 e CD307a em células de pacientes com diagnóstico de linfomas e leucemias de linhagem B. Dessa forma, espera-se identificar os antígenos celulares mais eficientes na distinção entre as diferentes neoplasias de células B, que permitam o diagnóstico definitivo sem a necessidade do uso de testes adicionais, e que sejam relevantes para a avaliação prognóstica e a detecção de doença residual mínima (DRM). Após a identificação desses marcadores, os mesmos serão incluídos no painel de anticorpos utilizado na rotina laboratorial do setor de Onco-hematologia da Divisão de Análises Clínicas (DACL) do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar a importância dos marcadores imunofenotípicos CD150 e CD307a para o diagnóstico diferencial entre as NCLBM.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar os padrões de expressão dos novos marcadores imunofenotípicos CD307a e CD150 nas células B nos diferentes estágios de diferenciação.
- Analisar a expressão dos marcadores CD307a e CD150 nas células B de pacientes com diagnóstico de NCLBM, presentes nas amostras de MO, SP, líquidos cavitários, linfonodos e demais tecidos;
- Comparar a intensidade de expressão dos novos marcadores, CD307a e CD150, entre as células patológicas e as células B normais, e, entre as células patológicas das NCLBM e das neoplasias de células B precursoras.
- Identificar os marcadores celulares mais úteis para a classificação e diagnóstico diferencial dessas neoplasias.
- Comparar a expressão de CD150 e CD307a com marcadores prognósticos já conhecidos nos pacientes com LLC.

5. CASUÍSTICA E MÉTODOS

5.1 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídas no estudo 134 amostras de pacientes com diagnóstico de NCLBM. O diagnóstico foi estabelecido de acordo com os critérios da classificação da OMS 2008, mediante a associação das características clínicas, morfológicas, imunofenotípicas e imunohistoquímicas e, em alguns casos, os resultados dos estudos moleculares e citogenéticos.

Foram excluídas do estudo 14 amostras de pacientes com diagnóstico de NCLBM que apresentaram coágulos, hemólise, baixa viabilidade celular, volume insuficiente e amostras devido a erros no processamento.

Também foram incluídas no estudo 13 amostras de pacientes com diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda B (LLA-B) para comparar a expressão dos marcadores imunofenotípicos entre as amostras de neoplasias de células B precursoras e NCLBM.

5.2 Local e população de estudo

A investigação dos novos marcadores imunofenotípicos foi realizada em amostras de SP, aspirados e biópsias de MO, biópsias de diferentes tecidos, aspirados de linfonodos e outros tecidos, e amostras de líquidos cavitários, provenientes de pacientes com diagnóstico de NCLBM referenciados à DACL do HU/UFSC e ao Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC). As amostras foram recebidas entre os meses de junho de 2015 e dezembro de 2016. Os indivíduos que participaram do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme o Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos da UFSC (CEPSH-UFSC/ nº 913/2010 e 1.691.983/2016). Para determinação do cálculo amostral foram utilizadas as fórmulas para estimação do tamanho da amostra para variáveis quantitativas em populações finitas com um erro máximo de estimativa de 5% (d) e um nível de confiança de 95% (Z).

$$n_0 = \frac{Z^2 \sigma^2}{d^2} \quad n = \frac{n_0}{1 + (n_0/N)}$$

Os dados de desvio padrão (σ) e o N da população esperado para 18 meses (tempo de recolheção das amostras) foram calculados a partir dos dados deste estudo dos primeiros 9 meses (estudo piloto). O tamanho da amostra foi calculado segundo cada subtipo de neoplasia de células B

e o número de casos estudados está descrito na Tabela 1. Foram estudados no total 120 casos de NCLBM.

A mediana de idade dos pacientes com NCLBM estudados foi 64 anos (intervalo 29-85 anos) e foi observado um leve predomínio masculino (70 casos, 58 %). No grupo das LLA-B a mediana de idade foi 22 anos (intervalo 3-82 anos) e houve só um paciente pediátrico com 3 anos de idade.

De acordo com o tipo de amostra, foram avaliadas 42 amostras de SP, 56 de MO (aspirados e biópsias), 15 biópsias de tecidos, cinco amostras obtidas por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de diferentes tecidos e dois líquidos cavitários (líquidos ascítico). Das 13 amostras com diagnóstico de LLA-B, quatro foram de SP e nove de MO.

Tabela 1. Cálculo amostral para os subtipos de neoplasias de células linfoides B maduras.

Subtipo de neoplasia de célula linfóide B madura	n (cálculo amostral)	n atingido
LLC/LL	42	40
NCP	18	21
LF	6	12
LCM	4	10
LDGCB CD10-	2	6
TRL	6	6
LB	6	5
LLPL	4	5
LDGCB CD10+	4	5
LZM	-	2
LCB CD5-CD10-	-	8

Nota: LLC/LL: Leucemia linfóide crônica/linfoma linfocítico, NCP: neoplasias de células plasmocitárias, LF: linfoma folicular, LCM: linfoma de células do manto, LDGCB: linfoma difuso de grandes células B, TRL: tricoleucemia, LB: linfoma de Burkitt, LLPL: linfoma linfoplasmacítico, LZM: linfomas da zona marginal, LCB CD5- CD10-: linfoma de células B não especificado CD5 negativo e CD10 negativo.

A expressão de CD307a foi avaliada em todas as amostras de NCLBM, no entanto, a expressão do marcador CD150 foi avaliada em 110 das 120 amostras (92%), pois a data de chegada do anticorpo monoclonal anti-CD150 foi posterior.

Em oito pacientes foi demonstrada a presença de NCLBM em SP ou MO, porém apresentaram características imunofenotípicas

inespecíficas. Nesses pacientes não foram coletadas biópsias de tecidos linfoides para a avaliação histopatológica. Dessa forma, não foi possível realizar o diagnóstico definitivo e foram classificados como LCB CD5 e CD10 negativos. Os diagnósticos mais prováveis nesse grupo são LZM ou LDGCB, pois a maioria desses pacientes apresentaram o seguinte fenótipo: negatividade para CD5, CD10, CD23, CD11c, CD43, positividade forte para CD20 e pontuação para LLC com valores de 0-2.

Três casos de LLC apresentaram características imunofenotípicas atípicas com pontuação para LLC ≥ 2 . Todos os casos foram positivos para CD5, dois deles foram negativos para CD23 e um deles mostrou expressão parcial desse marcador. Todos os casos foram positivos para CD200, e em um dos casos CD23 negativo, foi demonstrada a ausência da expressão da proteína ciclina D1 por IHQ.

5.3 Grupo controle do estudo

O grupo controle do estudo compreendeu dez amostras de SP de doadores voluntários saudáveis que assinaram o TCLE referente ao projeto submetido ao CEPESH-UFSC/ nº 746.486 /2014. Para a análise experimental foi coletado um volume de 4 ml de SP em tubos contendo EDTA como anticoagulante. A mediana de idade nesse grupo foi 29 anos (intervalo 21-50 anos) e foram avaliados cinco homens e cinco mulheres.

Para a obtenção do perfil imunofenotípico dos precursores de linfócitos B normais, foram incluídas como controle oito amostras de MO de pacientes que apresentaram células linfoides B em todos os estágios de maturação e ausência de alterações fenotípicas ou outras neoplasias hematológicas. A mediana de idade nesse grupo foi 23 anos (intervalo 2-78 anos) com leve predomínio masculino (5 casos, 63%).

5.4 Estudo genético e molecular

Em alguns casos nos quais o perfil imunofenotípico foi inconclusivo ou o volume de amostra foi suficiente, foi investigada a presença de alterações genéticas como informação adicional aos dados imunofenotípicos e histopatológicos, a fim de garantir o diagnóstico correto. Foi utilizada a técnica de FISH (do inglês *fluorescence in situ hybridization*), segundo o protocolo descrito por Siegel (SIEGEL, 2016), para a investigação da t(8;14). Foi confirmada a translocação em três das quatro amostras com suspeita de LB avaliadas.

Foi pesquisada a presença das translocações t(14;18) e t(11;14) por meio da técnica de PCR. Para a extração do DNA foi utilizado o kit

comercial *NucleoSpin® Blood* (Macherey-Nagel). Para a investigação da t(14;18) foi utilizado o kit comercial *Identiclone™ BCL2/JH t(14;18) Translocation Assay* (Invivoscribe) e foi realizado o protocolo descrito por Van Dongen e colaboradores (VAN DONGEN et al., 2003) para a análise da t(11;14).

A presença da t(14;18) foi investigada em sete casos com suspeita de LF, a qual foi confirmada em duas amostras. A técnica de PCR para a t(11;14) foi realizada em 21 amostras e a presença dessa alteração genética foi confirmada em apenas um caso. Sabe-se que essa técnica possui baixa sensibilidade (37%) para a detecção dessa translocação (BELAUD-ROTUREAU et al., 2002), por essa razão, a confirmação do diagnóstico de LCM foi baseado, na maioria dos casos, nos resultados da expressão de ciclina D1 por IHQ ou pelo perfil imunofenotípico e a expressão de CD200, segundo Sandes e colaboradores (SANDES et al., 2014).

5.5 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

5.5.1 Procedimento de marcação

A principal abordagem experimental do presente trabalho foi a caracterização da expressão dos marcadores CD150 e CD307a por meio da imunofenotipagem por citometria de fluxo nos linfócitos B dos indivíduos do grupo controle e dos pacientes com neoplasias de células B. Assim, para a investigação dos antígenos presentes na membrana celular foi realizada a técnica de marcação direta, utilizando-se anticorpos monoclonais já conjugados aos fluorocromos. Resumidamente, 100 µl de cada amostra foram incubados com os volumes de anticorpos previamente titulados por 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As amostras com uma elevada contagem de leucócitos foram diluídas para atingir uma concentração máxima de 10000 leucócitos/mm³. Após o período de incubação, os eritrócitos foram lisados com a solução lisante e incubados novamente à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por mais 15 minutos. Em seguida, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 0,6 rcf. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 500µl de PBS ao sedimento celular. Posteriormente, a amostra foi adquirida (50.000 eventos) utilizando-se o citômetro de fluxo FACS Canto II (Becton Dickinson – BD, San Jose, USA) e o programa FACS Diva (BD, San Jose, USA). A análise dos dados foi realizada utilizando-se o programa Infinicyt® versão 1.7 (Cytognos, *Salamanca, Espanha*).

As combinações de anticorpos utilizados (painéis) e outras informações relevantes dos anticorpos monoclonais utilizados apresentam-se no Quadro 5. Neste caso, cada painel equivale a um tubo, devido às características do citômetro de fluxo presente no laboratório, o qual possibilita a combinação de até oito fluorocromos por tubo.

Quadro 5. Painéis com a combinação de anticorpos monoclonais utilizados.

<i>Painéis</i>	Anticorpo Monoclonal	Fluorocromo	Clone	Marca	Volume de Anticorpo
<i>Painel 1</i>	anti-CD150	FITC	SLAM.4	Exbio	2 µl
	anti-CD307a	PE	282415	R&D Systems	5 µl
	anti-CD19	PC7	J3-119	Beckman Coulter	3 µl
	anti-CD307a	APC	282415	R&D Systems	7 µl
	anti-CD3	PacB	UCHT1	BD Biosciences	1 µl
	anti-CD45	PacO	HI30	Exbio	1 µl
<i>Painel 2</i>	anti-CD150	FITC	SLAM.4	Exbio	2 µl
	anti-CD307a	PE	282415	R&D Systems	5 µl
	anti-CD34	PerCP-Cy5.5	8G12	BD Biosciences	5 µl
	anti-CD19	PC7	J3-119	Beckman Coulter	3 µl
	anti-CD10	APC	HI10a	BD Biosciences	3 µl
	anti-CD38	APC-H7	HB7	BD Biosciences	3 µl
	anti-CD20	PacB	B9E9 (HRC20)	Beckman Coulter	3 µl
<i>Painel 3</i>	anti-CD45	PacO	HI30	Exbio	1 µl
	anti-CD150	FITC	SLAM.4	Exbio	2 µl
	anti-CD307a	PE	282415	R&D Systems	5 µl
	anti-CD19	PC7	J3-119	Beckman Coulter	3 µl
	anti-CD307a	APC	282415	R&D Systems	7 µl
	anti-CD38	APC-H7	HB7	BD Biosciences	3 µl
	anti-CD3	PacB	UCHT1	BD Biosciences	1 µl
	anti-CD45	PacO	HI30	Exbio	1 µl

Nota: FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PerCP-Cy5.5 proteínas peridinin clorofil-cianina5.5; PC7: ficoeritrina-cianina 7; APC: alofocianina; APCH7: alofocianina-hilite7; PacB: pacific blue; PacO: pacific Orange.

O Painel 1 foi utilizado em todos os casos de NCLBM e nas amostras controle de SP. Note-se que foram usados dois tipos de anticorpos no caso do marcador CD307a. Em 11 amostras foi usado o

anti-CD307a conjugado ao fluorocromo alofocianina (APC) e nas amostras restantes foi usado o anti-CD307a conjugado a ficoeritrina (PE). O anti-CD150 utilizado, era conjugado ao fluorocromo isotiaocianato de fluoresceína (FITC). O Painel 2 foi usado para a caracterização dos marcadores nos precursores linfoides B nas amostras controle de MO. O Painel 3 foi semelhante ao Painel 1, porém com a adição do anti-CD38, utilizado nos casos onde foi necessária a avaliação dos plasmócitos.

Um dado importante de destacar é que para a caracterização das diferentes NCLBM, o Setor de Onco-Hematologia da DACL do HU/UFSC, utiliza um painel de oito cores baseado nas recomendações do consórcio internacional *Euroflow*. No momento, esse setor faz parte de um dos poucos serviços brasileiros que implementou o painel de oito cores como parte da rotina laboratorial (CARDOSO, 2015).

5.5.2 Controles de marcação

Os controles de marcação são utilizados para a definição do ponto de corte entre as populações negativas e positivas, em outras palavras, para a determinação da positividade ou negatividade de um marcador em particular. Existem vários fatores que afetam o sinal de fluorescência de fundo (*background fluorescence*) e assim determinam a separação das populações celulares, os quais são: a autofluorescência das células, a união inespecífica do anticorpo e a sobreposição espectral.

A autofluorescência das células pode ser identificada a partir do controle negativo sem marcação, ou seja, sem adição do anticorpo em estudo. Esse controle deve ser realizado para todas as amostras a fim de evitar a interpretação de falsos positivos.

A união não específica dos anticorpos pode ser avaliada por meio de controles isotípicos (anticorpos inespecíficos do mesmo isotipo do anticorpo que se deseja testar) ou controles negativos internos (populações celulares presentes na amostra que não expressam o antígeno de interesse) (HULSPAS et al., 2009). Nas amostras biológicas há suficientes populações celulares negativas e positivas para visualizar e estimar o grau de união inespecífica do anticorpo. Portanto, para o presente trabalho, a utilização de controles negativos internos foi a melhor opção, pois tem como vantagem que a população de células negativas é exposta às mesmas condições que a população celular em estudo.

Os experimentos que utilizam múltiplos fluorocromos (multicores) precisam ser validados, pois quanto maior é o número de fluorocromos e anticorpos utilizados, maior é o risco de haver interferências, artefatos e interações entre os reagentes (BAUMGARTH

& ROEDERER, 2000). Uma das interações entre reagentes é a sobreposição espectral. A emissão da fluorescência de cada célula é proporcional à quantidade de antígeno que se liga ao anticorpo conjugado a determinado fluorocromo. Essa informação é coletada por uma série de detectores e filtros de luz específicos para cada comprimento de onda das fluorescências emitidas. O espectro de emissão de alguns fluorocromos se sobrepõe consideravelmente, portanto, é necessária uma correção matemática dos dados coletados pelos detectores, denominada compensação. No entanto, mesmo com a compensação, o sinal emitido por um fluorocromo pode interferir no detector adjacente e produzir um alargamento da distribuição da fluorescência das células, que afeta a resolução entre as populações negativas e as fracamente positivas (PERFETTO et al., 2004). Por isso, neste trabalho foram realizados os controles FMO (do inglês *fluorescence minus one*). Esses controles contêm todos os reagentes do painel exceto o anticorpo de interesse e servem para medir a sensibilidade do detector de importância no contexto de outros reagentes. Dessa forma, permitem identificar se existe interferência em um determinado detector devido à sobreposição espectral. O controle negativo sem marcação permite a delimitação do *gate* (janelas de identificação) em uma posição onde não é considerada a interferência devido ao espectro de emissão de outros fluorocromos, portanto, o ponto de corte fica posicionado em um local que não permite a distinção correta entre as populações celulares. No entanto, após a utilização do controle FMO, o ponto de corte considera o aumento da dispersão da população negativa devido à interferência por sobreposição espectral. Esse limite permite a separação das populações fornecendo uma representação mais exata da porcentagem de células positivas para determinado marcador. (PERFETTO et al., 2004).

Conforme o exposto anteriormente, foram realizados os três controles de marcação mencionados.

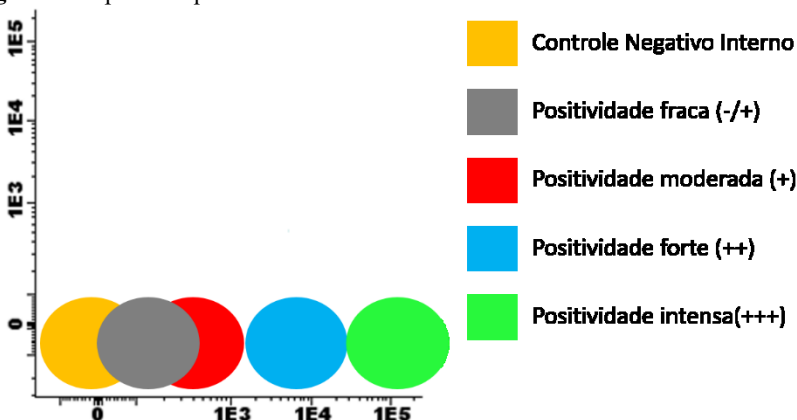
5.5.3 Expressão dos resultados

A avaliação da expressão dos novos alvos imunofenotípicos foi realizada segundo os critérios Bethesda 2006 (WOOD et al., 2007) e foi comparada aos controles negativos internos. Em termos qualitativos, a expressão foi definida como negativa (-) quando as células B apresentaram características de marcação semelhantes e com sobreposição completa com o controle negativo interno. Dessa forma, a positividade para os marcadores foi estratificada como intensidade fraca (-/+), moderada (+) e forte (++) em relação ao controle negativo interno

(Figura 3). A quantificação da expressão dos antígenos celulares CD150 e CD307a foi medida a partir da intensidade de fluorescência média (IFM) representada por unidades arbitrárias (UA). A distribuição dos valores de IFM para cada subgrupo de NCLBM foi representada com diagramas de caixas, nos quais, o extremo superior da caixa indica o percentil 75 dos dados e o extremo inferior o percentil 25. A linha dentro da caixa corresponde à mediana. Os extremos das linhas verticais correspondem aos percentis 10 e 90. Os círculos correspondem a valores não incluídos nas linhas verticais (*outliers*).

Após a avaliação dos controles de marcação foram estabelecidos como controles negativos internos os linfócitos NK (CD3 e CD19 negativos) e linfócitos T (CD3 positivos) para a análise da expressão dos marcadores CD150 e CD307a, respetivamente.

Figura 3. Expressão qualitativa dos resultados.



Fonte: Elaborado pela autora.

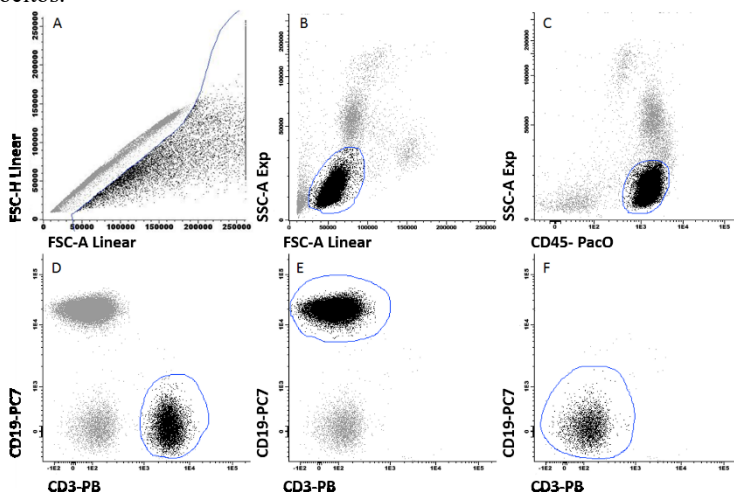
5.5.4 Análise e identificação das diferentes populações celulares

Para a análise e identificação das populações celulares foi utilizada uma estratégia de *gates* (janelas de identificação) sequenciais, como mostra a Figura 4. Primeiramente, foram removidos os *doublets* (células agrupadas) após seleção do tamanho celular em relação a altura e a área (FSC-H *versus* FSC-A; Figura 4, Painel A). Em seguida, foi realizado um *gate* na região de linfócitos a partir dos parâmetros tamanho (FSC-A) *versus* complexidade interna (SSC-A) (Figura 1, Painel B). Posteriormente, foi realizada uma janela de identificação também na região de linfócitos, na qual foi considerado a complexidade (SSC-A)

versus a expressão do antígeno CD45 (pan-leucocitário) (Figura 4, Painel C). Esse *gate* foi realizado a fim de excluir a contaminação por hemácias e por restos celulares. A partir daí, foram realizados os *gates* para a identificação dos linfócitos B, caracterizadas pela positividade do marcador CD19, dos linfócitos T, caracterizados pela expressão antigênica de CD3, e das células NK, identificadas pela negatividade para ambos os marcadores (Figura 4, Painéis D, E, F).

As células linfoides B neoplásicas foram selecionadas por um *gate* nas populações CD19 positivas. No grupo de pacientes com neoplasias linfoides B, a população CD19 positiva foi composta quase exclusivamente de células B neoplásicas (mediana = 99%). Quando foi possível identificar as células B normais residuais, elas foram excluídas da população de análise, principalmente nos casos com baixa quantidade de células neoplásicas.

Figura 4. Estratégia de *gating* para a identificação das subpopulações de linfócitos.



Nota: Painel A) Remoção de *doublers*, Painel B) *Gate* nos linfócitos considerando tamanho e complexidade interna; Painel C) *Gate* nos linfócitos considerando a expressão do CD45; Painéis D, E e F) *Gates* identificando linfócitos T (CD3+), linfócitos B (CD19+) e células NK (CD3 e CD19 negativas).

Os plasmócitos neoplásicos foram identificados pela positividade intensa de CD38 e as propriedades típicas de dispersão de luz.

Nas amostras de MO, a identificação dos precursores B foi feita de acordo com a estratégia descrita por Van Lochem e colaboradores (Van LOCHEM et al., 2004). Assim, foram identificadas quatro subpopulações de células B correspondentes aos estágios de diferenciação pré-B I, pré-B II, células B imaturas e células B maduras (Quadro 5). Os plasmócitos foram identificados e selecionados pelo *gate* no CD38 (positivo intenso).

O fenótipo das células neoplásicas foi analisado pela ferramenta de fusão de arquivos (do inglês, *file merge*) do *software* de análise Infinicyt®, e, desse modo, foi possível obter apenas um arquivo com as informações de todos os pacientes e controles estudados, a fim de exibir o fenótipo de todas as células em um mesmo gráfico, o que facilita a comparação dos dados e a interpretação dos resultados (PEDREIRA et al., 2008). A partir dessa fusão de arquivos foi avaliado o diagrama APS (do inglês *Automatic Population Separator*). Esse diagrama realiza uma separação automática de todos os eventos, avaliando todas as possíveis combinações de parâmetros, baseado na análise de componentes principais (PC). Os parâmetros mais úteis para a separação são listados por significância. São calculadas as diferentes porcentagens da contribuição de cada parâmetro para a melhor separação (no eixo PC1) entre os grupos (CYTOGNOS, 2012).

Quadro 6. Marcadores usados para a identificação dos estágios de diferenciação das células B.

Subpopulação	Imunofenótipo
Pré-B I	CD19+CD34+ CD10++ CD38+ CD20-
Pré-B II	CD19+CD34- CD10+ CD38+ CD20-
Células B imaturas	CD19+CD34- CD10- CD38+ CD20+
Células B maduras	CD19+CD34- CD10- CD38- CD20+
Plasmócitos	CD19+ CD38+++

Fonte: Tomado de Van LOCHEM et al., 2004.

Nota: - negativo; + positivo; +++ positivo intenso.

5.6 Ativação de Linfócitos *in vitro*

Para a análise da expressão do antígeno CD150 após ativação dos linfócitos *in vitro*, foram utilizadas amostras de SP de indivíduos saudáveis coletadas em um tubo contendo heparina como anticoagulante. Foi realizada a cultura de linfócitos em condições de asepsia utilizando 0,5 ml de amostra (sangue total) e 4 ml de meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/ml penicilina

e 100 µg/ml estreptomicina. Em seguida, foram adicionados 100 µl de fito-hemaglutinina, *PHA* (GIBCO) e a suspensão celular foi incubada a 37°C, numa atmosfera com 5% de CO₂, por 3 dias. Conjuntamente, foi processada uma cultura de linfócitos, nas mesmas condições descritas, mas sem a adição do PHA como controle negativo. A seguir, a suspensão de células foi centrifugada e o sobrenadante desprezado. Uma alíquota de 300 µl de PBS foi adicionada ao sedimento e, em seguida, foram pipetados 100 µl dessa suspensão em tubo para citometria de fluxo, a fim de realizar a avaliação imunofenotípica. O painel utilizado foi CD150-FITC/CD25-PE/CD19-PC7/CD3-PacB/CD45-PacO. Esse experimento foi realizado em triplicata e foram utilizadas essas amostras para a titulação do reagente anti-CD150-FITC.

5.7 Análise estatística dos dados

Foi realizada a análise estatística descritiva dos resultados obtidos, estimando-se as frequências absolutas e relativas das variáveis categóricas e as medidas de tendência central e de dispersão das variáveis contínuas. A avaliação da distribuição Gaussiana dos parâmetros foi realizada utilizando-se o teste de Shapiro-Wilk. A comparação das IFM entre os grupos (subtipos de NCLBM) foi feita por meio do teste Kruskal-Wallis. O pós-teste utilizado foi o teste Dunn. Para a comparação entre dois grupos foi usado o teste Mann-Whitney U. Para as comparações da IFM do marcador CD307a entre as amostras de diferentes sítios anatômicos do mesmo paciente foi realizado o teste t de amostras em pares. Todos os testes foram aplicados considerando-se um nível de significância de 5% e utilizando-se o programa SPSS, versão 22.

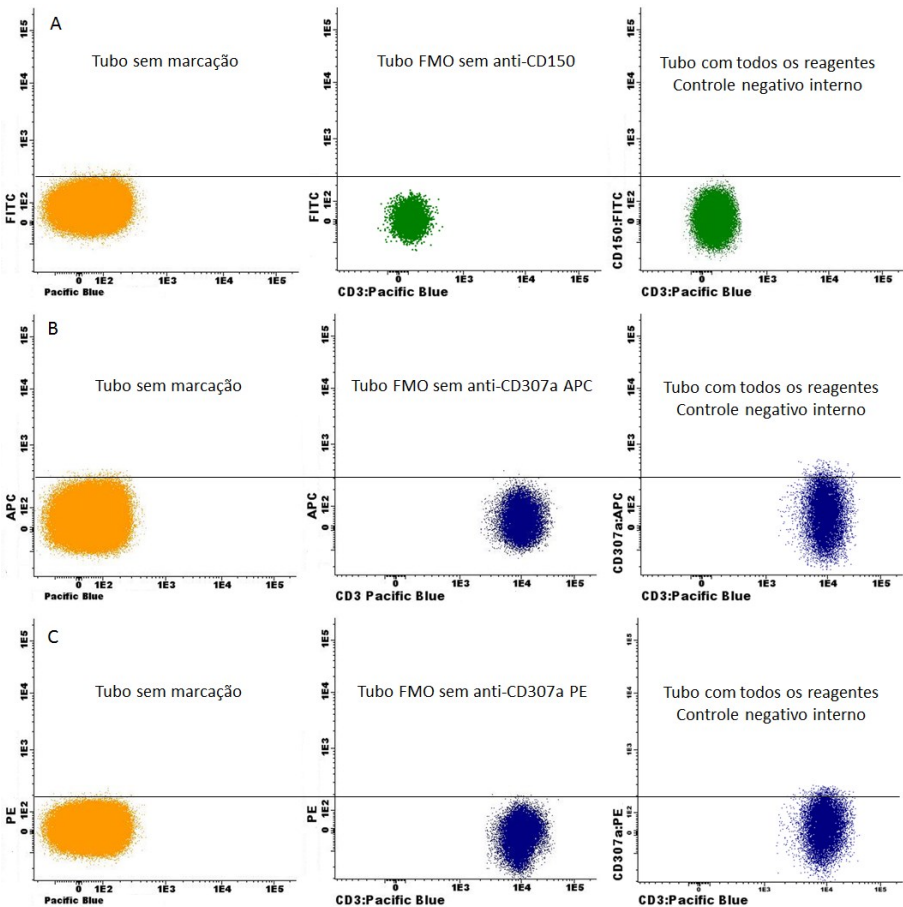
6. RESULTADOS

6.1 Avaliação dos controles de marcação

Os controles de marcação são críticos para a interpretação dos dados. Por isso, foram realizados e avaliados três controles negativos. O controle negativo sem marcação (sem adição de nenhum anticorpo) foi realizado para todas as amostras, o qual permite determinar e quantificar a autofluorescência das células. No entanto, esse controle não é suficiente, pois não é considerada a união inespecífica dos anticorpos às células estudadas. Para isso, foram necessários controles negativos internos, os quais são constituídos por populações celulares presentes na amostra que não expressam o antígeno de interesse. Desse modo, foram identificadas as populações celulares negativas para os marcadores em estudo, para serem usadas com essa finalidade. Por último, também foram utilizados os tubos controle FMO. Esses controles são amostras marcadas com todos os reagentes do painel exceto o reagente de interesse, procedimento que permite a quantificação da dispersão das populações negativas devido à sobreposição espectral. Esses controles foram realizados apenas uma vez, pois as interferências devido a sobreposição espectral não dependem de cada amostra, senão da combinação de anticorpos utilizada.

A Figura 5 apresenta as características de marcação dos três controles negativos para os detectores dos fluorocromos dos anticorpos em estudo (FITC, PE e APC). Nessa figura observa-se que as populações negativas são semelhantes nos tubos sem marcação e FMO nos três casos (canal FITC, PE e APC). Isso indica que não há interferências por sobreposição espectral no painel utilizado neste trabalho. A comparação entre os tubos sem marcação e a população do controle negativo interno do tubo com todos os reagentes permite estimar a união inespecífica do anticorpo (HULSPAS et al., 2009). Observa-se que no caso do CD307a, tanto PE como APC, a população de células T no tubo com todos os reagentes tem uma dispersão maior do que o tubo sem marcação, o que pode ser devido à união inespecífica do anticorpo monoclonal utilizado nas células do controle negativo interno que não possuem o antígeno. A partir dessa avaliação, foi concluído que a melhor alternativa para estabelecer a positividade ou negatividade de cada marcador foi a comparação da população linfóide B em estudo com os controles negativos internos.

Figura 5. Análise dos controles negativos para cada um dos anticorpos monoclonais em estudo.



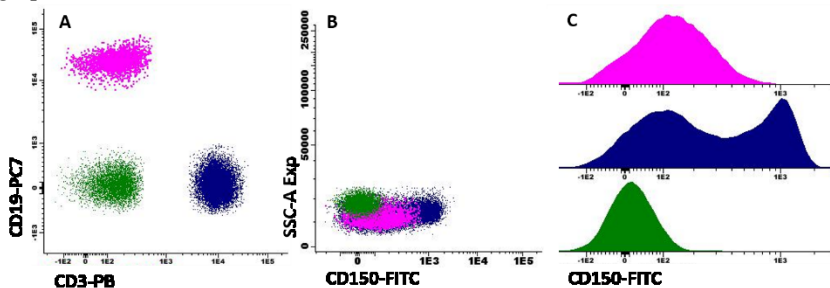
Nota: Painel A) Controles negativos do anti-CD150 FITC. Painel B) Controles negativos do anti-CD307a APC. Painel C) Controles negativos do anti-CD307a PE. População de células em amarelo: células linfoides sem marcação a partir do gate na região de linfócitos do gráfico tamanho (FSC-A) versus complexidade interna (SSC-A). População de células em verde: células NK (controle negativo interno para CD150). População de células em azul: linfócitos T (controle negativo interno para CD307a). FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; APC: alofococianina.

6.2 Caracterização dos marcadores CD150 e CD307a no grupo controle.

Foram avaliados os padrões de expressão dos marcadores CD150 e CD307a nas subpopulações de células linfoides nas amostras de SP de dez doadores saudáveis (grupo controle) por citometria de fluxo.

Como pode ser observado na Figura 6, a expressão do CD150 apresenta um padrão bimodal nas células T (Tabela 2). Sabe-se que as células T de memória expressam constitutivamente CD150 e que essa expressão pode ser induzida após a ativação dos linfócitos T (COCKS et al., 1995; ROMERO et al., 2004).

Figura 6. Expressão do antígeno CD150 no SP de um caso representativo do grupo controle.



Nota: População em verde: células NK; em rosa: células B; em azul: células T. Painel A) Dot plot da intensidade de fluorescência do CD3 versus CD19 mostrando as três populações de linfócitos. Painel B) Dot plot de complexidade das células versus expressão de CD150. Painel C) Expressão de CD150 representada em forma de histogramas. Pode-se notar a expressão bimodal nas células T. FITC: isotiocianato de fluoresceína; PC7: ficoeritrina-cianina 7; PB: pacific blue.

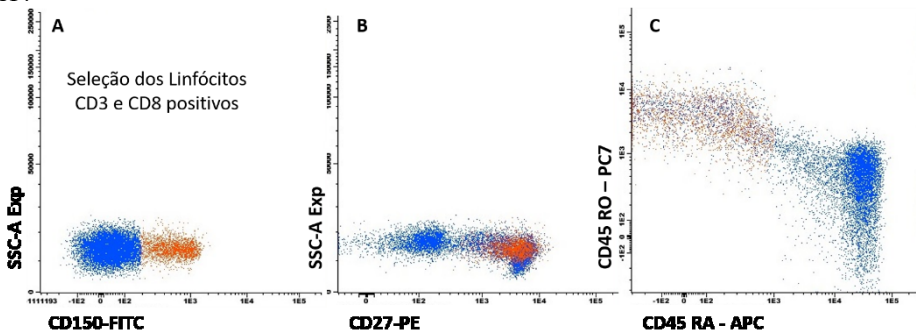
Esses resultados foram confirmados pela análise das subpopulações de linfócitos T CD8 no SP. A identificação dos linfócitos T CD8 de memória foi realizada pela avaliação do padrão de expressão dos antígenos CD45RA, CD45RO, CD27 e CD8. As células T CD8 de memória expressam os marcadores CD45RO e CD27, porém são negativas para CD45RA (DUARTE et al., 2013). Dessa forma, verificou-se que a população CD150 positiva apresentava esse fenótipo (Figura 7).

Tabela 2. Valores da mediana de IFM para cada população celular no SP do grupo controle.

Tipo Celular	IFM CD150 FITC UA	IFM 307a PE UA
Células B	160	362
Células T	321 (bimodal)	22
Células NK	87	-
Células T ativadas	3433	-
Células B ativadas	7672	-

Nota: IFM: intensidade de fluorescência média. UA: unidades arbitrárias.

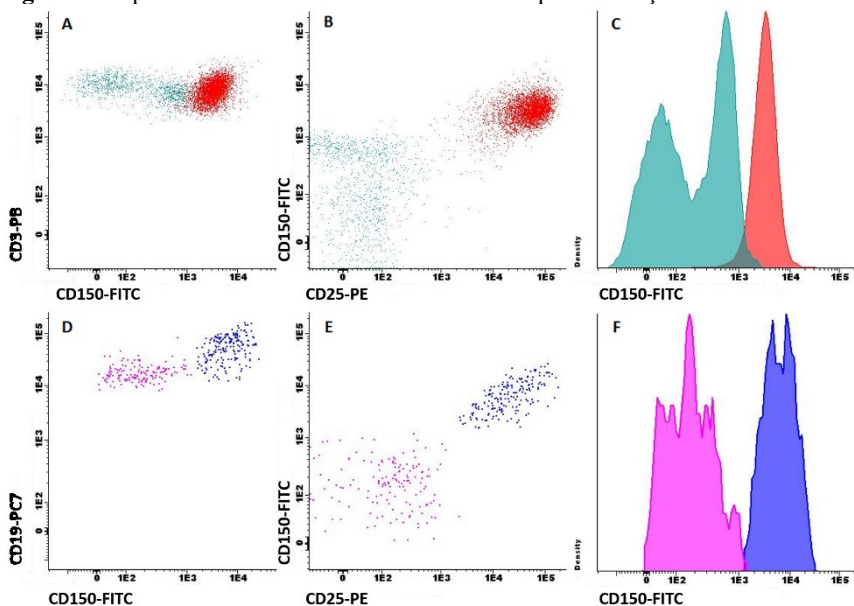
Figura 7. Expressão do antígeno CD150 nas subpopulações de células T CD8 no SP.



Nota: Painéis A, B e C) População em vermelho: células T, CD8 e CD150 positivas; em azul: células T CD8 positivas e CD150 negativas. A população em vermelho corresponde ao fenótipo de célula T CD8 de memória: CD27 e CD45RO positivas e CD45RA negativas. FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PC7: ficoeritrina-cianina 7; APC: alofocianina.

Em seguida, foi realizada a ativação dos linfócitos com PHA e observou-se maior expressão de CD150 com aumento nos valores de IFM nas células T ativadas quando comparada com as células T controle (sem ativação) (Figura 8, Tabela 2).

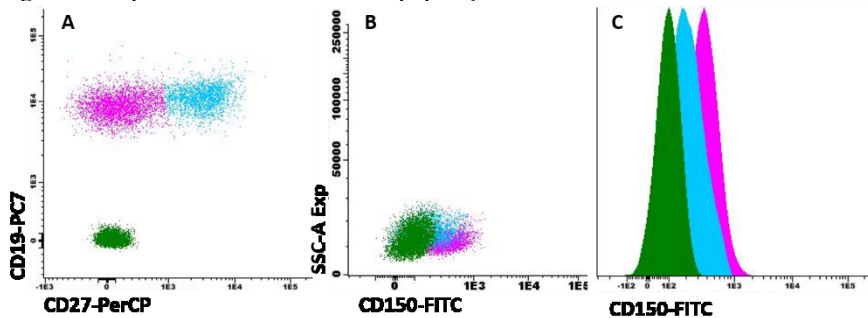
Figura 8. Expressão de CD150 em linfócitos T e B após a ativação.



Nota: Painéis A, B e C) População em azul-claro: células T não ativadas (sem adição de PHA) e CD25 negativas. População em vermelho: células T ativadas (após a adição de PHA) CD25 positivas. Painéis D, E e F) População em rosa: células B sem adição do ativador (sem PHA). População em azul: células B ativadas após a adição de PHA. FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PC7: ficoeritrina-cianina 7; PB: pacific blue.

A marcação do antígeno CD150 nas células B do grupo controle não mostrou um padrão bimodal (Figura 6), mas pode-se observar uma expressão parcial (Tabela 2) quando comparada com a população de células NK e T com apenas uma proporção de células B positivas para a molécula CD150. Para verificar se a população de células B CD150 positivas corresponde à população de memória, foi realizada a avaliação da expressão desse marcador nas células B virgens CD27 negativas, e nas células B de memória CD27 positivas. Como pode ser observado na Figura 9, tanto os linfócitos B virgens quanto os de memória apresentam expressão de CD150. Contrariamente aos resultados obtidos nas células T, a população B de memória (CD27 positiva) apresenta expressão de CD150 levemente menor em comparação com as células B virgens (CD27 negativas).

Figura 9. Expressão de CD150 nas subpopulações de células B no SP.

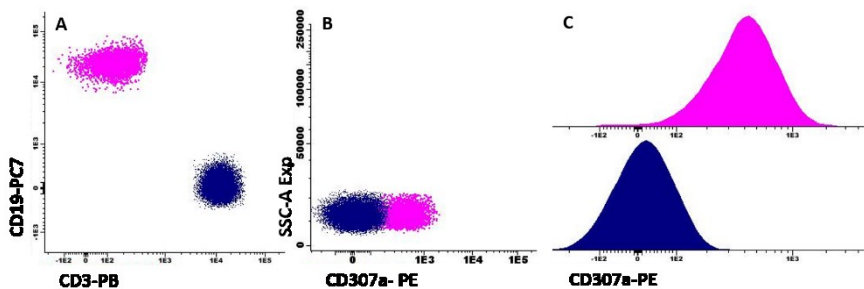


Nota: Painéis A, B e C) População em rosa: células B virgens, CD27 negativas. População em azul claro: células B de memória, CD27 positivas. População em verde: células NK, controle negativo interno. FITC: isotiocianato de fluoresceína; PC7: ficoeritrina-cianina 7; PerCP: proteína peridinin clorofil.

De forma semelhante às células T, as células B aumentaram a expressão de CD150 após a ativação *in vitro*. Como pode ser observado na Figura 8 e na Tabela 2, os valores de IFM das populações das células B e T ativadas foram maiores do que os de IFM da população controle dessas células sem a ativação. As células NK (CD19 e CD3 negativos) não apresentaram expressão do antígeno CD150 e, por esse motivo, foram escolhidas como controle negativo interno (Tabela 2).

Em seguida, também foi avaliada a expressão de CD307a nas células linfoides do SP. Como pode ser observado na Figura 10 e na Tabela 2, as células B do grupo controle, expressaram o antígeno CD307a com intensidade moderada e as células T foram negativas para esse marcador.

Figura 10. Expressão de CD307a no SP de um caso representativo do grupo controle.



Nota: População em azul: células T; em rosa: células B. Painel A) Dot plot da intensidade de fluorescência do CD3 versus CD19 mostrando as duas populações de linfócitos. Painel B) Dot plot de complexidade das células versus expressão de CD307a. Painel C) Expressão de CD307a representada em forma de histogramas. PE: ficoeritrina; PC7: ficoeritrina-cianina 7; PB: pacific blue.

Posteriormente, foi avaliada a expressão dos marcadores CD150 e CD307a nos precursores linfóides B em oito amostras de MO. Como pode ser observado na Figura 11, os precursores B não expressam CD150 nos estágios iniciais da maturação, apenas uma pequena proporção de células B maduras (com expressão de CD20) é positiva para esse marcador. Entretanto, os plasmócitos revelam positividade forte para CD150 (Tabela 3).

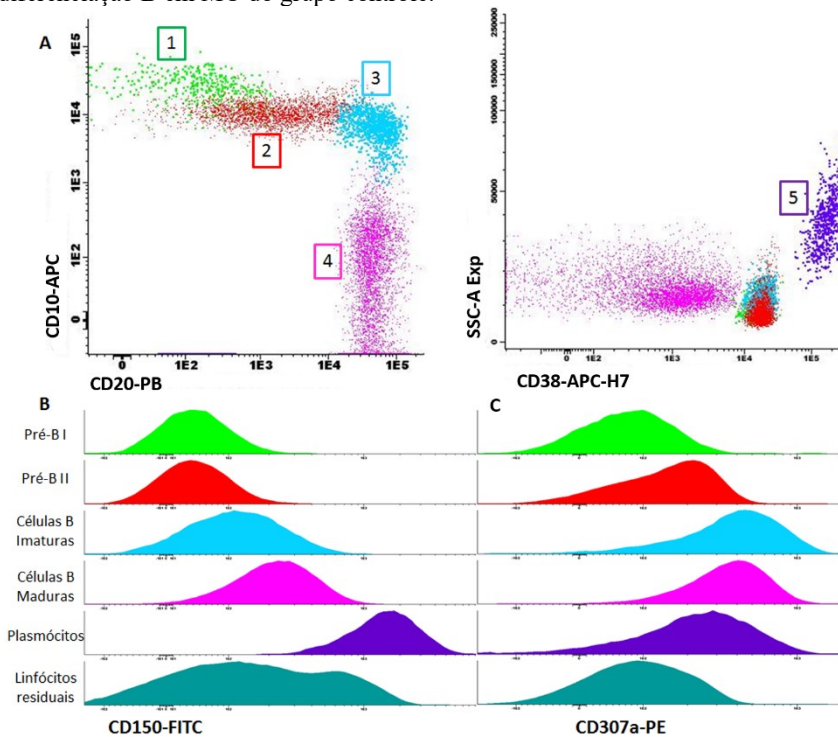
De forma similar aos dados apresentados anteriormente, pode-se observar que a expressão de CD307a (Figura 11) é mais intensa conforme ao grau de maturação das células B, ou seja, apenas as células B mais diferenciadas expressam esse marcador. Contudo, os plasmócitos mostraram positividade fraca para CD307a (Tabela 3 e Figura 11).

Tabela 3. Valores de medianas IFM para cada subpopulação de precursores linfóides B na MO.

População Celular	IFM CD150 FITC UA	IFM 307a PE UA
Pré B I	46	81
Pré B II	56	92
Células B imaturas	124	267
Células B maduras	244	382
Plasmócitos	1782	326

Nota: IFM: intensidade de fluorescência média. UA: unidades arbitrárias.

Figura 11. Expressão dos antígenos CD150 e CD307a nos diferentes estágios de diferenciação B em MO do grupo controle.



Nota: Paine A) *Dots plots* representativos mostrando os eventos CD19⁺ e os diferentes estágios de maturação B nos gráficos de CD10 versus CD20 e *dot plot* complexidade das células (SSC) versus CD38. População verde: Pré-BI; vermelha: Pré-BII; azul-claro: linfócitos B imaturos; rosa: linfócitos B maduros e roxa: plasmócitos. Nota-se a expressão intensa de CD38 nos plasmócitos. Paine B) Expressão de CD150 representada por histogramas nas subpopulações B. Paine C) Expressão de CD307a nas mesmas subpopulações. Linfócitos residuais (células T e NK) selecionados pelo gate na região de linfócitos do *dot plot* SSC versus CD45, onde foram excluídas as células B (CD19 positivas). FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; APC: alofocianina; PB: pacific blue; APC-H7: alofocianina-hilite7.

6.3 Expressão de CD150 nas NCLBM

Foi avaliada a expressão do marcador CD150 em um total de 89 amostras de pacientes com diagnóstico de NCLBM. Na Tabela 4 pode-se observar a análise qualitativa e as medianas dos valores de IFM para cada grupo de neoplasia.

Tabela 4. Resultados da análise qualitativa e quantitativa da expressão de CD150 nas NCLBM.

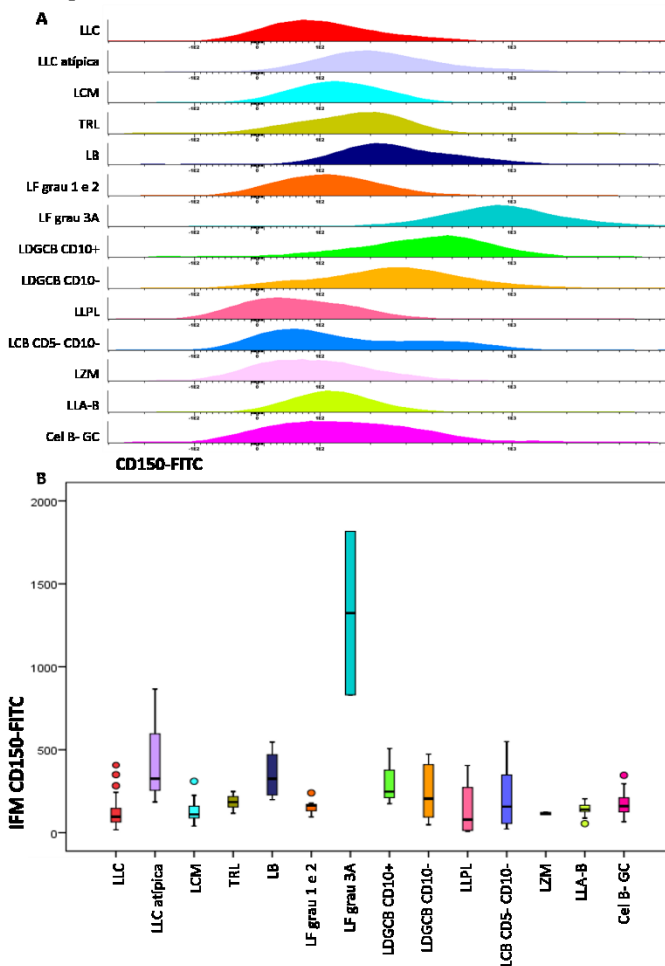
Subtipo de NCLBM	Expressão qualitativa de CD150					Mediana IFM CD150 FITC UA	Intervalo IFM CD150 FITC UA
	n	-	-/+	+	++		
LLC/LL	35	26	8	1		96	17-407
LLC atípica	3		2	1		265	68-866
LCM	10	9	1			110	40-310
TRL	6		5	1		184	117-248
LB	4		2	1	1 *	325	199-546
LF grau 1 e 2	10	4	6			163	95-240
LF grau 3A	2			1	1	1324	831-1817
LDGCB 10+	3	2	1			247	175-507
LDGCB 10-	6	3	1	2		205	48-473
LLPL	4	3	1			79	9-405
LCB CD5-CD10-	7	3	2	2		100	22-549
LZM	2	2				115	109-122
LLA	13	12	1			140	55-204
GC	10		8	2		160	66-346

Nota: * padrão bimodal. NCB: neoplasia de células linfóides B. n: número de casos avaliados. Expressão qualitativa: - negativa, -/+ fraca, + moderada, ++ forte. LLC/LL: Leucemia linfóide crônica/linfoma linfocítico, LCM: linfoma de células do manto, TRL: tricoleucemia, LB: linfoma de Burkitt, LF: linfoma folicular, LDGCB: linfoma difuso de grandes células B, LLPL: linfoma linfoplasmacítico, LCB: linfoma de células B, LZM: linfoma da zona marginal, LLA-B: Leucemia linfoblástica aguda- B, GC: grupo controle, IFM: intensidade de fluorescência média, UA: unidades arbitrárias.

Na análise estatística, foram observadas diferenças na distribuição de IFM do CD150 entre as categorias estudadas (Kruskal-Wallis $p = 0,002$). No entanto, quando foi realizado o teste pós-hoc, não foram observadas diferenças nas comparações múltiplas em forma de pares. Isso, pode ser devido à alta dispersão dos dados observada em alguns dos grupos e ao baixo número de casos avaliados nas categorias LF grau 3 e LZM. Também é possível que o nível de associação achado no Kruskal-Wallis seja fraco e logo após a utilização de um pós-teste mais robusto, essa significância desapareça.

No entanto, qualitativamente, observa-se que o que grupo das neoplasias de células B precursoras apresenta expressão homogênea, a maioria dos casos de LLA-B apresentaram-se negativos para esse marcador, semelhante ao observado nas células B precursoras normais (Figura 12). Também pode-se observar que esse subtipo de neoplasia apresenta uma mediana menor que a do grupo dos LB. Além disso, os dados não apresentam sobreposição (Tabela 4).

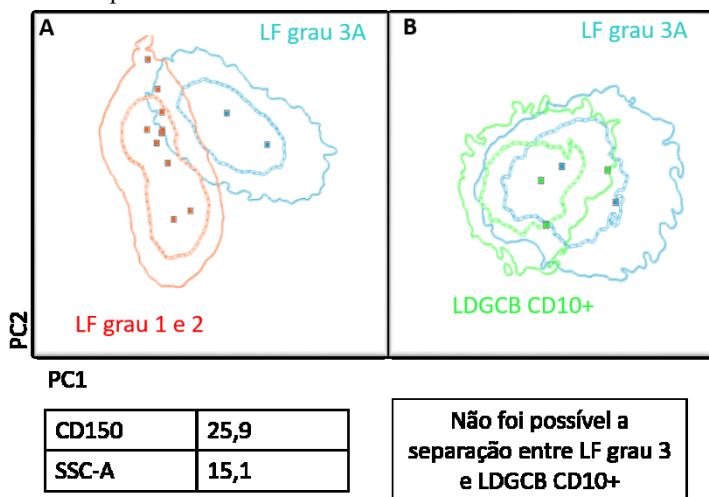
Figura 12. Expressão de CD150 nas diferentes NCLBM.



Nota: Paineil A) Fusão de arquivos merge com a expressão de CD150 nos linfócitos B clonais representado em forma de histogramas de todos os casos estudados. Paineil B) Diagrama de caixas. O teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes indicou uma $p=0,002$. O pós-teste Dunn não mostrou diferenças estatísticas nas comparações entre pares. LLC: Leucemia linfóide crônica, LCM: linfoma de células do manto, TRL: tricoleucemia, LB: linfoma de Burkitt, LF: linfoma folicular, LDGCB: linfoma difuso de grandes células B, LLPL: linfoma linfoplasmacítico, LCB: linfoma de Células B, LZM: linfoma da zona marginal, LLA-B: leucemia linfoblástica aguda- B, Cel B- GC: células B do grupo controle.

Os dois casos de LF grau 3A apresentaram expressão de moderada a forte para CD150, com uma mediana de IFM muito superior às outras NCLBM e, aproximadamente, dez vezes maior dos LF de baixo grau (Figura 12). Na figura 13, pode ser observado que o CD150 foi o parâmetro que mais contribuiu na discriminação entre as categorias LF grau 3A e LF de baixo grau.

Figura 13. Diagrama APS dos casos de LF grau 3A versus LF grau 1 e 2 e LDGCB CD10 positivo.



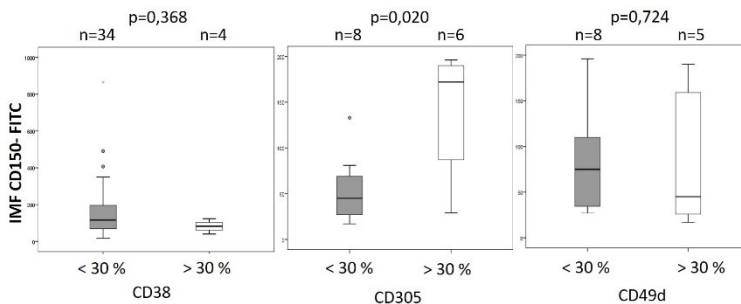
Nota: Painel A) LF de grau 1 e 2 versus LF de grau 3A. Painel B) LF grau 3A versus LDGCB CD10+. Gráficos de PC1 versus PC2. Os quadrados coloridos representam valores IFM dos casos individuais para todos os marcadores imunofenotípicos no painel que contribuem para PC1 e PC2. As linhas de contorno representam curvas desvio padrão (DP). As linhas pontilhadas e contínuas representam 1 DP e 2 DP respectivamente. Os dois marcadores mais informativos que contribuem para a melhor discriminação entre cada entidade da doença são apresentados na parte inferior de cada gráfico, em uma ordem decrescente da contribuição percentual para a discriminação. LF: linfoma folicular. LDGCB CD10+: linfoma difuso de grandes células B CD10 positivo.

Em relação às LLC, observa-se que os casos atípicos apresentam maior expressão de CD150, no entanto, existe uma sobreposição considerável entre os dados desse grupo e as LLC típicas e também entre as LLC e os LCM (Tabela 4 e Figura 12).

Visto que a expressão do marcador CD150 poderia identificar o subgrupo de pacientes com LLC de curso clínico mais indolente, foi

avaliada a expressão desse antígeno em relação com os marcadores de prognóstico CD38, CD49d e CD305 (LAIR 1). Pode-se observar na Figura 14 que a expressão de CD150 foi maior nos pacientes que apresentam marcadores de prognóstico favorável. No entanto, as diferenças significativas apenas foram observadas com o marcador CD305 ($p=0,020$). A comparação com o antígeno CD49d, não revelou diferenças entre os grupos (Figura 14).

Figura 14. Distribuição da expressão de CD150 de acordo a expressão de marcadores de prognóstico nos pacientes portadores de LLC.



Nota: Valor de corte para os marcadores prognósticos 30%. Para CD38 e CD49d a presença de > 30% de células positivas indica um mau prognóstico. Para CD305 a presença de > 30% de células positivas indica um bom prognóstico. Valores de p obtidos a partir do teste Mann-Whitney U.

6.4 Expressão de CD307a nas NCLBM

Os resultados da expressão do marcador CD307a nas diferentes NCLBM são mostrados na Tabela 5. Os dois casos de LF grau 3A foram agrupados com os LF de baixo grau, em virtude de não terem sido observadas diferenças na expressão de CD307a entre esses subtipos de linfomas. Nota-se que o número de casos avaliados qualitativamente é maior do que os casos analisados por meio da IFM. Como mencionado anteriormente, 11 casos de NCLBM foram avaliados com o anti-CD307a conjugado ao fluorocromo APC e os restantes com o anti-CD307a conjugado ao fluorocromo PE. Devido ao fato de não ser possível a comparação dos valores de IFM entre diferentes fluorocromos, os casos analisados com anti-CD307a-APC foram excluídos da análise quantitativa, mas foram incluídos na avaliação qualitativa a fim de evitar a perda dessas informações.

Como pode ser observado na Figura 16, as neoplasias de células B precursoras mostram uma expressão quase exclusivamente negativa para esse marcador (85 % dos casos), com exceção de duas amostras que apresentaram positividade fraca. Foram encontradas diferenças significativas nos valores de IFM entre esse grupo e as categorias LLC, LLC atípica, LCB CD5 e CD10 negativo e o GC mesmo que, os painéis imunofenotípicos usados atualmente na rotina, possam distinguir corretamente essas entidades.

Dentro do grupo das NCLBM comumente CD5 positivas, observam-se algumas diferenças. Por exemplo, o grupo das LLC é bastante heterogêneo e pode-se observar um amplo espectro de expressão de CD307a, desde casos totalmente negativos até casos com expressão forte. No entanto, o grupo das LLC atípicas mostram uma homogeneidade na expressão de CD307a, a qual é moderada em todos os casos. Já, os casos de LCM apresentam menor expressão desse marcador, sendo 60 % dos casos negativos. A análise estatística exhibe diferenças significativas na expressão do antígeno CD307a no grupo das LLC e os LCM ($p=0,048$). Porém, observa-se uma sobreposição entre os dados. Na comparação entre os LCM e as LLC atípicas, a análise estatística exibiu um valor de $p=0,052$, embora não houve sobreposição da IFM. Provavelmente, a ausência de significância seja devido ao baixo número de LLC atípicas analisadas.

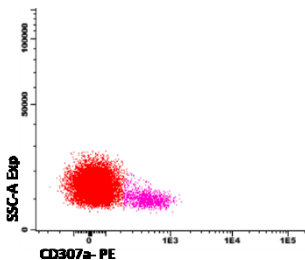
Em geral, as NCLBM apresentam diminuição da expressão de CD307a com relação ao grupo controle, porém somente a negatividade desse marcador na população de células B neoplásicas permitiu a discriminação das células B residuais normais (Figura 15), o que poderia ser útil na avaliação de doença residual mínima.

Tabela 5. Resultados da análise qualitativa e quantitativa da expressão de CD307a nas NCLBM.

Subtipo de NCLBM	Expressão qualitativa de CD307a					N	Mediana IFM CD307a PE UA	Intervalo IFM CD307a PE UA
	n	-	-/+	+	++			
LLC	37	4	16	14	3	36	347	37-1172
LLC atípica	3			3		3	610	600-633
LCM	10	6	4			9	130	54-267
TL	6	4	2			6	267	221-465
LB	5	2	3			3	243	81-250
LF	12	3	4	4	1	11	293	66-1758
LDGCB 10+	5	3		2		4	208	120-416
LDGCB 10-	6	4		2		5	205	83-393
LLPL	5	2	2		1	3	246	76-1286
LCB 5-10-	8		2	3		7	392	234-673
LZM	2			2		2	533	525-541
LLA	13	11	2			13	90	30-222
GC	10			10		10	362	260-461

Nota: NCB: neoplasia de células linfoides B. n: número de casos avaliados qualitativamente. N: número de casos avaliados quantitativamente. Expressão qualitativa: - negativa, -/+ fraca, + moderada, ++ forte. LLC/LL: Leucemia linfóide crônica/linfoma linfocítico, LCM: linfoma de células do manto, TRL: tricoleucemia, LB: linfoma de Burkitt, LF: linfoma folicular, LDGCB: linfoma difuso de grandes células B, LLPL: linfoma linfoplasmacítico, LCB: linfoma de células B, LZM: linfoma da zona marginal, LLA-B: Leucemia linfoblástica aguda- B, GC: grupo controle, IFM: intensidade de fluorescência média, UA: unidades arbitrárias.

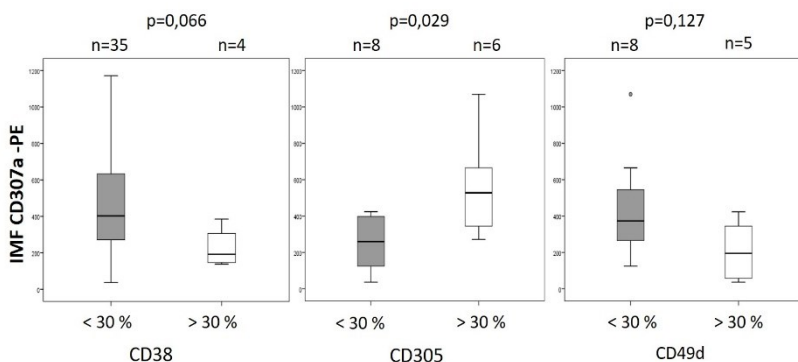
Figura 15. Identificação de células B normais residuais em uma amostra de LLC negativa para CD307a.



Nota: Dot Plot dos parâmetros SSC-A versus CD307a. População em vermelho: células B clonais de um caso de LLC totalmente negativo para CD307a. População em rosa: linfócitos B policlonais residuais.

Com o objetivo de avaliar se a expressão de CD307a no grupo das LLC poderia ser correlacionado com subgrupos clínicos, foi comparada a expressão de CD307a, com relação aos marcadores de prognóstico conhecidos para essa neoplasia (CD38, CD305 e CD49d). Assim, foi observado que existe uma diminuição na expressão do antígeno CD307a nos casos de LLC com prognóstico desfavorável (>30% de células CD38 e CD49d positivas e <30% de células CD305 positivas). No entanto, a comparação foi significativa somente com o marcador CD305 (Figura 17).

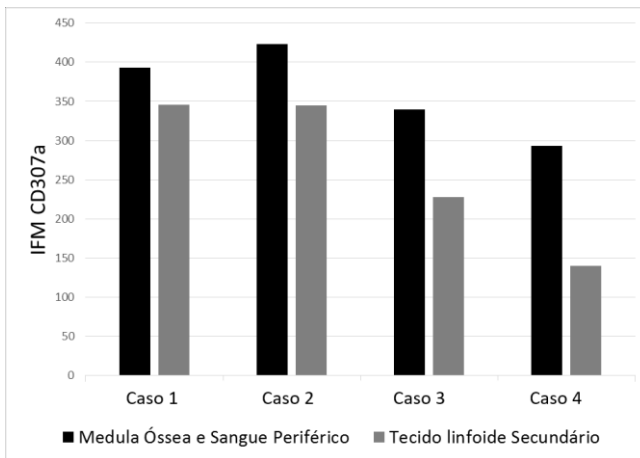
Figura 17. Distribuição da expressão de CD307a de acordo a expressão dos marcadores prognósticos nos pacientes portadores de LLC.



Nota: Valor de corte para os marcadores prognósticos 30%. Para CD38 e CD49d a presença de > 30% de células positivas indica um mau prognóstico. Para CD305 a presença de > 30% de células positivas indica um bom prognóstico. Valores de p obtidos a partir do teste Mann-Whitney U. Diagrama de caixas: o extremo superior da caixa indica o percentil 75 dos dados e o extremo inferior o percentil 25. A linha dentro da caixa corresponde à mediana. Os extremos das linhas verticais correspondem aos percentis 10 e 90. Os círculos correspondem a valores não incluídos nas linhas verticais (*outliers*).

Quatro dos pacientes estudados tinham amostras pareadas de MO ou SP e biópsias de tecidos linfoides secundários. Dois deles tinham diagnóstico de LLC, um de LF e um de LDGCB CD10 negativo. Nesses pacientes, foi observada de forma significativa, menor expressão do antígeno CD307a nas amostras provenientes dos linfonodos ($p=0,023$) (Figura 18).

Figura 18. Expressão de CD307a segundo o local anatômico em pacientes com amostras pareadas.



Nota: IFM: intensidade de fluorescência média. O teste t para amostras pareadas demonstrou um valor de $p=0,023$.

6.5 Expressão de CD150 e CD307a nas NCP

A expressão de CD150 e CD307a também foi investigada em plasmócitos neoplásicos de 21 amostras de neoplasias de células plasmocitárias (MM, GMSI e LCP) e cinco amostras de LDP, dessas, quatro eram LLPL e uma LLC com diferenciação plasmocitária. Esses dados foram comparados com os obtidos na análise dos plasmócitos do grupo controle de MO.

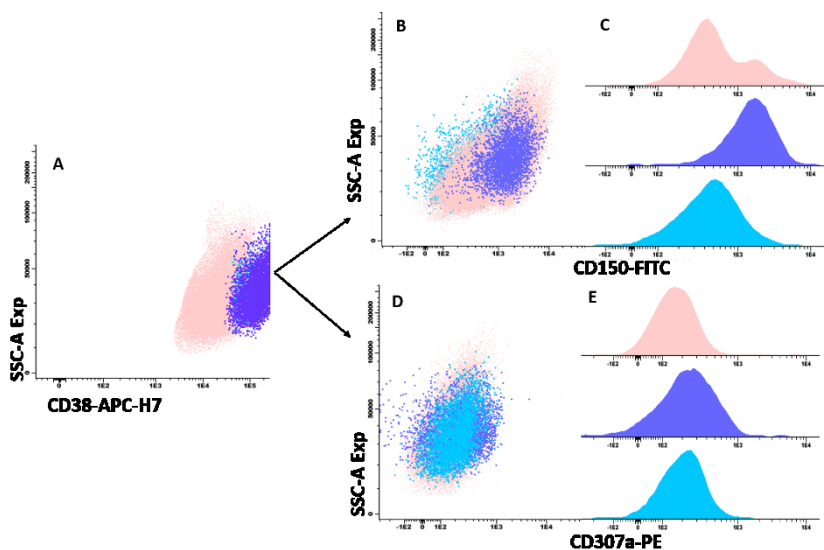
Na Figura 19, pode-se observar que os plasmócitos clonais dos LDP apresentam menor expressão de CD150 do que os plasmócitos normais e do que os plasmócitos dos NCP. Comparativamente, essas diferenças na expressão desse marcador foram significativas ($p=0,014$ e $p=0,029$ respectivamente) (Figura 20). Também foi notado que o grupo das NCP era bastante heterogêneo quando comparado com o grupo controle e que havia sobreposição nos valores de IFM entre essas categorias (Tabela 6). Na comparação entre esses grupos não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$).

Tabela 6. Resultados da análise quantitativa da expressão de CD150 e CD307a na população plasmocitária.

População de plasmócitos	n	Mediana IFM CD150 FITC UA	Intervalo IFM CD150 FITC UA	Mediana IFM CD307a PE UA	Intervalo IFM CD307a PE UA
NCP	21	1599	312-4878	202	100-463
LDP	5	364	191-553	201	133-249
GC	8	1782	971-2319	326	144-407

Nota: NCP: neoplasias de células plasmocitárias. LDP: linfomas com diferenciação plasmocitária. GC: grupo controle de MO. n: número de casos estudados. IFM: intensidade de fluorescência média. UA: unidades arbitrárias.

Figura 19. Expressão de CD150 e CD307a na população plasmocitária.

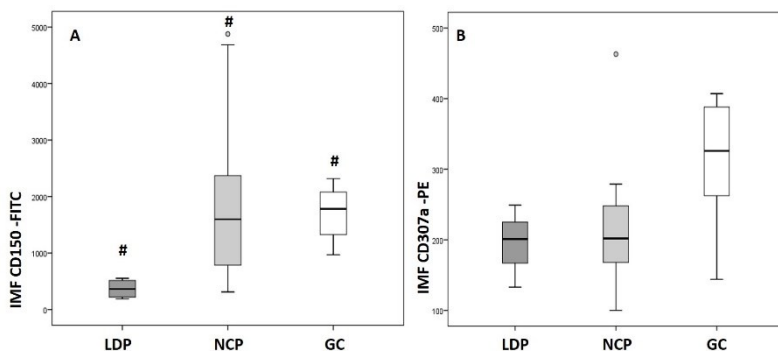


Nota: Fusão de arquivos merge da expressão de CD150 e CD307a nos plasmócitos de todos os casos estudados. População em rosa: plasmócitos das neoplasias de células plasmocitárias. População em azul claro: plasmócitos dos linfomas com diferenciação plasmocitária. População em roxa: plasmócitos normais do grupo controle. Paineis A) Note-se a menor expressão de CD38 nos plasmócitos clonais das NCP. Paineis B e C) expressão de CD150 nas três populações de plasmócitos. Paineis D e E) expressão de CD307a nas três populações de plasmócitos. FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; APC-H7: alofocianina-hilite7.

Dentro do grupo das NCP, o único caso de LCP avaliado apresentou expressão forte de CD150 com IFM de 1803 UA, a qual foi semelhante aos valores observados nos plasmócitos normais. Duas amostras de NCP apresentaram a presença de > 5% de plasmócitos residuais normais. Esses casos, provavelmente correspondentes à GMSI, apresentaram expressão forte de CD150 com valores de IFM de 2129 e 4878 UA.

A análise da expressão de CD307a nessas amostras, mostrou que não existem diferenças significativas na expressão desse marcador entre os três grupos ($p=0,128$). No entanto, pode ser observada uma expressão levemente maior desse marcador nos plasmócitos normais (Figura 20 e Tabela 6). Na Figura 19 pode-se observar que as três populações plasmocitárias ocupam o mesmo lugar no *dot plot* SSC-A versus CD307a.

Figura 20. Comparação da expressão de CD150 e CD307a na população plasmocitária.



Nota: Diagrama de caixas: o extremo superior da caixa indica o percentil 75 dos dados e o extremo inferior o percentil 25. A linha dentro da caixa corresponde à mediana. Os extremos das linhas verticais correspondem aos percentis 10 e 90. Os círculos correspondem a valores não incluídos nas linhas verticais (*outliers*). Painel A) Teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes, seguido do pós-teste Dunn. # $p < 0,05$ em relação ao grupo LDP. Painel B) Teste de Kruskal-Wallis indicou um valor de $p=0,128$.

LDP: linfomas com diferenciação plasmocitária. NCP: neoplasias de células plasmocitárias. GC: grupo de controle.

7. DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi analisada a expressão dos antígenos CD150 e CD307a nas células linfoides B normais e nas células neoplásicas de diferentes NCLBM para investigar se esses marcadores poderiam melhorar o desempenho da imunofenotipagem por citometria de fluxo para o diagnóstico das NCLBM.

A avaliação da expressão de CD150 nas células B do SP dos indivíduos saudáveis evidenciou uma proporção de linfócitos B maduros positivos para esse marcador, semelhante aos resultados encontrados por Punnonen e colaboradores (1997), nos quais pode ser observado o mesmo padrão de expressão de CD150 nos linfócitos B. Esse padrão, corresponde a um deslocamento da população de células B quando comparado com o controle negativo, em vez do padrão bimodal observado nos linfócitos T (PUNNONEN et al., 1997). Segundo a literatura, a proporção de células B no SP que expressam CD150 corresponde à população de células B CD19 e CD5 positivas. Assim como observado por Bologna e colaboradores (2016), a expressão desse marcador é identificada tanto nas células B de memória (CD27 positivas) quanto nas células B virgens (CD27 negativas) (Figura 9). Diferente dos linfócitos T, a expressão de CD150 nas células B maduras não é específica das células B de memória, e ainda foi observada uma leve diminuição da expressão de CD150 nessa população em relação às células B virgens, conforme foi reportado anteriormente (ROMERO et al., 2004).

Além disso, neste estudo foi demonstrado que a expressão do antígeno CD150 pode ser induzida após ativação *in vitro* dos linfócitos T e B (Figura 8), como observado anteriormente por outros pesquisadores (SIDORENKO et al., 1992; COCKS et al., 1995; ROMERO et al., 2004). Esse aumento na expressão da molécula CD150 nos linfócitos ativados é devido à função desse antígeno, pois, além de ser importante na regulação das interações entre as células B e T, promove a proliferação e a diferenciação B (PUNNONEN et al., 1997).

Nos precursores linfoides B da MO, não foi observada a expressão de CD150, mas percebeu-se um aumento na IFM, conforme o grau de maturação das subpopulações de células B (Figura 11). Em contrapartida, De Salort e colaboradores (2011) observaram expressão de CD150 nas células B a partir do estágio de maturação Pré-B I (De SALORT et al., 2011). Essas divergências podem ser atribuídas aos diferentes protocolos de marcação utilizados. A marcação indireta realizada por De Salort e colaboradores (2011) produz uma amplificação do sinal com aumento da IFM e consequentemente maior sensibilidade

(ABCAM, 2014; BD Biosciences, 2017). Ainda, a utilização de um fluorocromo mais brilhante (PE) pode aumentar a resolução entre as populações negativas e positivas. No entanto, existe uma maior expressão de CD150 conforme a maturação das células B na MO, demonstrado em ambos estudos.

Neste estudo, os plasmócitos normais da MO apresentaram forte expressão de CD150 (Figura 11 e Tabela 3). Vários trabalhos já demonstraram que as células B que estão em diferenciação plasmocitária apresentam aumento na expressão de CD150. Assim, dentro dos tecidos linfóides secundários, os plasmablastos e os plasmócitos exibem maior expressão desse antígeno (ROMERO et al., 2004; YURCHENKO et al., 2010; De SALORT et al., 2011; RODRIGUEZ-BAYONA et al., 2011).

Neste estudo, apenas um dos 13 casos de neoplasias de células B precursoras expressou CD150 (Tabela 4). Esse resultado está em concordância com resultados prévios, em que foi observada positividade para CD150 somente em quatro amostras de LLA-B das 46 analisadas (FAURE et al., 2011). Nossos resultados mostram que os valores de IFM nesse grupo foram menores do que os encontrados nos LB (Tabela 4). Essa diferença na expressão de CD150 poderia ser útil para o diagnóstico diferencial entre LLA-B e LB. As células do LB são linfócitos B maduros que expressam antígenos específicos da linhagem B CD19, CD20, CD79a, CD79b, CD22 e Ig de superfície com restrição de cadeia leve de membrana. Nessa neoplasia, os marcadores de células precursoras TdT nuclear e CD34 geralmente são negativos enquanto que os marcadores do centro germinativo CD10, CD38 e Bcl6 são positivos (SWERDLOW et al., 2008). No entanto, existem variações no fenótipo das células neoplásicas dos LB como, por exemplo, expressão de TdT e ausência de expressão de Ig de superfície (KOMROKJI et al., 2003; KELEMEN et al., 2010; HIRZEL et al., 2013). Assim, pode ser observada sobreposição fenotípica com as neoplasias de precursores B, especialmente com a LLA Pré-B, que corresponde a um estágio de maturação mais tardio. Neste estudo houve um caso de LB que apresentava características fenotípicas intermediárias entre células B imaturas (positividade para CD38, CD10 e TdT, sem expressão de Ig de superfície) e células B maduras (negatividade para CD34, e positividade para CD20, IgM e cadeia leve de Ig tipo *lambda* citoplasmática). Esse caso foi confirmado como LB graças à detecção da t(8;14) por FISH. Conforme o exposto, o marcador CD150 poderia ser útil na identificação dos casos de LB com características fenotípicas de precursor B. Contudo, esses dados devem ser avaliados com precaução, pois foram reportados casos de LLA Pré-B positivas para CD150 (GORDIENKO et al., 2016) e no presente estudo, dos casos de

LLA- B estudados, 12 apresentaram fenótipo comum e apenas um caso fenótipo de LLA Pró-B. Mikhailap e colaboradores (2004) não observaram expressão de CD150 nos casos de LB, porém eles utilizaram IHQ para a avaliação imunofenotípica e outro clone de anticorpo monoclonal (MIKHALAP et al., 2004).

Outro resultado relevante deste trabalho foi a elevada expressão de CD150 nos LF de alto grau (Tabela 4). Na classificação da OMS, os LF são divididos em diferentes graus, sendo essa subclassificação baseada na proporção de células linfoides B grandes (centroblastos) contadas na análise histológica. Assim, nos graus 1 e 2 predominam os centrócitos e há raros centroblastos, no grau 3A os centrócitos ainda estão presentes e no grau 3B os folículos são compostos inteiramente de grandes células blásticas. Essa gradação histológica prediz o comportamento clínico da neoplasia, assim, os linfomas de alto grau (graus 3A e 3B) são mais agressivos e apresentam uma maior probabilidade de progressão a LDGCB do que os de baixo grau (graus 1 e 2) (SWERDLOW et al., 2008). Além disso, a diferenciação entre o LDGCB com fenótipo CD10 positivo e os LF pode ser dificultosa. As características imunofenotípicas que ajudam no diagnóstico do LF como a positividade para a proteína citoplasmática Bcl-2 e a negatividade para o antígeno CD43 também podem ser observadas no LDGCB. Mesmo com o estudo molecular da t(14;18), observada em quase 90% dos LF, a discriminação não é possível, pois essa translocação também pode ser detectada em aproximadamente 20% dos casos de LDGCB. Sendo assim, o diagnóstico diferencial é feito pelo estudo do padrão histológico, porém não é possível ter essa informação em amostras obtidas por PAAF, em amostras de líquidos cavitários, de SP ou de MO (DUARTE, et al., 2013). Entretanto, as alterações fenotípicas frequentemente observadas nos LF, como a positividade fraca do CD19 e expressão forte da proteína intracitoplasmática Bcl-2, podem ser úteis para a identificação desses casos (CHAUFFAILLE, 2016). Cotrell e colaboradores (2015) sugerem que a avaliação do tamanho celular a partir do parâmetro FSC poderia ser útil na gradação das NCLBM. Os autores relataram que o tamanho das células neoplásicas dos LDGCB foi significativamente maior do que o tamanho observado nos LF grau 3 e nos LF de baixo grau (COTRELL et al., 2015). Considerando o exposto, vê-se a possível utilidade do marcador CD150 nesses diagnósticos diferenciais, pois foi observada uma certa especificidade para o LF grau 3. Além disso, a combinação do parâmetro FSC, o marcador CD150, e a avaliação de outros marcadores relevantes como CD19 e Bcl-2, poderia melhorar o desempenho da imunofenotipagem por citometria de fluxo para o diagnóstico diferencial

entre os LDGCB CD10 positivos, os LF de baixo grau e os LF de alto grau, dado que, atualmente, existe uma limitação da metodologia para discriminação dessas três entidades. Por meio da análise do diagrama APS, foi observado que o marcador CD150 e o parâmetro SSC-A, permitiram a separação correta dos pacientes avaliados nas categorias LF de baixo grau e LF de grau 3A. Não foi observada a discriminação entre os casos de LF grau 3A e LDGCB CD10 positivo com os parâmetros usados neste estudo (Figura 13).

Dois estudos realizados com amostras de pacientes diagnosticados com LLC, relataram uma expressão heterogênea de CD150, em alguns casos evidenciando menor expressão que nos linfócitos B normais, o que indica que alguns clones de LLC perdem a expressão desse marcador durante a transformação maligna (ZUCCHETTO et al., 2011; BOLOGNA et al., 2016). Tais estudos demonstraram ainda que os pacientes com menor expressão de CD150 apresentam marcadores moleculares e clínicos de doença agressiva. Além disso, esses trabalhos estabeleceram que a presença de $\leq 6\%$ de células CD150 positivas sugere menor sobrevida global e necessidade de tratamento mais precoce que os casos de LLC que expressam CD150. No presente trabalho, os resultados corroboram com a literatura, pois os pacientes diagnosticados com LLC e positividade para os marcadores imunofenotípicos de pior prognóstico, foram os que apresentaram menor expressão de CD150. No entanto, as diferenças significativas foram observadas apenas com o marcador CD305 e não foi realizada a avaliação de outras variáveis de maior relevância prognóstica como o estado mutacional dos genes IGVH ou a análise de curvas de sobrevida, como nos trabalhos citados.

Nas NCP foi observado que a expressão de CD150 é bem heterogênea. Alguns casos apresentaram IFM semelhantes aos plasmócitos normais e, outros, valores menores (Tabela 6). A diferença da distribuição desses dados entre essas populações plasmocitárias não foi significativa, porém pode ser observada uma menor mediana nos valores de IFM dos plasmócitos clonais em relação aos normais. Muccio e colaboradores (2015) obtiveram resultados semelhantes da expressão de CD150 nos plasmócitos dos pacientes com MM no momento do diagnóstico, ou seja, mostraram uma expressão heterogênea desse marcador (intervalo de IFM: 0-7352), com um valor de mediana de IFM (mediana= 899) menor do que a observada nos indivíduos saudáveis (mediana= 2851; intervalo de IFM: 982-4711) (MUCCIO et al., 2015). Nesse estudo, as LCP apresentaram IFM comparáveis com o grupo controle, semelhante ao observado no único caso avaliado no presente

trabalho. Os dois casos de GMSI avaliados apresentaram expressão forte de CD150, com valores de IFM superiores ao grupo controle. Notavelmente, os plasmócitos clonais dos LDP exibiram menores valores de IFM do marcador CD150 e foram estatisticamente significativos com relação aos outros grupos (Figura 20). Esse resultado poderia ter alguma relevância no diagnóstico dessas doenças. Conforme mencionado anteriormente, os plasmócitos clonais dos LDP apresentam um imunofenótipo semelhante aos plasmócitos normais, com a exceção da restrição de cadeia leve. Assim, a perda do antígeno CD150 seria uma alteração fenotípica observada nessas células, o que facilitaria a identificação dos plasmócitos clonais nesses linfomas. As outras alterações fenotípicas descritas, como a positividade de CD20 e CD5, não foram encontradas em todos os casos. A expressão de CD5 foi encontrada apenas no caso da LLC com diferenciação plasmocitária, e a expressão de CD20 foi parcial em dois dos quatro casos de LLPL. Além disso, a avaliação da expressão de CD150 é vantajosa por ser uma marcação de superfície, diferentemente da detecção da restrição de cadeia leve nos plasmócitos, que é intracitoplasmática. Não foram encontrados na literatura estudos semelhantes.

A avaliação da expressão de CD307a nas células B de SP no grupo controle mostrou que as células B na circulação apresentam positividade homogênea e moderada para esse marcador. Além disso, foi observado que, nos precursores B, a expressão de CD307a é negativa nos primeiros estágios de diferenciação e aumenta gradativamente conforme a maturação das células B. Contudo, foi encontrada uma positividade fraca para esse antígeno nos plasmócitos (Figura 11). Vários estudos comprovaram que a expressão de CD307a começa nos precursores B na MO e aumenta durante a diferenciação B, com pico máximo nas células B virgens. Após a ativação *in vivo*, essa expressão é regulada negativamente nas células B do CG e nos plasmócitos. As células B de memória recuperam a expressão de CD307a, porém com menor intensidade que as células B virgens (LEU et al., 2005; POLSON et al., 2006; MATESANZ-ISABEL et al., 2011). Portanto, considera-se que a molécula CD307a é expressa preferencialmente nas células B virgens e de memória.

Conforme aos resultados obtidos nos precursores normais (Tabela 3), a maioria das LLA-B foram negativas para a molécula CD307a. Apenas duas amostras apresentaram expressão fraca, mas os valores de IFM, nesses casos, foram menores que no grupo controle. Esses dados estão em concordância com os apresentados por Faure e

colaboradores (2011), que não observaram expressão desse marcador em nenhuma das 46 amostras de LLA-B testadas (FAURE et al., 2011).

Neste estudo, as NCLBM apresentaram heterogeneidade na expressão de CD307a. A máxima dispersão dos dados foi observada no grupo dos LLPL, LF e LLC. Esse padrão de expressão nas LLC já tinha sido reportado por POLSON e colaboradores (2006). Contudo, foi observado que no LCM a expressão desse marcador foi negativa na maioria dos casos, e os valores de IFM foram menores e estatisticamente significativos em relação às LLC (Tabela 5 e Figura 16). Portanto, o CD307a pode ser potencialmente útil no diagnóstico diferencial entre o LCM e as LLC. No entanto, foram encontrados quatro casos de LLC negativos para esse marcador, o qual mostra sobreposição com o grupo dos LCM. Porém, observou-se que as LLC atípicas, que apresentam características fenotípicas intermédias entre LLC e LCM, foram uniformemente positivas para CD307a, e poderiam ser identificadas pela expressão diferencial desse marcador em relação aos LCM. Assim, nas NCLBM CD5 positivas, a expressão moderada e forte de CD307a poderia excluir o diagnóstico de LCM, mas sua ausência ou expressão fraca não pode descartar completamente o diagnóstico de LLC. Como mencionado anteriormente, vários trabalhos avaliaram a utilidade do CD200 para o diagnóstico diferencial entre o LCM e LLC (SANDES et al., 2014; CHALLAGUNDLA et al., 2014). Nesses estudos, os casos de LCM apresentaram menor expressão de CD200, sendo a maioria dos casos negativos para esse marcador. No presente trabalho, todos os pacientes portadores de LCM foram negativos para CD200 e, contrariamente, observou-se que as LLC e as LLC atípicas apresentaram expressão de CD200. Sendo assim, o CD307a parece ser um marcador complementar ao CD200 para o diagnóstico diferencial de LLC e LCM.

Como visto anteriormente, a maioria dos LCM derivam de células B virgens localizadas na zona do manto dos folículos linfoides. As células B virgens normais são as que apresentam maior expressão de CD307a. Além disso, a expressão do gene FCRL1, que codifica para a molécula CD307a, foi avaliada por meio da técnica de hibridação *in situ* em tecido de amígdala, e foi observado um padrão de expressão característico localizado na zona do manto (MILLER et al., 2002). Esses resultados evidenciam que as células neoplásicas do LCM apresentam uma alteração fenotípica com perda da expressão de CD307a. Resultados semelhantes foram reportados por Zucchetto e colaboradores (2011), que observaram expressão fraca ou negativa de CD307a em algumas NCLBM, entre elas o LCM. No entanto, eles advertiram positividade quase exclusiva do CD307a nas LLC (ZUCCHETTO et al., 2011). Esse

resultado não foi reproduzido neste estudo, pois foram observados casos de LLC negativos e positividade de CD307a em vários dos outros subtipos de linfomas avaliados.

Outro estudo realizado por Du e colaboradores (2008) demonstrou que o antígeno CD307a foi amplamente expresso na maioria dos casos dos linfomas avaliados, sendo observada positividade em 100% dos casos de LF estudados (DU et al., 2008). No presente estudo foi notada uma expressão heterogênea de CD307a nesse subgrupo de NCLBM. Essas discordâncias podem ser atribuídas aos diferentes anticorpos monoclonais utilizados nos dois trabalhos. Vale ressaltar que o reagente usado por Du e colaboradores (2008) foi produzido pelos autores.

Além disso, foi observado um caso de LF e um caso de LLPL com valores muito elevados de IFM do marcador CD307a (Tabela 5 e Figura 16). As translocações no cromossomo 1q21, onde se localizam os genes que codificam para os receptores da família de FcRL, à qual pertence o antígeno CD307a, foram associadas a várias NCLBM. Consequentemente, a super-expressão de alguns receptores da família FcRL foi relacionada à presença de alterações gênicas no cromossomo 1q21. No entanto, a sobreexpressão de CD307a não foi correlacionada à presença dessa anomalia citogenética. Porém não pode ser descartada, porque não foi realizado o cariótipo desses pacientes (HATZIVASSILIOU et al., 2001; MILLER et al., 2002).

Assim como o antígeno CD150, observou-se diminuição da expressão de CD307a nos casos de LLC com marcadores de prognóstico desfavoráveis. Em congruência com esses resultados, Li e colaboradores (2008) demonstraram que os receptores CD307a, CD307b, CD307c e CD307e, todos membros da família FcRL, são capazes de estratificar as amostras de LLC de acordo com o estado mutacional dos genes IGVH. Todos eles foram preferencialmente expressos nos casos não mutados, e esses receptores também mostraram correlação negativa com a expressão de CD38 e ZAP70. Dessa forma, foram eficazes em identificar os pacientes com melhor prognóstico. No entanto, foi encontrado que o marcador CD307a apresentou menor concordância em relação ao estado mutacional dos genes IGVH. De acordo com esse estudo, o CD307b foi o melhor marcador prognóstico para LLC, devido à habilidade de prever mais satisfatoriamente, a progressão clínica dos pacientes e o tempo até o primeiro tratamento (LI et al., 2008).

Em pacientes com amostras pareadas, foi demonstrado que o antígeno CD307a apresenta menor expressão nos tecidos linfóides secundários (Figura 18). Foi reportado que alguns receptores da família

FcRL, a qual pertence a molécula CD307a, apresentam homologia na sequência e organização geral da porção extracelular com os membros da família CAM (do inglês *cell adhesion molecule*). Assim, esses receptores poderiam ter alguma participação na migração celular (MILLER et al., 2002; POLSON et al., 2006). Essa expressão diferencial também foi observada com o CD200 em casos de LF, mas o significado biológico desse fenômeno ainda é desconhecido (CHALLAGUNDLA et al., 2014).

No presente estudo, a expressão do antígeno CD307a nas NCP não demonstrou nenhuma característica relevante.

As NCLBM que apresentam os maiores desafios diagnósticos a partir da imunofenotipagem por citometria de fluxo são os LDGCB e os LZM, pois são caracterizados pela ausência de perfis de expressão específicos. Essas entidades exibem características imunofenotípicas muito heterogêneas e podem apresentar sobreposição fenotípica com muitas outras NCLBM. No presente estudo, nenhum dos marcadores avaliados apresentou benefícios para o diagnóstico desses subtipos de NCLBM. De qualquer forma, deve ser destacado que foram avaliados apenas dois casos de LZM.

8. CONCLUSÕES

Em relação ao marcador CD150:

- A expressão de CD150 nas células B não neoplásicas é crescente conforme a maturação, com máxima expressão na população plasmocitária e nos linfócitos B após ativação *in vitro*.
- A ausência da expressão de CD150 nas neoplasias de células B precursoras e a expressão moderada desse marcador no LB parece ser útil para identificar os casos de LB com fenótipo atípico de precursor B.
- Os LF de alto grau (3A) apresentaram elevada expressão de CD150, o que os diferencia dos LF de baixo grau. A avaliação da expressão de CD150 por citometria de fluxo apresenta potencialidade para substituir a gradação histológica dos LF.
- Nos casos de LLC, foi observada diminuição da expressão do antígeno CD150 nas amostras que apresentaram marcadores imunofenotípicos de prognóstico desfavoráveis.
- A perda da expressão de CD150 observada nos plasmócitos clonais dos LDP representa um achado inédito e a única alteração fenotípica observada em todos os casos de LDP estudados, além da restrição de cadeia leve intracitoplasmática.

Em relação ao marcador CD307a:

- A expressão do marcador CD307a também foi maior conforme a maturação de células B. No entanto, foi observada diminuição dessa expressão nos plasmócitos do grupo controle em comparação com os linfócitos B maduros.
- No diagnóstico diferencial das NCLBM comumente CD5 positivas, foi inferido que a expressão moderada e forte de CD307a pode excluir o diagnóstico de LCM, mas a ausência ou expressão fraca desse antígeno não descarta completamente o diagnóstico de LLC.
- Foi ratificado que a maior expressão de CD307a é observada no subgrupo de pacientes portadores de LLC com positividade para os marcadores imunofenotípicos de melhor prognóstico.

A compilação desses resultados sugere que a inclusão dos marcadores CD150 e CD307a no painel de anticorpos utilizados na citometria de fluxo pode contribuir com o aprimoramento da imunofenotipagem para o diagnóstico diferencial das NCLBM.

REFERÊNCIAS

ABCAM. **Secondary Antibodies Direct vs indirect immunofluorescence**, 2014. Disponível em: <<http://www.abcam.com/secondary-antibodies/direct-vs-indirect-immunofluorescence>>. Acesso em: 11 jan 2017.

ALIZADEH, A. et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. **Nature**, v. 403, n. 6769, p. 503, 2000.

ANDERSON, J. et al. Immunophenotyping of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) defines multiple sub-groups of germinal centre-like tumours displaying different survival characteristics. **Int J Oncol**, v. 35, n. 5, p. 961, 2009.

BAIN, B. J. **Leukaemia Diagnosis**. 4th Edition. ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010.

BASSIG, B. et al. Current Understanding of Lifestyle and Environmental Factors and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma: An Epidemiological Update. *Journal of Cancer Epidemiology*, v. 978930, p. 1-27, 2012.

BASSO, K. et al. Gene expression profiling of hairy cell leukemia reveals a phenotype related to memory B cell with altered expression of chemokine and adhesion receptors. **J Exp Med**, v. 199, n. 1, p. 59-68, 2004.

BASSO, K.; DALLA-FAVERA, R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 3, p. 172-184, 2015.

BAUMGARTH, N.; ROEDERER, M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. **J Immunol Methods**, v. 243, p. 77, 2000.

BD Biosciences. **SUPPORT PROTOCOLS. Indirect Immunofluorescence Staining of Mononuclear Cells**. Disponível em: <<https://www.bdbiosciences.com/us/resources/s/indirectstainingmononuclearcells>>. Acesso em: 11 jan 2017.

BELAUD-ROTUREAU, M. et al. A comparative analysis of FISH, RT-PCR, PCR, and immunohistochemistry for the diagnosis of mantle cell lymphomas. **Mod Pathol**, v. 15, n. 5, p. 517-25, 2002.

BLADE, J.; ROSIÑOL, L.; CIBEIRA, M. Are all myelomas preceded by MGUS?. **Blood**, v. 113, n. 22, p. 5370, 2009.

BOLOGNA, C. et al. SLAMF1 regulation of chemotaxis and autophagy determines CLL patient response. **J Clin Invest**, v. 126, n. 1, p. 181-94, 2016.

BOTTCHEER, S. et al. Hoofdstuk 27. Diagnosis and classification of mature B-cell malignancies. In: COMANS-BITTER **Nieuwe ontwikkelingen in de Medische Immunologie 2010**. Rotterdam: Afdeling Immunologie, Erasmus MC, Universitair Medisch Centrum, 2010. p. 355.

BOYLE, P.; LEVIN, B. **World cancer report**. 1st. ed. Lyon: IARC Press, 2008.

CAPONE, M. et al. Fc Receptor-Like Proteins in Pathophysiology of B-cell Disorder. **J Clin Cell Immunol**, v. 7, n. 3, p. 427, 2016.

CARDOSO, C. **Neoplasias de células linfoides maduras B: Avaliação os casos diagnosticados e acompanhados no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina entre 2011 e 2014**. 2015. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Farmácia. UFSC, Florianópolis.

CARDOSO, C. et al. Mature B cell neoplasms: retrospective analysis of 93 cases diagnosed between 2011 and 2014 in a University Hospital in southern Brazil. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 38, n. 2, p. 121-7, 2016.

CHALLAGUNDLA, P. et al. Differential Expression of CD200 in B-Cell Neoplasms by Flow Cytometry Can Assist in Diagnosis, Subclassification, and Bone Marrow Staging. **Am J Clin Pathol**, v. 142, p. 837, 2014.

CHAUFFAILLE, M. **Diagnósticos em Hematologia**. 1st. ed. São Paulo: Fleury-Manole, 2016.

CHIORAZZI, N.; RAI, K.; FERRARINI, M. Chronic lymphocytic leukemia. **N Engl J Med**, v. 352, p. 804-15, 2005.

COCKS, B. G. et al. A novel receptor involved in T cell actiation. **Nature**, v. 376, p. 260-3, 1995.

COSTA, E. et al. A new automated flow cytometry data analysis approach for the diagnostic screening of neoplastic B-cell disorders in peripheral blood samples with absolute lymphocytosis. **Leukemia**, v. 20, n. 7, p. 1221, 2006.

COTRELL, A. et al. Flow cytometric analysis of cell size in B cell non Hodgkin lymphoma: Reliability and potential diagnostic significance. **Int J Pathol Clin Res**, v. 1, p. 1, 2015.

CRAIG, F. E. Flow Cytometric Evaluation of B-cell Lymphoid Neoplasms. **Clin Lab Med**, v. 27, n. 3, p. 487, 2007.

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

CYTOGNOS. **User´s manual Infinicyt version 1.7**. 1st. ed. Salamanca: Cytognos S.L., 2012.

DAMLE, R. et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 94, n. 6, p. 1840-47, 1999.

DE SALORT, J. et al. Expression of SLAM (CD150) cell-surface receptors on human B-cell subsets: from pro-B to plasma cells. **Immunol Lett**, v. 134, n. 2, p. 129, 2011.

DEL POETA, G. et al. CD69 is independently prognostic in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive clinical and biological profiling study. **Haematologica**, v. 97, n. 2, p. 279-87, 2012.

DU, X. et al. FCRL1 on chronic lymphocytic leukemia, hairy cell leukemia, and B-cell non-Hodgkin lymphoma as a target of immunotoxins. **Blood**, v. 111, n. 1, p. 338-43, 2008.

DUARTE, A.; MIRTES SALES, M.; DE MORAES VASCONCELOS, D. **Citometria de fluxo - Aplicações no laboratório clínico e de pesquisa**. Primeira edição. ed. São Paulo: Atheneu, 2013.

EVANS, L. et al. CD5+ true SLL/CLL with plasmacytic differentiation an unusual 1p36 translocation. **Leukemia and Lymphoma**, v. 39, p. 625-32, 2000.

EVANS, L. S.; HANCOCK, B. W. Non-Hodgkin lymphoma. **Lancet**, v. 362, p. 139, 2003.

FABBRI, G.; DALLA FAVERA, R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. **Nat Rev Cancer**, v. 16, p. 145-62, 2016.

FAURE, G. et al. Mutual benefits of B-ALL and HLDA/HCDM HLDA 9th Barcelona 2010. **Immunol Lett**, v. 134, n. 2, p. 145-9, 2011.

FERRARINI, M. The continuing search for the cell of origin of chronic lymphocytic leukemia. **Hematology Meetings Reports**, v. 3, n. 3, p. 81-5, 2009.

GATTEI, V. et al. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 111, p. 865-73, 2008.

GHOBRAL, I. Are you sure this is Waldenstrom macroglobulinemia? **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2012, p. 586-94, 2012.

GORDIENKO, I. et al. Differential expression of CD150/SLAMF1 in normal and malignant B cells on the different stages of maturation. **Exp Oncol**, v. 38, n. 2, p. 101-7, 2016.

HANS, C. et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. **Blood**, v. 103, n. 1, p. 275, 2004.

HATZIVASSILIOU, G. et al. IRTA1 and IRTA2, novel immunoglobulin superfamily receptors expressed in B cells and involved in chromosome 1q21 abnormalities in b cell malignancy. **Immunity**, v. 14, p. 277-89, 2001.

HIRZEL, A. et al. Precursor B cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma with L3 morphology, philadelphia chromosome, MYC gene translocation, and coexpression of TdT and surface light chains: A case report. **Case Rep Pathol**, p. 679892, 2013.

HULSPAS, R. et al. Considerations for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 76, n. 6, p. 355, 2009.

INCA. **Estimativa 2016. Incidência de Câncer no Brasil**. Primeira edição. ed. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância., 2015.

ISAACSON, P. The current status of lymphoma classification. **Br J Haematol**, v. 109, n. 2, p. 258, 2000.

KELEMEN, K. et al. Immunophenotypic variations of Burkitt lymphoma. **Am J Clin Pathol**, v. 134, p. 127-38, 2010.

KOMROKJI, R. et al. Burkitt's leukemia with precursor B-cell immunophenotype and atypical morphology (atypical Burkitt's leukemia/lymphoma): case report and review of literature. **Leukemia Research**, v. 27, p. 561-66, 2003.

KUEHL, W.; BERGSAGEL, P. Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. **J Clin Invest**, v. 122, n. 10, p. 3456-63, 2012.

KUPPERS, R. Mechanisms of B cell lymphoma pathogenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 4, p. 251-62, 2005.

KUPPERS, R. et al. Cellular origin of human B cell lymphomas. **N Engl J Med**, v. 341, n. 20, p. 1520-29, 1999.

KYLE, R. et al. Clinical Course and Prognosis of Smoldering (Asymptomatic) Multiple Myeloma. **N Engl J Med**, v. 356, p. 2582-90, 2007.

LEACH, M.; DRUMMOND, M.; DOIG, A. **Practical Flow Cytometry in Haematology Diagnosis**. 1st. ed. Sussex: Wiley-Blackwell, 2013.

LENZ, G.; STAUDT, L. M. Aggressive lymphomas. **N Engl J Med**, v. 362, n. 15, p. 1417-29, 2010.

LESESVE, J. et al. Combination of CD160 and CD200 as a useful tool for differential diagnosis between chronic lymphocytic leukemia and other mature B-cell neoplasms. **Int J Lab Hematol**, v. 37, n. 4, p. 486, 2015.

LEU, C. et al. FcRH1: an activation coreceptor on human B cells. **Blood**, v. 105, n. 3, p. 1121-26, 2005.

LI, F. et al. FCRL2 expression predicts IGHV mutation status and clinical progression in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 112, n. 1, p. 179-87, 2008.

LIN, P. et al. Lymphoplasmacytic lymphoma and other non-marginal zone lymphomas with plasmacytic differentiation. **Am J Clin Pathol**, v. 136, p. 195-210, 2011.

LORSBACH, R. et al. Plasma cell myeloma and related neoplasms. **Am J Clin Pathol**, v. 136, p. 168-182, 2011.

MAECKER, H. T. et al. Selecting Fluorochrome Conjugates for Maximum Sensitivity. **Cytometry A**, v. 62, n. 2, p. 169, 2004.

MALONEY, D. G. Anti-CD20 antibody therapy for B-cell lymphomas. **N Engl J Med**, v. 366, n. 21, p. 2008, 2012.

MATESANZ-ISABEL, J. et al. New B-cell CD molecules. **Immunol Lett**, v. 134, n. 2, p. 104, 2011.

MIKHALAP, S. V. et al. The adaptor protein SH2D1A regulates signaling through CD150(SLAM) in B cells. **Blood**, v. 104, p. 4063, 2004.

MILLER, I. et al. IRTAs: a new family of immunoglobulinlike receptors differentially expressed in B cells. **Blood**, v. 99, n. 8, p. 2662-69, 2002.

MOREAU, E. et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). **Am J Clin Pathol**, v. 108, p. 378-82, 1997.

MORICE, W. et al. Predictive value of blood and bone marrow flow cytometry in B cell lymphoma classification: comparative analysis of flow cytometry and tissue biopsy in 252 patients. **Mayo Clin Proc**, v. 83, n. 7, p. 776-85, 2008.

MUCCIO, V. et al. Multiple myeloma: New surface antigens for the characterization of plasma cells in the era of novel agents. **Cytometry Part B**, v. 90, n. 1, p. 81-90, 2015.

NEPARIDZE, N.; DHODAPKAR, M. Waldenstrom macroglobulinemia: recent advances in biology and therapy. **Clin Adv Hematol Oncol**, v. 7, n. 10, p. 677-90, 2009.

NIERMANN, C.; SCHULZE, H.; HALLERMANN, C. The history of lymphoma classification with special consideration of cutaneous lymphomas. **J Leuk**, v. 1, n. 2, p. 112, 2013.

NOGAI, H.; DORKEN, B.; LENZ, G. Pathogenesis of Non-Hodgkin's lymphoma. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 14, p. 1803-11, 2011.

OCQUETEAU, M. et al. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. **Am J Clin Pathol**, v. 152, p. 1655-65, 1998.

PAIVA, B. et al. Utility of Flow Cytometry Immunophenotyping in multiple myeloma and others clonal plasma cell-related disorders. **Cytometry Part B**, v. 78, n. B, p. 239-52, 2010.

PALS, S. T.; DE GORTER, D. J.; SPAARGAREN, M. Lymphoma dissemination: the other face of lymphocyte homing. **Blood**, v. 110, p. 3102, 2007.

PEDREIRA, C. Generation of flow cytometry data files with a potentially infinite number of dimensions. **Cytometry A**, v. 73, n. 9, p. 834-46, 2008.

PERBELLINI, O. et al. Clinical significance of LAIR1 (CD305) as assessed by flow cytometry in a prospective series of patients with chronic lymphocytic leukemia. **Haematologica**, v. 99, n. 5, p. 881-87, 2014.

PERFETTO, S. P.; CHATTOPADHYAY, P. K.; ROEDERER, M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 8, p. 648, 2004.

POLSON, A. G. et al. Expression pattern of the human FcRH/IRTA receptors in normal tissue and in B-chronic lymphocytic leukemia. **Int Immunol**, v. 18, n. 9, p. 1363, 2006.

PUNNONEN, J. et al. Soluble and membrane-bound forms of signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes. **J Exp Med**, v. 185, n. 6, p. 993-1004, 1997.

REGO, E. M.; SANTOS, G. A. Papel da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das pancitopenias e das linfocitoses. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 31, n. 5, 2009.

ROBB-SMITH, A. U.S. National Cancer Institute working formulation of non-Hodgkin's lymphomas for clinical use. **Lancet**, v. 2, n. 8295, p. 432-4, 1982.

RODRIGUEZ-BAYONA, B.; RAMOS-AMAYA, A.; BRIEVA, J. A. Differential expression of SLAMS and other modulatory molecules by

human plasma cells during normal maturation. **Immunol Lett**, v. 134, p. 122, 2011.

ROMERO, X. et al. Differential expression of SAP and EAT-2 binding leukocyte cell-surface molecules CD84, CD150 (SLAM), CD229 (Ly9) and CD244 (2B4). **Tissue Antigens**, v. 64, p. 132, 2004.

ROSENWALD, A. et al. The Use of Molecular Profiling to Predict Survival after Chemotherapy for Diffuse Large-B-Cell Lymphoma. **N Engl J Med**, v. 346, p. 1937-47, 2002.

SANDES, A. F. et al. CD200 has an important role in the differential diagnosis of mature B-cell neoplasms by multiparameter flow cytometry. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 86, n. 2, p. 98, 2014.

SCOTT, D. W.; GASCOYNE, R. D. The tumour microenvironment in B cell lymphomas. **Nat Rev Cancer**, v. 14, n. 8, p. 517, 2014.

SEEGMILLER, A. et al. Immunophenotypic differentiation between neoplastic plasma cell in mature B-cell lymphoma vs plasma cell myeloma. **Am J Clin Pathol**, v. 127, p. 176-181, 2011.

SHAFFER, A.; ROSENWALD, A.; STAUDT, L. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 12, p. 920-32, 2002.

SHANKLAND, K. R.; ARMITAGE, J. O.; HANCOCK, B. W. Non-Hodgkin lymphoma. **Lancet**, v. 380, p. 848, 2012.

SIDORENKO, S. P. et al. Monoclonal antibodies of IPO series against B cell differentiation antigens in leukemia and lymphoma immunophenotyping. **NEOPLASMA**, v. 39, n. 1, p. 3, 1992.

SIEGEL, D. **Implantação da hibridização in situ fluorescente para investigação da translocação entre os cromossomos 8 e 14 em pacientes com suspeita de Linfoma de Burkitt na Divisão de Análises Clínicas do Hospital Universitário**. 2016. Monografia (especialização). Programa de Pós-graduação *lato sensu* Residência Integrada Multiprofissional em Saúde da UFSC. Florianópolis.

STEWART, B.; KLEIHUES, P. **World cancer report**. 1st. ed. Lyon: IARC Press, 2003.

STONE, M. J. Thomas Hodgkin: medical immortal and uncompromising idealist. **BUMC PROCEEDINGS**, v. 18, p. 368–375, 2005.

SWERDLOW, S. et al. The many faces of small B cell lymphomas with plasmacytic differentiation and the contribution of MYD88 testing. **Virchows Arch**, v. 468, n. 3, p. 259-75, 2016b.

SWERDLOW, S. H. et al. The 2016 revision of the World Health Organization (WHO) classification of lymphoid neoplasms. **Blood**, p. in press, 2016a.

SWERDLOW, S. H. et al. **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. 4th Edition. ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008.

TIACCI, E. et al. Evolving concepts in the pathogenesis of hairy cell leukaemia. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 6, p. 437-48, 2006.

TUTE, R. M. Flow cytometry and its use in the diagnosis and management of mature lymphoid malignancies. **Histopathology**, v. 58, n. 1, p. 90, 2011.

VAN DONGEN, J. et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. **Leukemia**, v. 17, p. 2257-2317, 2003.

VAN DONGEN, J. et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. **Leukemia**, v. 26, p. 1908-75, 2012.

VAN LOCHEM, E. G. et al. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 60, n. 1, p. 1, 2004.

WOOD, B. et al. 2006 Bethesda International Consensus Recommendations on the Immunophenotypic Analysis of Hematolymphoid Neoplasia by Flow Cytometry: Optimal Reagents and Reporting for the Flow Cytometric Diagnosis of Hematopoietic Neoplasia. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 72, n. Suppl 1, p. S14-22, 2007.

YURCHENKO, M. et al. CD150 regulates JNK1/2 activation in normal and Hodgkin's lymphoma B cells. **Immunology and Cell Biology**, v. 88, p. 565-74, 2010.

ZERBINI, M. et al. Classificação dos tumores hematopoiéticos e linfóides de acordo com a OMS: padronização da nomenclatura em língua portuguesa, 4ª edição. **J Bras Patol Med Lab**, v. 47, n. 6, p. 643-8, 2011.

ZINZANI, P. The many faces of marginal zone lymphoma. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2012, p. 426-32, 2012.

ZUCCHETTO, A. et al. Cluster analysis of immunophenotypic data: The example of chronic lymphocytic leukemia. **Immunology Letters**, v. 134, p. 137-144, 2011.

APÊNDICES

Apêndice A – Termo de consentimento livre e esclarecido CEPESH-UFSC nº 1.691.983/2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Análises Clínicas
Campus Universitário - Florianópolis, SC, 88049-000, Brasil
Tel: (48) 3721 8146

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DA PESQUISA:

Investigação de Novos Alvos Imunofenotípicos Aplicados ao Diagnóstico e ao Prognóstico de Neoplasias Hematológicas e Não Hematológicas

O(a) Senhor(a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Antes de decidir se deseja participar, é importante que o(a) Senhor(a) entenda por que esta pesquisa será feita. Por favor, leia com atenção e cuidado as informações a seguir para que a decisão sobre a sua participação possa ser uma decisão bem informada. Este termo de consentimento livre e esclarecido cumpre as exigências contidas nos itens IV. 3 da Resolução CNS nº466/12.

QUAL OBJETIVO DESTE ESTUDO?

O estudo acima refere-se a uma pesquisa que visa investigar novos marcadores que sirvam como alvos para o diagnóstico e para o prognóstico de neoplasias de células linfoides B maduras (linfomas) e não hematológicas (câncer de mama). Após a coleta do material biológico e realização dos exames laboratoriais solicitados pelo médico do senhor(a), a amostra biológica restante será encaminhada para a pesquisa. Dessa forma, seus exames não serão alterados ou prejudicados pela realização da pesquisa.

EU TENHO QUE PARTICIPAR?

Cabe ao senhor(a) decidir se irá ou não participar. Isso não irá afetar de maneira nenhuma, o padrão de cuidados que o(a) senhor(a) irá receber. Caso decida participar, o(a)senhor(a) irá receber este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para assinar. Mesmo que decida participar, o(a) senhor(a) ainda será livre para sair do estudo a qualquer momento, bastando para isso informar a sua desistência. Isso não irá afetar de maneira nenhuma, o padrão de cuidados que o(a) senhor(a) irá receber.

EXISTEM RISCOS OU DESCONFORTOS ASSOCIADOS COM A PARTICIPAÇÃO?

Não, pois não haverá duas coletas, aproveitaremos o mesmo material biológico colhido para os exames laboratoriais, dessa forma não há nenhum desconforto adicional. Entretanto, existe um pequeno risco de que o senhor(a) possa sentir algum mal-estar durante ou logo após a coleta porém, caso o senhor (a) sinta algo estará bem assistido pelos funcionários do setor de coleta.

QUAIS SÃO OS BENEFÍCIOS ESPERADOS COM A PESQUISA PARA O PARTICIPANTE?

Mesmo que o(a) senhor(a) não se beneficie diretamente dos resultados da pesquisa informo-lhe que estes resultados poderão contribuir futuramente para melhorar o diagnóstico laboratorial de inúmeros pacientes.

TEREI CUSTOS SE PARTICIPAR? TENHO DIREITO A RESSARCIMENTO?

Não, por ser voluntário e sem interesse financeiro, o(a) senhor(a) não terá nenhum gasto extra e também não terá direito a nenhuma remuneração ou ressarcimento. A participação na pesquisa não gerará despesas pessoais, nem danos porque a participação do(a) senhor(a) será apenas com a doação da amostra biológica colhida para a realização dos exames laboratoriais.

EU POSSUO ALGUM DIREITO À INDENIZAÇÃO?

Caso o senhor(a) tenha algum prejuízo material ou imaterial em decorrência da pesquisa poderá solicitar indenização, de acordo com a legislação vigente e amplamente consubstanciada em juízo.

MEUS DADOS SERÃO DIVULGADOS?

Informamos que não haverá nenhuma avaliação física ou entrevistas efetuadas pelos pesquisadores, sendo assim, os dados do seu prontuário

serão consultados e essas informações serão mantidas sob sigilo absoluto e privado. Os pesquisadores serão os únicos a ter acesso aos dados e tomarão todas as providências necessárias para a manutenção do sigilo, no entanto, existe a remota possibilidade da quebra do sigilo involuntário e não intencional, cujas consequências serão tratadas nos termos da lei. A divulgação dos resultados visará apenas mostrar os possíveis benefícios obtidos na pesquisa em questão e as informações divulgadas no meio científico serão anônimas e em conjunto com as informações de todos os participantes da pesquisa. O(a) Senhor(a) poderá solicitar informações durante todas as fases da pesquisa, inclusive após a publicação da mesma, pelos contatos informados no final deste documento.

COM QUEM DEVO ENTRAR EM CONTATO SE NECESSITAR DE MAIS INFORMAÇÕES?

Em caso de qualquer dano relacionado ao estudo, ou sempre que o(a) senhor(a) tiver qualquer dúvida sobre o estudo, por favor entre em contato com:

Coordenadora do Projeto:

Maria Cláudia Santos da Silva

Fone: (048) 3721-8146

Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias E-mail:

maria.claudia.silva@ufsc.br

Pesquisadores:

- Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira

Fone: (048) 3721-8146

Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias

E-mail: renatarudolf@gmail.com

- Mariângeles Auat

Fone: (048) 3721-8146

Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias

E-mail: mariauat@gmail.com

- Sandro Wopereis

Fone: (048) 3721-8146

Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias

E-mail: swopereis@gmail.com

Comitê de Ética em Pesquisa (local):

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Eu _____ confirmo
que:

1. Recebi informações sobre o estudo acima, além disso, li e entendi todas as informações fornecidas sobre minha participação nesta pesquisa;
2. Tive a oportunidade de discutí-las e fazer perguntas. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas satisfatoriamente e eu voluntariamente concordo em participar deste estudo;
3. Entendo que receberei uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
4. Concordo em participar deste estudo

Assinatura do participante

Nome do participante

Data: ____ / ____ / ____

Apêndice B - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) nº 1.691.983 /2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação de Novos Alvos Imunofenotípicos e Moleculares Aplicados ao Diagnóstico e ao Prognóstico de Neoplasias Hematológicas e Não Hematológicas

Pesquisador: Maria Cláudia Santos da Silva

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 52861715.0.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.691.983

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa de Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira, Mariangeles Auat e Sandro Wopereis, sob orientação da Profa. Dra Maria Cláudia Santos da Silva, do Programa de Pós-graduação em Farmácia da UFSC, que pretende avaliar novos marcadores imunofenotípicos em amostras de aspirado e biópsia de medula óssea e sangue periférico, amostras de aspirados e biópsias de linfonodos e biópsias de mama de um total de 300 pacientes. As análises serão realizadas no Laboratório de Onco-hematologia e Patologia do HU/UFSC.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Investigar alvos moleculares e novos alvos imunofenotípicos que sirvam como marcadores para o diagnóstico e para o prognóstico de neoplasias hematológicas e não hematológicas.

Objetivo Secundário:

- Determinar os padrões de expressão de novos marcadores em células de pacientes com suspeita diagnóstica neoplasias hematológicas;
- Comparar a intensidade de expressão dos novos marcadores entre as células neoplásicas e as células B normais presentes na medula óssea, no sangue periférico e no linfonodo;
- Identificar os marcadores celulares mais eficientes na distinção entre células normais e

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vítor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 1.691.983

neoplásicas;

- Identificar os marcadores celulares mais úteis na classificação e diagnóstico diferencial das neoplasias hematológicas;
- Verificar se os novos marcadores imunofenotípicos são úteis para detecção de doença residual mínima;
- Estabelecer um painel de anticorpos monoclonais capaz de diferenciar as células neoplásicas das populações normais em amostras provenientes de mama;
- Padronizar e validar a metodologia de citometria de fluxo para a identificação dos subtipos de câncer de mama;
- Comparar os resultados obtidos na imunofenotipagem por citometria de fluxo com aqueles obtidos pela análise histo ou citopatológica;
- Avaliar a relação custo-benefício para a aplicação dessa metodologia no ambiente hospitalar, bem como sua viabilidade;
- Implementar a metodologia de citometria de fluxo para a investigação de marcadores úteis para o diagnóstico e avaliação prognostica do câncer de mama;
- Padronizar e implantar as translocações t(8;14)(q24;q32), t(11;14)(q13;q32) e t(14;18)(q32;q21) por biologia molecular (PCR ou FISH) para auxiliar na classificação e diagnóstico das neoplasias de células B maduras.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Foram previstos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

-

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi apresentado novo modelo de TCLE garantindo possibilidade de indenização.

Recomendações:

-

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Lista de pendências:

- prever adequadamente os riscos e incluí-los no TCLE; PENDÊNCIA ATENDIDA.
- adequar o TCLE; PENDÊNCIA ATENDIDA.
- esclarecer o papel do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina na pesquisa e apresentar declaração da instituição. PENDÊNCIA ATENDIDA.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vítor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade CEP: 88.040-400
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 1.691.983

Para responder a estas pendências o pesquisador deverá elaborar uma "carta resposta" respondendo a todos os questionamentos e solicitações deste parecer.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Typo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_638313.pdf	18/07/2016 18:30:44		Aceito
Outros	RESPOSTAASPENDENCIAS3.pdf	18/07/2016 18:30:22	Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE18072016.pdf	18/07/2016 18:29:50	Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira	Aceito
Outros	RESPOSTAASPENDENCIAS2.pdf	27/06/2016 15:08:14	Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE3.pdf	27/06/2016 15:05:18	Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira	Aceito
Outros	RESPOSTAASPENDENCIAS.pdf	02/06/2016 15:03:35	Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	NOVOTCLE.pdf	02/06/2016 15:02:22	Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacao.pdf	17/05/2016 14:06:27	Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaohemosc.pdf	17/05/2016 14:05:07	Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoHU.pdf	29/01/2016 16:41:49	Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	17/12/2015 15:29:38	Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira	Aceito

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
 Bairro: Trindade CEP: 88.400-400
 UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
 Telefone: (48)3721-6094 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 1.691.983

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetodetalhado.pdf	16/12/2015 15:42:29	Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	04/12/2015 15:29:21	Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 22 de Agosto de 2016

Assinado por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade CEP: 88.040-400
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

Apêndice C- Termo de consentimento livre e esclarecido CEPESH-UFSC nº 913/2010

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa

“Neoplasias de Células Linfoides Maduras: Avaliação dos Casos Diagnosticados e Tratados no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina”. Neste estudo pretendemos avaliar os casos de neoplasias linfoides maduras (NCLM) diagnosticados e tratados pelo Serviço de Hematologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC).

O objetivo do estudo é avaliar o perfil dos pacientes diagnosticados com neoplasias de células linfoides maduras (NCLM) e tratados pelo Serviço de Hematologia do HUUFSC a fim de aperfeiçoar o atendimento a esses pacientes.

Para esse estudo adotaremos os seguintes procedimentos: análise do prontuário e dos resultados dos exames laboratoriais.

Não é necessária a coleta de uma nova amostra biológica e não há riscos para nenhuma das partes.

O benefício desse trabalho é que fará um retrato da realidade das NCLM no HUUFSC e discutirá as dificuldades encontradas no diagnóstico e tratamento a fim de propor soluções, visando ao melhor atendimento dos pacientes.

Para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar o seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento.

O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada.

O Sr (a) não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável e a outra será fornecida a você.

Eu, _____,
portador do documento de identidade _____ fui informado (a)
dos objetivos do estudo

“Neoplasias de Células Linfoides Maduras: Avaliação dos Casos Diagnosticados e Tratados no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina” de maneira clara e detalhada e esclareci as minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar a minha decisão de participar se assim o desejar.

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

Florianópolis, ____ de _____ de 20__.

Nome e assinatura do participante

Chandra Chiappin Cardoso, assinatura do pesquisador

Prof Maria Claudia Santos da Silva, assinatura do orientador do estudo

Nome e assinatura da testemunha

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP HU).

Apêndice D- Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa com seres humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) nº 913/2010.

Certificado http://www.reitoria.ufsc.br/~hpcep/projeto_cep/ce



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CERTIFICADO Nº 913

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º 0184-OR/99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o conteúdo no Regulamento Interno do CEPSH, CERTIFICA que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

APROVADO

PROCESSO: 913 PR: 359548

TÍTULO: Estudo sobre a prevalência, características clínicas e laboratoriais, sócio-demográficas e sobrevida dos pacientes com Neoplasia Hematológicas atendidos no Hospital Universitário - UFSC.

AUTOR: Joazito Angela Gamaça Del Moral, Laitza Haendichen Bemio, Thais Helena Otto da Silva

FLORIANÓPOLIS, 30 de Agosto de 2010.


 Coordenadora do CEPSH/UFSC

Prof.ª Magda Santos Koerich
 Subcoordenadora
 CEPSH/PRPE/UFSC

Apêndice E- Termo de consentimento livre e esclarecido do CEPESH/UFSC nº 746.486/2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
 Centro de Ciências da Saúde
 Departamento de Análises Clínicas
 Campus Universitário - Florianópolis, SC, 88049-000, Brasil
 Tel: (048) 3721 8146 Fax: (048) 3721 9542

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: Análise da expressão de proteínas em células sanguíneas de indivíduos adultos saudáveis para auxílio no diagnóstico de hemopatias

O(a) Senhor(a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Antes de decidir se deseja participar, é importante que o(a) Senhor(a) entenda por que esta pesquisa será feita. Por favor, leia com atenção e cuidado as informações a seguir para que a decisão sobre a sua participação possa ser uma decisão bem informada. Este termo de consentimento livre e esclarecido cumpre as exigências contidas nos itens IV. 3 da Resolução CNS nº466/12.

QUAL OBJETIVO E JUSTIFICATIVA DESTE ESTUDO?

O diagnóstico de doenças hematológicas é realizado com o auxílio da citometria de fluxo que utiliza anticorpos monoclonais para identificar antígenos expressos no citoplasma e membrana celular. O exame tem início com um painel de antígenos, o qual é decidido com base na suspeita clínica e morfológica, visando identificar e caracterizar a linhagem celular afetada, fundamentando o corpo clínico em tomada de decisões conforme a enfermidade encontrada.

Dentre as doenças possíveis de serem diagnosticadas pela citometria de fluxo, pode ser citada a HPN que resulta de uma mutação somática adquirida no gene PIG-A localizado no braço curto do cromossomo X (Xp22.1), relacionado à biossíntese de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), um fosfolípide acrescentado a determinadas proteínas logo após a sua tradução, para fixá-las à parte externa da membrana celular, como uma âncora de proteínas de superfície. Devido à ausência desta âncora nas células defeituosas, as proteínas que dela dependem para sua expressão (por exemplo, CD55 e CD59, nas hemácias) não aparecem na membrana da célula, impossibilitando que a célula desempenhe suas funções normalmente, gerando consequências ao organismo.

Conforme a importância supracitada da citometria de fluxo no diagnóstico das doenças hematológicas, se faz necessário a criação de imagens de referência, baseadas em indivíduos saudáveis, para orientar a análise da expressão dos antígenos celulares e possibilitar a distinção de um indivíduo doente de um indivíduo saudável pela equipe profissional do setor de Oncohematologia.

QUAIS OS PROCEDIMENTOS DESTE ESTUDO?

Após o consentimento, serão coletadas amostras de sangue total, em tubos de coleta com anticoagulante EDTA dos doadores de sangue do Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário (HI-UFSC). Estas amostras serão encaminhadas ao laboratório de Oncohematologia, onde serão processadas conforme protocolo de rotina do laboratório, utilizando-se a marcação dos antígenos celulares com o uso de anticorpos monoclonais ligados à fluorocromos. Posteriormente, a amostra será adquirida em citômetro FACSCanto II (BD Biosciences) e analisada no software Infinicyt (Cytognos). Os resultados gerados servirão como referência de indivíduos saudáveis, para a distinção da expressão de marcadores celulares com indivíduos doentes que são atendidos pelo Serviço de Análises Clínicas do HU-UFSC.

EU TENHO QUE PARTICIPAR? QUAIS SÃO OS BENEFÍCIOS ESPERADOS COM A PESQUISA?

Cabe ao senhor(a) decidir se irá ou não participar. Isso não irá afetar de maneira nenhuma, o padrão de cuidados que o(a) senhor(a) irá receber. Mesmo que o(a) senhor(a) não se beneficie diretamente dos resultados da pesquisa informamos que estes resultados poderão contribuir futuramente para melhorar o diagnóstico laboratorial de inúmeros pacientes. Espera-se, com esta pesquisa, implementar uma metodologia diagnóstica que seja prática, rápida, sensível, eficaz e que auxilie na correta identificação das células afetadas nestas doenças (principalmente nos casos de hemopatias). O senhor (a) poderá solicitar a desistência da pesquisa a qualquer momento, fazendo-a junto aos pesquisadores listados no final deste documento.

EXISTEM RISCOS OU DESCONFORTOS ASSOCIADOS COM A PARTICIPAÇÃO?

Não, pois não haverá duas coletas, aproveitaremos o mesmo sangue colhido para os exames laboratoriais realizados na amostra para a doação de sangue, desta forma não há nenhum desconforto adicional.

O QUE ACONTECERÁ COM AS INFORMAÇÕES DESTA PESQUISA E COMO OS MEUS DADOS PESSOAIS SERÃO UTILIZADOS?

Informamos que seus dados serão mantidos sob sigilo absoluto e privado. A divulgação dos resultados visará apenas mostrar os possíveis benefícios obtidos na pesquisa em questão e as informações divulgadas no meio científico serão anônimas e em conjunto com as informações de todos os participantes da pesquisa. O(a) Senhor(a) poderá solicitar informações durante todas as fases da pesquisa, inclusive após a publicação da mesma, através dos contatos informados no final deste documento.

O QUE ACONTECERÁ COM AS AMOSTRAS DE SANGUE CEDIDAS PARA ESTA PESQUISA?

As amostras de sangue cedidas pelo senhor(a), assim que analisadas serão dispensadas em descarte apropriado, posteriormente serão processadas, para destruir qualquer resquício que poderia ter sobrado da amostra de sangue. Após esse processamento, o resíduo gerado será recolhido pela empresa Proactiva e será descartado em aterro de material hospitalar.

QUE CUSTOS TEREI SE PARTICIPAR?

Por ser voluntário e sem interesse financeiro, o(a) Senhor(a) não terá nenhum gasto extra e também não terá direito a nenhuma remuneração.

EU POSSUO ALGUM DIREITO À INDENIZAÇÃO?

Por ser uma pesquisa de caráter voluntária e que não será realizado nenhum método adicional ao já realizado no processo de doação de sangue, o Senhor (a) não terá direito a nenhuma indenização.

QUEM REALIZARÁ ESTE ESTUDO?

Este estudo será realizado no *Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias*, situado no Hospital Universitário (HU-UFSC) e os pesquisadores envolvidos são as alunas do curso de pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC): Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira, Mariana Franzoni Maioral, Giovanna Steffenello Durigon, Lorena Santos Bubniak, Manoela Lira Reis, Pâmela Cristina Gaspar, Vanessa Mengatto, os alunos do curso de graduação em Farmácia-Bioquímica na mesma universidade: Alisson Bigolin, Suelen Mazucco e Kauê Taneli Gonçalves, a médica hematologista Drª Joanita Angela Gonzaga Del Moral, a professora Drª Ana Carolina Rabelo de Moraes, as bioquímicas Chandra Chiappin Cardoso e Iris Mattos Santos, sob a orientação da professora Drª Maria Cláudia Santos da Silva.

COM QUEM DEVO ENTRAR EM CONTATO SE NECESSITAR DE MAIS INFORMAÇÕES?

Em caso de qualquer dano relacionado ao estudo, ou sempre que o(a) senhor(a) tiver qualquer dúvida sobre o estudo, por favor entre em contato com:

Coordenadora do Projeto: Maria Cláudia Santos da Silva Fone: (048) 3721-8146

E-mail: maclau@ccs.ufsc.br

Laboratórios de Oncologia Experimental e Hemopatias e de Oncohematologia/DACL/HU

Departamento de Análises Clínicas

Centro de Ciências da Saúde

Universidade Federal de Santa Catarina

Campus Universitário

88040-900/Florianópolis,SC,Brasil

Pesquisadores: Álisson Bigolin

Fone: (048) 3721-8146

E-mail: ali_bigolin@grad.ufsc.br

Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira Fone: (048) 3721-8146

E-mail: renatarudolf@gmail.com

Comitê de Ética em Pesquisa (Local):

Endereço: Campus Universitário Rector João David Ferreira Lima		
Bairro: Trindade		CEP: 88.040-900
UF: SC	Município: FLORIANOPOLIS	
Telefone: (48)3721-9206	Fax: (48)3721-9696	E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

Declarações

Eu, _____
 recebi informações sobre o estudo acima, além disso, li e entendi todas as informações fornecidas sobre minha participação nesta pesquisa.

Tive a oportunidade de discutí-las e fazer perguntas. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas satisfatoriamente e eu voluntariamente concordo em participar deste estudo.

Ao assinar este termo de consentimento, estou de pleno acordo com os dados a serem coletados, podendo os mesmos serem utilizados conforme descrito neste termo de consentimento. Entendo que receberei uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

 Assinatura do Participante

Eu, _____ expliquei
 e apliquei este termo de consentimento ao participante da pesquisa e me dispôs a sanar qualquer dúvida sobre o estudo. Ao assinar este termo de consentimento, declaro, juntamente com minha equipe de pesquisa, o cumprimento da Resolução CNS nº466/12.

 Assinatura do colaborador

Florianópolis-SC, ____ de _____ de 20 ____

Apêndice F- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) nº 746.486/2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da expressão de marcadores celulares em indivíduos adultos saudáveis para auxílio no diagnóstico de hemopatias

Pesquisador: Maria Cláudia Santos da Silva

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 22406413.5.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 746.486

Data da Relatoria: 11/08/2014

Apresentação do Projeto:

"Análise da expressão de marcadores celulares em indivíduos adultos saudáveis para auxílio no diagnóstico de hemopatias". Projeto que visa criar um banco de imagens de referência com fins de comparação diagnóstica em doenças hematológicas, a partir de indivíduos considerados saudáveis, a fim de estudar as doenças possíveis de serem diagnosticadas pela citometria de fluxo que resulta de uma mutação somática adquirida no gene PIG-A localizado no braço curto do cromossomo X (Xp22.1), relacionado à biossíntese de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), um fosfolípido acrescentado a determinadas proteínas logo após a sua tradução, para fixá-las à parte externa da membrana celular, como uma âncora de proteínas de superfície.

Objetivo da Pesquisa:

Criação de um banco de imagens de referência com fins de comparação diagnóstica em doenças hematológicas, a partir de indivíduos considerados saudáveis.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores não existem riscos, pois não haverá duas coletas, será aproveitado o mesmo sangue colhido para os exames laboratoriais realizados na amostra para a doação de sangue, desta forma não há nenhum desconforto adicional.

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-900
UF: SC **Município:** FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3721-9206 **Fax:** (48)3721-9696 **E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br

Continuação do Parecer: 746.486

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata o presente de um projeto de pesquisa coordenado pela Profa. Drª. Maria Cláudia Santos da Silva do Departamento de Análises Clínicas da UFSC e tem como objetivo criar um banco de imagens de referência com fins de comparação diagnóstica em doenças hematológicas, a partir de indivíduos considerados realizarem a coleta da amostra de sangue periférico, os doadores serão examinados e entrevistados por um profissional da saúde. No exame físico, os doadores serão avaliados quanto à temperatura corporal, o peso, a altura, a pressão arterial, o pulso e a quantificação de hemoglobina capilar. A entrevista será realizada de acordo com os parâmetros para a seleção dos doadores estabelecidos pelo Ministério da Saúde pela Portaria MS nº 1.353 de 13 de junho de 2011 e pela Resolução RDC nº 57 de 16 de dezembro de 2010. O projeto se encontra devidamente instruído, documentação completa e TCLE adequado aos participantes, estando portanto de acordo com a Resolução CNS nº466/12 e normas complementares. Assim, recomendamos a sua aprovação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentação completa.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram detectadas pendências ou inadequações neste projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade CEP: 88.040-900
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-9206 Fax: (48)3721-9696 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 746.486

FLORIANOPOLIS, 11 de Agosto de 2014

Assinado por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade CEP: 88.040-900
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-9206 Fax: (48)3721-9898 E-mail: oep@reitoria.ufsc.br