

Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira

**INVESTIGAÇÃO DE NOVOS ALVOS IMUNOFENOTÍPICOS
APLICADOS AO DIAGNÓSTICO DE NEOPLASIAS DE
CÉLULAS LINFOIDES B MADURAS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Farmácia.

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.

Rudolf-Oliveira, Renata Cristina Messores
Investigação de novos alvos imunofenotípicos
aplicados ao diagnóstico de neoplasias de células
linfoides B maduras / Renata Cristina Messores
Rudolf-Oliveira ; orientadora, Maria Cláudia Santos
Silva , 2017.
178 p.

Tese (doutorado) - 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, diagnóstico diferencial, neoplasias de
células B maduras. I. , Maria Cláudia Santos-Silva.
II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Folha de aprovação

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora prof^a. Dr^a. Maria Claudia, pela oportunidade, pelos ensinamentos e por sempre acreditar em mim;

Meus pais Claudia e Mauro (*in memoriam*), meu irmão Eduardo e minha vó Martha pelo apoio incondicional na vida inteira;

Ao meu marido Rafael pelo apoio, paciência, parceria e por aturar os momentos de loucura;

Aos presentes que ganhei durante essa jornada e que participaram ativamente comigo: Guilherme na seleção do doutorado e Gustavo na qualificação;

A minha sogra Ana, pelos almoços e por cuidar dos meus bebês sempre que precisei me ausentar;

A prof^a. Dr^a. Maria Luiza Bazzo pelas oportunidades, compreensão e convivência em todos esses anos;

A parceira de experimentos Mariangeles, essencial para a execução desse trabalho;

A prof^a. Dr^a. Ana Carolina, pela ajuda estatística e a Mariana Maioral pela ajuda com o inglês;

Aos amigos do LOEH em especial a Chandra, Íris, Barbara e Jéssica pelo apoio técnico e científico;

Aos amigos do LBMMS, em especial ao Álisson e Hanalydia pela amizade e momentos de descontração;

Aos colaboradores do HEMOSC, em especial a Dr^a Maria Daniela e as bioquímicas Gisele e Mayara por separarem as amostras;

E finalmente aos pacientes do HU e HEMOSC que aceitaram participar da pesquisa e cujas amostras permitiram a realização deste trabalho.

RESUMO

O diagnóstico das neoplasias de células linfoides B maduras (NCBM) é baseado na combinação das informações clínicas, morfológicas, genéticas e imunofenotípicas. Nos últimos anos, tem se investido cada vez mais na imunofenotipagem por citometria de fluxo por essa metodologia fornecer informações rápidas e relevantes acerca do diagnóstico dos pacientes. No entanto, em algumas situações nas quais existe a sobreposição fenotípica o diagnóstico não pode ser concluído. O objetivo deste estudo foi investigar alvos imunofenotípicos (CD80, CD86, CD163, CD210a, CD261, CD262, CD264, CD358 e CD361) com possível aplicabilidade no diagnóstico diferencial entre as NCBM e novos alvos com possível aplicabilidade para o prognóstico (survivina, ABCB1/PgP e ABCC1/MRP1). Para a caracterização dos marcadores em células não neoplásicas foram utilizadas amostras de medula óssea (MO) e sangue periférico (SP). Nas neoplasias, foram utilizadas 195 amostras de pacientes com NCBM. O CD80 apresentou heterogeneidade de expressão nas NCBM. A expressão do CD86 foi moderada nas células neoplásicas de linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) e linfoma folicular e fraca nas células de linfoma de Burkitt, leucemia linfocítica crônica (LLC), linfoma linfoplasmocítico, linfoma da zona marginal e mieloma múltiplo (MM). O CD361 permitiu diferenciar o MM das demais NCBM. Não houve diferença na expressão das proteínas ABCC1/MRP1 e ABCB1/PgP entre as NCBM. Já a survivina estava expressa em todas NCBM com diferenças entre algumas e a superexpressão foi observada em células neoplásicas nos casos de LCM, MM, linfoma de células B CD5 negativo CD10 negativo e LDGCB. Entre as neoplasias, o MM apresentou diferença com todas as NCBM com relação a expressão de CD261. Além disso, os plasmócitos não neoplásicos expressaram CD261 enquanto que os plasmócitos clonais perderam a expressão desse marcador. Dessa forma, a expressão do CD261 pode ser utilizada como ferramenta auxiliar no diagnóstico imunofenotípico de MM. O CD262 foi útil no diagnóstico diferencial entre neoplasias com necessidade de distinção devido a sobreposição fenotípica pois permitiu diferenciar os casos de LDGCB CD10 negativo com linfoma de células do manto (LCM) e casos de LDGCB CD10 negativo e LLC. Dessa forma, o marcador com maior utilidade no diagnóstico diferencial foi o CD262 e o mais eficiente para a distinção entre células normais e neoplásicas foi o CD261. Assim, esses marcadores podem ser utilizados como ferramenta auxiliar no diagnóstico imunofenotípico das NCBM.

Palavras-chave: citometria de fluxo. novos marcadores. neoplasias de células B maduras. diagnóstico diferencial.

ABSTRACT

The diagnosis of mature B-cell neoplasms (MBCN) is based on the combination of clinical, morphological, genetic and immunophenotypic information. In recent years, the interest for methods such as immunophenotyping by flow cytometry has increased because this methodology is able to provide fast and important information about the patients' diagnosis. However, there are some situations in which the overlapping of cellular phenotypic characteristics hampers the diagnosis, thus it cannot be properly concluded. Therefore, the investigation of immunophenotypic markers is necessary so that the differential diagnosis between some subtypes of MBCN can be performed. The aim of this study was to investigate immunophenotypic targets (CD80, CD86, CD163, CD261, CD262, CD264, CD358 and CD361) possibly applicable as markers for the differential diagnosis of MBCN, and also targets possibly useful for prognosis (survivin, ABCB1/PgP and ABCC1/MRP1). Bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) samples were used to characterize the markers in non-neoplastic cells. In neoplastic cells, 195 samples from MBCN patients were used. CD80 was heterogeneously expressed in MBCN. CD86 expression was moderate in the neoplastic cells of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and follicular lymphoma, and weak in the cells of Burkitt lymphoma, chronic lymphocytic leukemia (CLL), lymphoplasmacytic lymphoma, marginal zone lymphoma and multiple myeloma (MM). CD361 expression differentiated MM from other MBCN. There was no difference in ABCC1/MRP1 and ABCB1/PgP protein expression among the MBCN. Survivin was expressed in all MBCN with some differences among them and overexpression was observed in CML, MM, B-cell lymphoma CD5 and CD10 negative and DLBCL neoplastic cells. Among the neoplasms, CD261 expression was significantly different in MM when compared to all MBCN. In addition, the results showed that non-neoplastic plasma cells express CD261, while clonal plasma cells do not express this marker. Thus, CD261 expression can be used as an auxiliary tool in the immunophenotypic diagnosis of MM. CD262 was useful in the differential diagnosis between neoplasms requiring distinction due to phenotypic overlap. This marker allows the differentiation between CD10 negative DLBCL cases with mantle cell lymphoma (MCL) and cases of CD10 negative DLBCL and CLL. Thus, the most useful marker in the differential diagnosis of MBCN was CD262, while CD261 was the most efficient marker to differentiate normal and neoplastic cells. As a result, these markers can be used as an auxiliary tool in the immunophenotypic diagnosis of MBCN.

Keywords: flow cytometry. new markers. mature B cell neoplasms. differential diagnosis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cálculo amostral para os grupos de neoplasias de células B maduras.....	56
Tabela 2 - Distribuição de gêneros e de tipos de amostras nas diferentes neoplasias de células B analisadas.	69
Tabela 3 - Médias das IFM das células não marcadas e das células B marcadas com CD80 e do CD86 nos diferentes tipos celulares do SP dos indivíduos saudáveis	73
Tabela 4 - Médias das IFM do CD86 nas amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias hematológicas nos diferentes tipos celulares.....	74
Tabela 5 - Número de casos de cada neoplasia para o CD80 e para o CD86.	76
Tabela 6 - Médias das IFM das células não marcadas e das células B marcadas com CD163 nos diferentes tipos celulares do SP dos indivíduos saudáveis.....	84
Tabela 7 - Médias das IFM do CD163 nas amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias hematológicas nos diferentes tipos celulares.....	85
Tabela 8 - Número de casos de cada neoplasia para o CD163.....	86
Tabela 9 - Médias das IFM das células não marcadas e das células B marcadas com CD210a nos diferentes tipos celulares do SP dos indivíduos saudáveis.....	89
Tabela 10 - Médias das IFM do CD210a nas amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias hematológicas nos diferentes tipos celulares	91
Tabela 11 - Número de casos de cada neoplasia para o CD210a.	93
Tabela 12 - Médias das IFM das células não marcadas e das células B marcadas com CD261 nos diferentes tipos celulares do SP dos indivíduos saudáveis.....	97
Tabela 13 - Médias das IFM do CD261 nas amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias hematológicas nos diferentes tipos celulares.....	98
Tabela 14 - Número de casos de cada neoplasia para o CD261.....	99
Tabela 15 - Médias das IFM das células não marcadas e das células B marcadas com CD262 nos diferentes tipos celulares do SP dos indivíduos saudáveis.....	104
Tabela 16 - Médias das IFM do CD262 nas amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias hematológicas nos diferentes tipos celulares.....	105
Tabela 17- Número de casos de cada neoplasia para o CD262.....	107
Tabela 18 -Médias das IFM das células não marcadas e das células B marcadas com CD264 nos diferentes tipos celulares do SP dos indivíduos saudáveis.....	112
Tabela 19 - Médias das IFM do CD264 nas amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias hematológicas nos diferentes tipos celulares.....	113

Tabela 20 - Número de casos de cada neoplasia para o marcador CD264.	115
Tabela 21 - Médias das IFM das células não marcadas e das células B marcadas com CD358 nos diferentes tipos celulares do SP dos indivíduos saudáveis	118
Tabela 22 - Médias das IFM do CD358 nas amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias hematológicas nos diferentes tipos celulares	118
Tabela 23- Número de casos de cada neoplasia para o CD358.	120
Tabela 24 - Médias das IFM das células não marcadas e das células B marcadas com CD361 nos diferentes tipos celulares do SP dos indivíduos saudáveis	124
Tabela 25 - Médias das IFM do CD361 nas amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias hematológicas nos diferentes tipos celulares	124
Tabela 26 - Número de casos de cada neoplasia para o CD361.	128
Tabela 27 - Médias das IFM das células não marcadas e das células B marcadas com ABCC1/MRP1 nos diferentes tipos celulares do SP dos indivíduos saudáveis	133
Tabela 28 - Médias das IFM da ABCC1/MRP1 nas amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias hematológicas nos diferentes tipos celulares	133
Tabela 29- Número de casos de cada neoplasia para a ABCC1/MRP1. ...	135
Tabela 30 - Médias das IFM das células não marcadas e das células B marcadas com ABCB1/PgP nos diferentes tipos celulares do SP dos indivíduos saudáveis	138
Tabela 31 - Médias das IFM da ABCB1/PgP nas amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias hematológicas nos diferentes tipos celulares	138
Tabela 32- Número de casos de cada neoplasia para a ABCB1/PgP.	140
Tabela 33 - Médias das IFM das células não marcadas e das células B marcadas com survivina nos diferentes tipos celulares do SP dos indivíduos saudáveis	143
Tabela 34- Número de casos de cada neoplasia para a survivina	144

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Alguns dos anticorpos monoclonais submetidos ao nono Workshop HLDA.....	28
Quadro 2 - Classificação das neoplasias de células B maduras segundo a OMS 2017 (Continua).....	35
Quadro 3 - Pannel de anticorpos monoclonais utilizado na classificação das neoplasias de células B maduras, publicado pelo grupo Euroflow.	46
Quadro 4 - Grupos para diagnóstico diferencial	47
Quadro 5 - Características dos anticorpos monoclonais para a avaliação imunofenotípica	57
Quadro 6 - Pannel de anticorpos monoclonais utilizados para a marcação de membrana celular nas amostras dos pacientes com NCBM.....	58
Quadro 7 - Pannel de anticorpos monoclonais utilizados para a marcação intracelular direta	58
Quadro 8 - Pannel de anticorpos monoclonais utilizados para a marcação de membrana células nas amostras controle de SP e MO	59
Quadro 9- Exemplo de tubos para a avaliação do controle FMO	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estimativas de casos novos de LNH, no Brasil, para o ano de 2020.	25
Figura 2 - Estimativas de mortalidade por LNH, no Brasil, para o ano de 2020.	26
Figura 3 - Origem das neoplasias de células linfoides B maduras.	34
Figura 4 - Estratégia de análise para eliminação dos restos celulares	61
Figura 5 - Figura ilustrativa da estratégia de reconhecimento das células linfoides B pela análise do CD19 e do CD45.....	62
Figura 6 - Figura ilustrativa estratégia de reconhecimento das células plasmocitárias CD19 negativas	62
Figura 7 - Estágios de maturação das células linfoides B nas amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias	63
Figura 8 - Figura ilustrativa da estratégia de reconhecimento das células linfoides T pela análise do CD3 e do CD45.....	64
Figura 9 - Figura ilustrativa da estratégia de reconhecimento dos eosinófilos, neutrófilos, monócitos e basófilos pela análise do CD45 e das características de dispersão de luz	64
Figura 10 - Figura ilustrativa da estratégia de reconhecimento das células NK pela análise do CD3, do CD19 e do CD45.....	65
Figura 11 - Padrão de expressão qualitativa dos resultados	66
Figura 12 - Histogramas da caracterização do CD80 e do CD86 nas células do SP dos indivíduos saudáveis	72
Figura 13- Expressão de CD80 em monócitos sem e com ativação com fitohemaglutinina	73
Figura 14 - Histogramas da caracterização do CD86 nas células de MO dos indivíduos sem neoplasias	75
Figura 15 - Histogramas representativos da comparação da expressão entre as células não marcadas e as células dos pacientes com neoplasias de células B no marcador CD80.	77
Figura 16 - Comparação da expressão de CD80 entre as diferentes neoplasias avaliadas no estudo.....	78
Figura 17 - Histogramas representativos da comparação da expressão entre as células não marcadas e as células dos pacientes com neoplasias de células B no marcador CD86.	80
Figura 18 - Comparação da expressão de CD86 entre as diferentes neoplasias avaliadas no estudo.....	81

Figura 19 - Histogramas da caracterização do CD163 nas células do SP dos indivíduos saudáveis	83
Figura 20 - Histogramas da caracterização do CD163 nas células de MO dos indivíduos sem neoplasias	85
Figura 21 - Histogramas representativos da comparação da expressão entre as células não marcadas e as células dos pacientes com neoplasias de células B no marcador CD163.	87
Figura 22 - Comparação da expressão de CD163 entre as diferentes neoplasias avaliadas no estudo com as células B dos indivíduos saudáveis (controle negativo).....	88
Figura 23 - Histogramas da caracterização do CD210a nas células do SP dos indivíduos saudáveis	90
Figura 24 - Histogramas da caracterização do CD210a nas células de MO dos indivíduos sem neoplasias	92
Figura 25 - Histogramas representativos da comparação da expressão entre as células não marcadas e as células dos pacientes com neoplasias de células B no marcador CD210a.	94
Figura 26 - Comparação da expressão de CD210a entre as diferentes neoplasias avaliadas no estudo	95
Figura 27 - Histogramas da caracterização do CD261 nas células do SP dos indivíduos saudáveis	96
Figura 28 - Histogramas da caracterização do CD261 nas células de MO dos indivíduos sem neoplasias	98
Figura 29 - Histogramas representativos da comparação da expressão entre as células não marcadas e as células dos pacientes com neoplasias de células B no marcador CD261.	100
Figura 30 - Comparação da expressão de CD261 entre as diferentes neoplasias avaliadas no estudo	101
Figura 31 - Separador de populações automático mostrando a separação entre plasmócitos normais e plasmócitos clonais de MM no CD261	102
Figura 32 - Histogramas da caracterização do CD262 nas células do SP dos indivíduos saudáveis	104
Figura 33 - Histogramas da caracterização do CD262 nas células de MO dos indivíduos sem neoplasias	106
Figura 34 - Histogramas representativos da comparação da expressão entre as células não marcadas e as células dos pacientes com neoplasias de células B no marcador CD262	108
Figura 35 - Comparação da expressão de CD262 entre as diferentes neoplasias avaliadas no estudo	109

Figura 36 - Separador de populações automático mostrando a separação entre LLC e MM no CD262	110
Figura 37 - Histogramas da caracterização do CD264 nas células do sangue periférico dos indivíduos saudáveis	112
Figura 38 - Histogramas da caracterização do CD264 nas células de MO dos indivíduos sem neoplasias	114
Figura 39 - Histogramas representativos da comparação da expressão entre as células não marcadas (preto) e as células dos pacientes com neoplasias de células B (vermelho) no marcador CD264	116
Figura 40 - Histogramas da caracterização do CD358 nas células do SP dos indivíduos saudáveis	117
Figura 41 - Histogramas da caracterização do CD358 nas células de MO dos indivíduos sem neoplasias	119
Figura 42 - Histogramas representativos da comparação da expressão entre as células não marcadas e as células dos pacientes com neoplasias de células B no marcador CD358	121
Figura 43 - Comparação da expressão de CD358 entre as diferentes neoplasias avaliadas no estudo	122
Figura 44- Histogramas da caracterização do CD361 nas células do SP dos indivíduos saudáveis	123
Figura 45 - Histogramas da caracterização do CD361 nas células de MO dos indivíduos sem neoplasias	125
Figura 46- Perfil de expressão do CD45 e do CD361 nas células leucocitárias da MO.	126
Figura 47 -Variação na intensidade de expressão dos leucócitos no CD45 e no CD361	127
Figura 48 - Histogramas representativos da comparação da expressão entre as células não marcadas e as células dos pacientes com neoplasias de células B no marcador CD361	129
Figura 49 - Comparação da expressão de CD361 entre as diferentes neoplasias avaliadas no estudo	130
Figura 50 - Histogramas da caracterização do ABCC1/MRP1 nas células dos indivíduos saudáveis.....	132
Figura 51 - Histogramas da caracterização da ABCC1/MRP1 nas células de MO dos indivíduos sem neoplasias	134
Figura 52 - Histogramas representativos da comparação da expressão entre as células não marcadas e as células dos pacientes com neoplasias de células B no marcador ABCC1/MRP1	136
Figura 53 - Histogramas da caracterização do ABCB1/PgP nas células dos indivíduos saudáveis.....	137

Figura 54 - Histogramas da caracterização da ABCB1/PgP nas células de MO dos indivíduos sem neoplasias.....	139
Figura 55 - Histogramas representativos da comparação da expressão entre as células não marcadas e as células dos pacientes com neoplasias de células B no marcador ABCB1/PgP	141
Figura 56 - Histogramas da caracterização da survivina nas células dos indivíduos saudáveis.....	143
Figura 57 - Histogramas representativos da comparação da expressão entre as células não marcadas e as células dos pacientes com neoplasias de células B no marcador survivina.....	145
Figura 58 - Comparação da expressão da survivina entre as diferentes neoplasias avaliadas no estudo.....	146
Figura 59 - Comparação da expressão da survivina entre os linfócitos B normais do SP e as diferentes neoplasias avaliadas no estudo.....	148

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Aloficocianina
AcMo	Anticorpos monoclonais
APC-Cy7	Aloficocianina cianina 7
APC-H7	Aloficocianina-Hilite7
BD	Becton Dickinson
CD	Grupos de diferenciação do inglês <i>Clusters of Differentiation</i>
CEPSH	Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos
CF	Citometria de fluxo
DACL	Divisão de Análises Clínicas
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FITC	Isotiocianato de fluoroceína
FMO	Fluorescência menos um
FSC	do inglês <i>Foward Scatter</i> (tamanho celular)
HEMOSC	Hemocentro de Santa Catarina
HLDA	do inglês <i>Human Leukocyte Differentiation Antigens</i>
HU	Hospital Universitário
IFM	Intensidade de fluorescência média
Ig	Imunoglobulina
IMF	Imunofenotipagem
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LB	Linfoma de Burkitt
LCM	Linfoma de células do manto
LDGCB	Linfoma difuso de grandes células B
LDH	Lactato desidrogenase
LF	Linfoma folicular
LH	Linfoma de Hodgkin
LLA-B	Leucemia linfoblástica aguda B de células B
LLC/LLPC	Leucemia linfóide crônica/Linfoma linfocítico de pequenas células
LLPL/MW	Linfoma linfoplasmocítico/Macroglobulinemia de Waldenström
LNH	Linfomas não Hodgkin

LOEH	Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias
LPL	Leucemia prolinfocítica B
LZM	Linfoma da zona marginal
LZME	Linfoma 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
MRP	Proteína Associada à Resistência a Múltiplos Fármacos 1
MW	Macroglobulinemia de Waldestrom
NCBM	Neoplasia de células linfoides B maduras
NK	<i>Natural Killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
PB	<i>Pacific Blue</i>
PBS	Solução salina
PE	Ficoeritrina
Pe-Cy7	Ficoeritrina cianina 7
PerCP	Complexo proteína piridina de clorofila
PerCP-Cy5.5	Complexo proteína piridina de clorofila cianina 5.5
PgP	Proteína de Resistência a Múltiplos Fármacos 1 - Glicoproteína-P
PO	<i>Pacific Orange</i>
sIg	Imunoglobulinas de superfície
SP	Sangue periférico
SSC	do inglês <i>Side Scatter</i> (granularidade celular)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TL	Tricoleucemia
TLv	Tricoleucemia variante
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3 REVISÃO DA LITERATURA	33
3.1 CLASSIFICAÇÃO DAS NEOPLASIAS DE CÉLULAS B MADURAS	33
3.2 CARACTERÍSTICAS DAS NEOPLASIAS DE CÉLULAS B MADURAS	36
3.2.1 <i>Leucemia linfóide crônica/linfoma linfocítico de pequenas células</i>	36
3.2.2 <i>Mieloma Múltiplo</i>	38
3.2.3 <i>Linfoma Folicular</i>	39
3.2.4 <i>Linfoma de Células do Manto</i>	39
3.2.5 <i>Tricoleucemia</i>	40
3.2.6 <i>Linfoma de Burkitt</i>	41
3.2.7 <i>Linfoma Difuso de Grandes Células B</i>	42
3.2.8 <i>Linfomas B da Zona Marginal</i>	43
3.2.9 <i>Linfoma Linfoplasmocítico e Macroglobulinemia de Waldenström</i>	44
3.3 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DAS NEOPLASIAS DE CÉLULAS B MADURAS	45
3.4 NOVOS MARCADORES IMUNOFENOTÍPICOS	49
4 METODOLOGIA	55
4.1 AMOSTRAS DOS PACIENTES	55
4.2 AMOSTRAS CONTROLE	56
4.3 IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO	56
4.3.1 <i>Técnica de marcação direta na membrana celular</i>	59
4.3.2 <i>Técnica de marcação direta intracelular</i>	59
4.3.4 <i>Aquisição das amostras e estratégia de análise dos dados</i>	60
4.3.5 <i>Controle de Qualidade</i>	66
4.3.6 <i>Análise Estatística</i>	67
4.4 ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS <i>IN VITRO</i>	68
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO CD80 E DO CD86	71
5.1.1 <i>Células de sangue periférico de indivíduos saudáveis</i>	71
5.1.2 <i>Células de medula óssea de indivíduos sem neoplasias hematológicas</i>	74
5.1.2 <i>Células de pacientes com neoplasias hematológicas</i>	75
5.3 CARACTERIZAÇÃO DO CD163	82
5.3.1 <i>Células de sangue periférico de indivíduos saudáveis</i>	82
5.3.2 <i>Células de medula óssea de indivíduos sem neoplasias hematológicas</i>	84
5.3.3 <i>Células de pacientes com neoplasias hematológicas</i>	86
5.4 CARACTERIZAÇÃO DO CD210A	88
5.4.1 <i>Células de sangue periférico de indivíduos saudáveis</i>	89

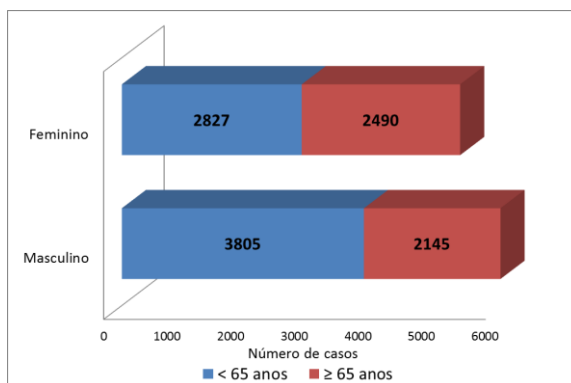
5.4.2 Células de medula óssea de indivíduos sem neoplasias hematológicas	90
5.4.3 Células de pacientes com neoplasias hematológicas	92
5.5 CARACTERIZAÇÃO DO CD261	95
5.5.1 Células de sangue periférico de indivíduos saudáveis	96
5.5.2 Células de medula óssea de indivíduos sem neoplasias hematológicas	97
5.5.3 Células de pacientes com neoplasias hematológicas	99
5.6 CARACTERIZAÇÃO DO CD262	103
5.6.1 Células de sangue periférico de indivíduos saudáveis	103
5.6.2 Células de medula óssea de indivíduos sem neoplasias hematológicas	105
5.6.3 Células de pacientes com neoplasias hematológicas	106
5.7 CARACTERIZAÇÃO DO CD264	111
5.7.1 Células de sangue periférico de indivíduos saudáveis	111
5.7.2 Células de medula óssea de indivíduos sem neoplasias hematológicas	113
5.7.3 Células de pacientes com neoplasias hematológicas	114
5.8 CARACTERIZAÇÃO DO CD358	116
5.8.1 Células de sangue periférico de indivíduos saudáveis	117
5.8.2 Células de medula óssea de indivíduos sem neoplasias hematológicas	118
5.8.3 Células de pacientes com neoplasias hematológicas	119
5.9 CARACTERIZAÇÃO DO CD361	122
5.9.1 Células de sangue periférico de indivíduos saudáveis	122
5.9.2 Células de medula óssea de indivíduos sem neoplasias hematológicas	124
5.9.3 Células de pacientes com neoplasias hematológicas	127
5.10 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA ABCC1/MRP1	131
5.10.1 Células de sangue periférico de indivíduos saudáveis	131
5.10.2 Células de medula óssea de indivíduos sem neoplasias hematológicas	133
5.10.3 Células de pacientes com neoplasias hematológicas	134
5.11 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA ABCB1/PGP	136
5.11.1 Células de sangue periférico de indivíduos saudáveis	137
5.11.2 Células de medula óssea de indivíduos sem neoplasias hematológicas	138
5.11.3 Células de pacientes com neoplasias hematológicas	139
5.12 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA SURVIVINA	142
5.12.1 Células de sangue periférico de indivíduos saudáveis	142
5.12.2 Células de pacientes com neoplasias hematológicas	144
6 CONCLUSÕES	149
7 PERSPECTIVAS	151

REFERÊNCIAS.....	153
APÊNDICE A - CONTROLE FMO PARA O CD86.....	169
APÊNDICE B - CONTROLE FMO PARA O CD163.....	170
APÊNDICE C - CONTROLE FMO PARA O CD210A.....	171
APÊNDICE D - CONTROLE FMO PARA O CD261.....	172
APÊNDICE E - CONTROLE FMO PARA O CD262.....	173
APÊNDICE F - CONTROLE FMO PARA O CD358.....	174
APÊNDICE G - CONTROLE FMO PARA O CD361.....	175
APÊNDICE H - CONTROLE FMO PARA A ABCC1/MRP.....	176
APÊNDICE I - CONTROLE FMO PARA A SURVIVINA.....	177

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que a incidência de linfoma não-Hodgkin (LNH) no mundo para o ano de 2020 seja de 463.096 casos novos, dos quais 262.029 serão em indivíduos do gênero masculino e 201.067 do gênero feminino; e um total de 241.260 mortes (140.191 em homens e 101.069 em mulheres). No Brasil, para o mesmo ano, estima-se 11.267 casos novos, desses 5.950 serão em homens e 5.317 em mulheres, com predomínio em indivíduos com idade inferior a 65 anos (Figura 1). Estima-se também que a taxa de mortalidade por essas doenças atinja 6.277 indivíduos, dos quais 3.379 do gênero masculino e 2.898 do gênero feminino (Figura 2) (FERLAY et al., 2015).

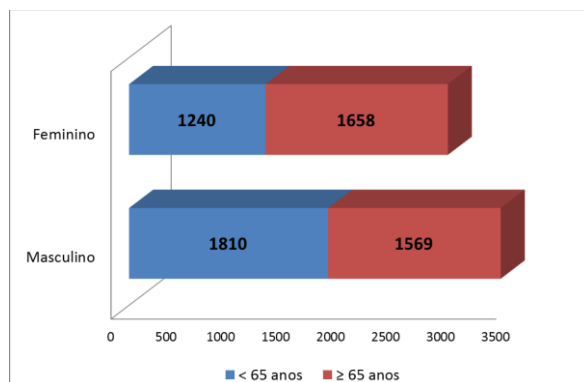
Figura 1 - Estimativas de casos novos de LNH, no Brasil, para o ano de 2020.



Fonte: FERLAY et al., 2015.

De acordo com as estimativas disponíveis no Instituto Nacional do Câncer (INCA) o número de casos novos de LNH estimado para o Brasil no biênio 2016/2017 é de 10.240, dos quais 5.210 em homens e 5.030 em mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, na região sul, o LNH em homens é o décimo primeiro mais frequente e em relação as mulheres é o nono. Na região Sul, o número de casos novos de LNH estimado para o gênero masculino é de 1.090 e para o feminino de 970 (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2016).

Figura 2 - Estimativas de mortalidade por LNH, no Brasil, para o ano de 2020.



Fonte: FERLAY et al., 2015.

Tanto os dados epidemiológicos brasileiros quanto os mundiais podem estar subavaliados devido à dificuldade de diagnóstico em muitos países, e, também, devido à presença de sintomas inespecíficos das neoplasias de células linfoides maduras, o que pode resultar no atraso do diagnóstico, e, conseqüente, aumento da mortalidade (FERLAY et al., 2010; ROMAN; SMITH, 2011). Nos países em desenvolvimento, como o Brasil, a cada ano surgem novos casos de câncer e essas doenças tem sido a segunda maior causa de morte na população. Esse aumento do número de casos relaciona-se, entre outros fatores, com o aumento da expectativa de vida e com o estilo de vida adotado atualmente, o que inclui aspectos relacionados ao tabagismo, atividade física e dieta (JEMAL et al., 2011).

Esses dados mostram que a incidência de casos de LNH está em crescimento e que cada vez mais há necessidade de investimentos em pesquisa na área da saúde que visam novos alvos de diagnóstico para esse tipo de neoplasia, visto que isso influencia na eficiência e rapidez do diagnóstico, o que viabiliza uma decisão de tratamento rápida, que resulta na redução das taxas de mortalidade.

Inicialmente, o diagnóstico das neoplasias de células linfoides B maduras (NCBM) era baseado na combinação das informações clínicas e na observação das alterações físicas do paciente com as informações acerca da morfologia celular e avaliação histológica do órgão afetado por meio de biópsia (REGO; SANTOS, 2009; DELFA, 2011). No

entanto, essas informações resultavam em conclusões limitadas, pouco sensíveis e, em muitas vezes, não específicas, tanto para detectar a presença da doença quanto para definir o subtipo da mesma (DELFA, 2011). Nesse sentido, nos últimos anos tem se investido cada vez mais em métodos como a imunofenotipagem (IMF) por citometria de fluxo (CF), pois essa metodologia é capaz de fornecer informações rápidas e relevantes, com alta sensibilidade e especificidade, acerca do diagnóstico do paciente, além de informar o estágio de maturação das células analisadas, identificar a presença de células com fenótipo anormal ou neoplásicas e também de indicar a presença de marcadores associados ao prognóstico ou até mesmo marcadores que possam ser utilizados futuramente com alvos terapêuticos (REGO; SANTOS, 2009; CHEN; LUU, 2017; RAJAB et al., 2017; SALES et al., 2017). No entanto, apesar dessa metodologia fornecer subsídios excelentes para o diagnóstico na maioria dos casos, existem algumas situações, nas quais a sobreposição das características fenotípicas celulares dificultam o diagnóstico, e o mesmo não pode ser concluído. Sendo assim, a investigação de novos marcadores imunofenotípicos se faz necessário para que o diagnóstico diferencial entre alguns subtipos de neoplasia de células linfoides B maduras possa ser realizado.

Nesse sentido, o consórcio internacional *Euroflow* publicou uma recomendação de um painel de marcadores para investigação de NCBM, no qual há uma combinação de anticorpos monoclonais (AcMo) que contribuem para responder a maioria das questões clínicas relacionadas ao diagnóstico das neoplasias hematológicas. No entanto, apesar desse painel apresentar uma grande quantidade de marcadores celulares direcionados para alguns diagnósticos diferenciais entre os subtipos de NCBM, ainda existem alguns casos que isso não está completamente esclarecido (VAN DONGEN; ORFAO, 2012a).

Dessa forma, vê-se a necessidade da busca por novos alvos imunofenotípicos aplicados no diagnóstico diferencial entre as NCBM, para que cada vez mais o diagnóstico dessas neoplasias seja realizado de forma mais rápida, exata e segura, e, também, para que o tratamento seja cada vez mais direcionado e específico para cada paciente, de acordo com os marcadores imunofenotípicos expressos pelas células neoplásicas.

Os AcMo utilizados no diagnóstico das neoplasias foram desenvolvidos contra epítomos das partículas presentes na superfície dos leucócitos denominadas *Clusters of Differentiation* (CD). A nomenclatura dos CD's foi proposta e estabelecida na primeira Conferência e Workshop Internacional dos Antígenos de Diferenciação

Leucocitários Humanos (*Human Leukocyte Differentiation Antigens - HLDA*) que ocorreu em Paris em 1982. Até o momento, foram identificados mais de 370 CD's e muitos são utilizados largamente na área da pesquisa básica, no diagnóstico de imunodeficiências e neoplasias, e no monitoramento e tratamento de algumas doenças (ZU; SHAHJAHAN; CHANG, 2009). Em 2010, foram submetidos na nona edição do *Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens* 67 novos anticorpos monoclonais (Quadro 1). Estudos demonstraram os padrões normais de expressão desses marcadores em amostras de sangue periférico (SP), medula óssea (MO) e órgãos linfoides secundários (linfonodos e amígdalas). No entanto, como algumas células neoplásicas podem apresentar alterações na expressão fenotípica de alguns antígenos, esses marcadores foram apontados como possíveis novos alvos para pesquisa e, principalmente, como novas ferramentas para o diagnóstico diferencial entre as neoplasias de células B maduras (LLINÀS et al., 2011; MATESANZ-ISABEL et al., 2011).

Quadro 1 - Alguns dos anticorpos monoclonais submetidos ao nono Workshop HLDA.

JAML	CD63	CD152	CD255	CD274	CD319	CD358
CXCR7	CD80	CD170	CD257	CD275	CD328	CD360
CLEC4A	CD83	CD184	CD258	CD283	CD329	CD361
DcR3	CD84	CD185	CD261	CD289	CD338	CD362
CLEC7A	CD86	CD196	CD262	CD305	CD351	CD363
Galectin-3	CD124	CD200	CD264	CD307a	CD352	
GITRL	CD126	CD210a	CD267	CD307b	CD353	
IL-23R	CD130	CD212	CD268	CD307c	CD354	
TNFRSF3	CD148	CD215	CD270	CD307d	CD355	
CD48	CD150	CD229	CD272	CD314	CD357	

Dos anticorpos monoclonais submetidos na nona edição do *Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens*, em 2010, foram escolhidos oito (CD80, CD86, CD210a, CD261, CD262, CD264, CD358 e CD361) para a realização deste trabalho. A escolha baseou-se nas informações presentes em artigos científicos e nas bulas dos fabricantes no que diz respeito a positividade dos marcadores para células hematopoiéticas. Dessa forma, foram escolhidos marcadores que apresentaram positividade para células linfoides B não neoplásicas.

Em células neoplásicas é comum a presença de marcadores de outras linhagens celulares (infidelidade de linhagem), como, por

exemplo, a expressão de marcadores de linfócitos T em células B de Leucemia linfoblástica aguda B (LLA) (HUSSEIN et al, 2011) ou de linfomas (HUSSAINI et al., 2016). Nesse sentido, o CD163 foi incluído na pesquisa, por estar disponível no Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH), na tentativa de se observar células linfoides B com infidelidade de linhagem caso apresentassem positividade para esse marcador.

Além da procura por novos marcadores de diagnóstico, é necessária a obtenção de novos alvos capazes de fornecer informações acerca do prognóstico desses pacientes. Nesse sentido, incluiu-se na pesquisa a avaliação de proteínas como a survivina e as proteínas relacionadas à resistência a múltiplos fármacos (ABCB1/PgP e ABCC1/MRP1). A expressão dessas proteínas foi investigada por citometria de fluxo para que se estabeleça o perfil de expressão em linfomas, para que posteriormente esses dados sejam associados a outros clínicos e laboratoriais e para que o valor prognóstico possa ser investigado e estabelecido.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar novos alvos imunofenotípicos com possível aplicabilidade como marcadores para o diagnóstico diferencial entre as neoplasias de células linfoides B e com possível aplicabilidade para o prognóstico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os padrões de expressão normal dos novos marcadores (CD80, CD86, CD163, CD210a, CD261, CD262, CD264, CD358 e CD361) em células de amostras de sangue periférico e de medula óssea de indivíduos considerados saudáveis por meio da comparação da intensidade de fluorescência média das células marcadas e das células não marcadas (controle negativo);
- Determinar os padrões de expressão dos novos marcadores (CD80, CD86, CD163, CD210a, CD261, CD262, CD264, CD358 e CD361) em células de pacientes com diagnóstico de NCBM por meio da comparação das células marcadas e das células não marcadas (controle negativo);
- Comparar a intensidade de fluorescência média dos novos marcadores (CD80, CD86, CD163, CD210a, CD261, CD262, CD264, CD358 e CD361) entre as células de pacientes com NCBM (células maduras) e com leucemias linfoblásticas agudas de células B (células imaturas);
- Avaliar o perfil de expressão da proteína survivina e das proteínas de resistência a múltiplos fármacos (ABCB1/PgP e ABCC1/MRP1) por citometria de fluxo nas células de indivíduos considerados saudáveis e nas células de pacientes com diagnóstico de NCBM.
- Identificar os marcadores celulares mais eficientes na distinção entre células normais e neoplásicas;
- Identificar os marcadores celulares mais úteis na classificação e diagnóstico diferencial das neoplasias de células linfoides B maduras;

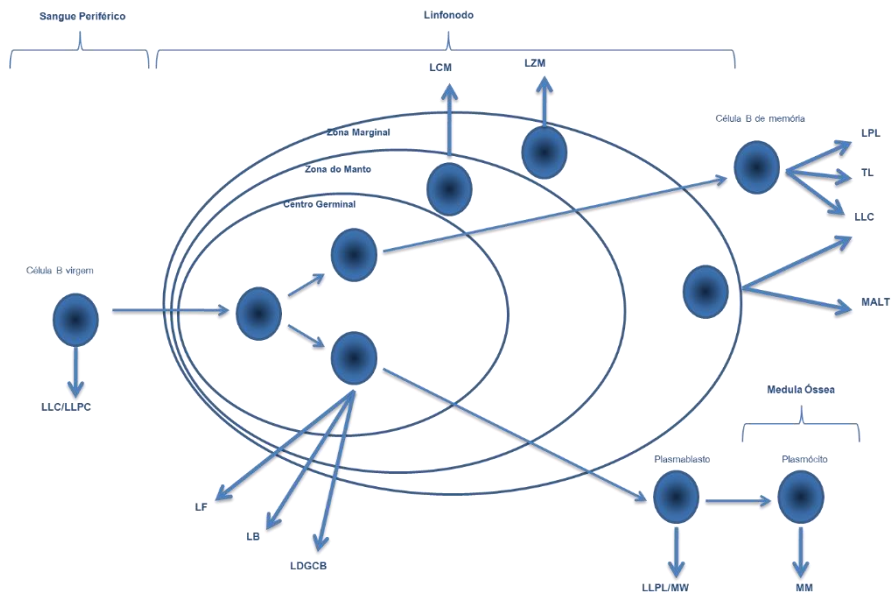
3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CLASSIFICAÇÃO DAS NEOPLASIAS DE CÉLULAS B MADURAS

As neoplasias de células linfoides maduras (linfomas) compreendem um grupo heterogêneo de neoplasias, das quais aproximadamente 90% são de células B e o restante derivam das células T ou de células *Natural Killer* (NK). Esse grupo de doenças normalmente se desenvolve nos linfonodos, no entanto, podem ocorrer em quase todos os tecidos (sítios extranodais). Ao longo do tempo, foram propostos diversos sistemas de classificação para as neoplasias de células linfoides maduras, os quais agruparam essas doenças de acordo com as características histológicas e fenotípicas (SWERDLOW et al., 2017; SHANKLAND; ARMITAGE; HANCOCK, 2012). Em 1832, o médico inglês Thomas Hodgkin foi o primeiro a relatar uma série de casos de pacientes portadores de uma doença que, posteriormente, foi reconhecida como Linfoma de Hodgkin (LH) (HODGKIN, 1832; STEIN, 2008; SWERDLOW et al., 2008; KÜPPERS et al., 2012). A partir desse momento, os outros subtipos de linfomas que não apresentavam as mesmas características histológicas do LH foram agrupados na categoria linfomas não Hodgkin (LNH) (HOFFBRAND et al., 2004). No entanto, atualmente, essa nomenclatura está em desuso (SWERDLOW et al., 2017).

Alguns estudos fenotípicos demonstraram que as células B normais apresentam características fenotípicas semelhantes às células B presentes nos linfomas (PEREZ-ANDRES et al., 2010; DELFA, 2011). Como a maioria dos linfomas mimetizam os estágios normais de maturação das células B, um dos critérios de classificação se baseia na expressão fenotípica, no estágio de diferenciação e na localização no linfonodo das células B neoplásicas (Figura 3) (SWERDLOW et al., 2008; DELFA, 2011).

Figura 3 - Origem das neoplasias de células linfoides B maduras.



Fonte: Adaptado de DELFA, 2011.

Nota: LLC/LLPC: Leucemia linfóide crônica/linfoma linfocítico de pequenas células; LF: linfoma folicular; LB: linfoma de Burkitt; LDGCB: linfoma difuso de grandes células B; LCM: linfoma de células do manto; LZM: linfoma da zona marginal; LPL: leucemia prolinfocítica; TL: tricoleucemia; MALT: Linfoma da zona marginal extranodal do tecido linfóide associado à mucosa; LLPL/MW: Linfoma linfoplasmocítico/ Macroglobulinemia de Waldenström; MM: mieloma múltiplo.

Atualmente, o sistema de classificação aceito mundialmente foi o proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2001, (com atualização em 2008 e 2017) o qual divide as NCBM em 39 subtipos com aspectos clínicos, morfológicos, moleculares e imunofenotípicos distintos (Quadro 2) (SWERDLOW et al., 2008; SWERDLOW et al., 2017). Apesar da OMS agrupar essas neoplasias na categoria “NCBM”, os dados epidemiológicos do INCA e do Globocan ainda dividem essas neoplasias em duas categorias: linfomas não Hodgkin e mieloma múltiplo.

Quadro 2 - Classificação das neoplasias de células B maduras segundo a OMS 2017 (Continua).

Leucemia linfóide crônica/linfoma linfocítico de pequenas células (LLC/LLPC)
Linfocitose B monoclonal, tipo LLC
Linfocitose B monoclonal, tipo não-LLC
Leucemia prolinfocítica B (LPL)
Linfoma da zona marginal esplênica (LZME)
Tricoleucemia (TL)
Linfoma/leucemia esplênico de células B, inclassificável Linfoma esplênico difuso da polpa vermelha, de linfócitos B pequenos Tricoleucemia variante (TLv)
Linfoma linfoplasmocítico (LLPL) Macroglobulinemia de Waldeström (MW)
Gamopatia monoclonal de significado indeterminado IgM
Doenças da cadeia pesada Doença da cadeia pesada alfa Doença da cadeia pesada gama Doença da cadeia pesada mu
Neoplasias de células plasmocitárias Gamopatia monoclonal de significado indeterminado não IgM Mieloma de células plasmáticas (MM) Plasmocitoma solitário do osso Plasmocitoma extra ósseo Doença de depósitos de imunoglobulinas monoclonais Amiloidose primária Doenças de depósitos de cadeias leves e pesadas
Linfoma da zona marginal extranodal do tecido linfóide associado à mucosa (MALT)
Linfoma da zona marginal nodal (LZMN) Linfoma da zona marginal nodal pediátrico
Linfoma folicular (LF) Neoplasia folicular <i>in situ</i> Linfoma folicular tipo duodenal Linfoma folicular testicular Linfoma folicular pediátrico
Linfoma de grandes células com rearranjo IRF4
Linfoma centro folicular primário da pele
Linfoma de células do manto (LCM) Neoplasia de células do manto <i>in situ</i>

Quadro 2 - Classificação das neoplasias de células B maduras segundo a OMS 2017 (Conclusão).

Linfoma difuso de grandes células B, não especificado anteriormente (LDGCB) Tipo células B do centro germinal Tipo células B ativadas
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 não especificado
Linfoma B EBV-positivo tipo ulcera mucocutânea
Linfoma difuso de grandes células B associado com inflamação crônica Linfoma difuso de grandes células B associado a fibrina
Granulomatose linfomatoide grau 1 e 2
Granulomatose linfomatoide grau 3
Linfoma de grandes células B do mediastino (tímico)
Linfoma de grandes células B intravascular
Linfoma de grandes células B ALK-positivo
Linfoma plasmablastico
Linfoma primário de efusões
Linfoma de grandes células B com origem na Doença de Castleman multicêntrica associada ao HHV-8
Desordem linfoproliferativa germinotrófica HHV8-positiva
Linfoma de Burkitt (LB)
Linfoma Burkitt-like com aberração 11q
Linfoma B de alto grau Linfoma B de alto grau com rearranjo MYC e BCL2 e/ou BCL6 Linfoma B de alto grau não especificado
Linfoma de células B inclassificável, com características intermediárias entre o LDGCB e o Linfoma de Hodgkin

Fonte: Adaptado de ZERBINI et al., 2011; SWERDLOW et al., 2017.

3.2 CARACTERÍSTICAS DAS NEOPLASIAS DE CÉLULAS B MADURAS

Nesta revisão foram abordados os principais subtipos de neoplasias de células B maduras encontradas no estudo.

3.2.1 Leucemia linfóide crônica/linfoma linfocítico de pequenas células

A leucemia linfóide crônica (LLC) é uma neoplasia caracterizada pela proliferação clonal e acúmulo de células linfóides B maduras no SP, MO, linfonodos e baço. A mediana de idade ao

diagnóstico é entre 67 e 72 anos com discreto predomínio em indivíduos do gênero masculino (1,7:1). Devido a crescente avaliação laboratorial hematológica na população geral, tem se observado um aumento no diagnóstico em indivíduos jovens assintomáticos em estágios precoces da LLC (HALLEK, 2015). Como a LLC geralmente não apresenta sintomas, o diagnóstico normalmente é estabelecido em exames de rotina. Em geral, as células patológicas são identificadas primeiramente no hemograma seguidas da avaliação por IMF por CF (NABHAN; ROSEN, 2014; HALLEK, 2015). Para concluir o diagnóstico deve ser observado no SP a presença de, no mínimo, 5.000 células patológicas/ μ L durante pelo menos 3 meses uma vez que indivíduos que apresentem células B clonais com contagem inferior a 5.000 células/ μ L sem linfadenopatias, organomegalias ou outra manifestação extramedular são considerados portadores de linfocitose B monoclonal (SWERDLOW et al., 2017). Para definição do diagnóstico, a clonalidade das células neoplásicas (avaliação das cadeias leves de imunoglobulinas (Ig)- Kappa e Lambda) precisa ser confirmada por IMF por CF (NABHAN; ROSEN, 2014; HALLEK, 2015). A análise morfológica e imunofenotípica de biópsias ou aspirados de MO e linfonodos não são sempre realizadas (NABHAN; ROSEN, 2014). No SP são visualizadas células pequenas, com aspecto maduro, cromatina nuclear condensada, nucléolos inconspícuos e citoplasma escasso sem grânulos azurófilos, os quais são indistinguíveis dos linfócitos normais. Na LLC típica podem ser observados prolinfócitos (células maiores com nucléolos e citoplasma mais abundante) em quantidade inferior a 10%. Na LLC atípica, os prolinfócitos podem totalizar entre 10 a 55% do total de células, acima de 55% considera-se o diagnóstico de leucemia prolinfocítica (LPL). Tanto na forma típica quanto na atípica é comum a presença de restos celulares (manchas de *Gumprecht*) (LORAND-METZE, 2005; HALLEK, 2015). Fenotipicamente as células da LLC são identificadas pela co-expressão do marcador CD5 com os antígenos de superfície de células B, CD19, CD20 e CD23 (NABHAN; ROSEN, 2014; HALLEK, 2015). A intensidade de expressão da imunoglobulina IgM (ou IgD) e do CD20 são mais fracas quando comparadas as células B normais e a outros tipos de neoplasias de células B maduras (HALLEK, 2015). As células também podem expressar CD22, CD43 e CD11c (fraca expressão). O CD10 geralmente é negativo, o CD79b e o FMC7 usualmente são negativos, ou quando positivos, apresentam uma fraca intensidade de expressão. Os casos de LLC atípica podem apresentar CD5 ou CD23 negativos, FMC7 ou CD11c positivos ou ainda CD79b ou IgM com forte expressão (SWERDLOW et al., 2017).

Na década de 1990, utilizava-se o escore da Matutes para a confirmação fenotípica dos casos de LLC. Esse escore utilizava a positividade dos marcadores CD5, CD23, FMC7 e a negatividade ou fraca expressão dos marcadores CD79b e da IgM para classificar os casos de LLC. Considerava-se LLC típica quando a pontuação era superior ou igual a quatro e LLC atípica ou outra neoplasia de células B maduras quando as células eram CD23 negativas ou com escore inferior a quatro (MOREAU et al., 1997). Atualmente, esse escore pode ser utilizado, mas existem novos marcadores capazes de auxiliar no diagnóstico diferencial das neoplasias de células B maduras, como o CD200, que é expresso nas células dos pacientes com LLC e não é expresso em outras neoplasias, como o LCM (SANDES et al., 2015).

O linfoma linfocítico de pequenas células (LLPC) apresenta morfologia e imunofenótipo idênticos aos encontrados na LLC, no entanto, é definido pela presença de células B neoplásicas no SP em quantidade inferior a 5.000 células/ μ L, além disso, requer envolvimento nodal, esplênico ou extramedular (SWERDLOW et al., 2017). O diagnóstico deve ser confirmado pela avaliação histopatológica de biópsia de linfonodo, sempre que possível (HALLEK, 2015).

3.2.2 Mieloma Múltiplo

O mieloma múltiplo (MM) é uma NCBM caracterizada pela proliferação de mais de 10% de plasmócitos clonais na MO tipicamente acompanhado pela secreção monoclonal de imunoglobulinas (proteína M) detectadas no soro ou na urina e lesões ósseas. A média de idade ao diagnóstico é de 69 anos com predomínio do gênero masculino (PAIVA et al., 2010; RÖLLIG; KNOP; BORNHÄUSER, 2015; CHAUFFAILLE, 2016).

A identificação dos plasmócitos baseia-se na forte expressão de CD38 e CD138 juntamente com as características de dispersão de luz (FSC e SSC). No entanto, a intensidade de expressão do CD38 pode estar discretamente reduzida quando comparada a plasmócitos não neoplásicos. A análise da ausência expressão do CD45 e do CD19 permite um refinamento no processo de identificação das células plasmocitárias neoplásicas. A natureza clonal dessas células ainda pode ser confirmada pela restrição citoplasmática das cadeias leves de imunoglobulinas. Além desses marcadores, ainda podem ser avaliadas as expressões de outros antígenos nos plasmócitos neoplásicos como expressão fraca ou ausente de CD27 e presença ou superexpressão de

CD28, CD33, CD56 e CD117 (SHAJI-KUMAR; KIMLINGER; MORICE, 2010; JEONG et al, 2012; CHAUFFAILLE, 2016).

3.2.3 *Linfoma Folicular*

O linfoma folicular (LF) é uma neoplasia composta por células B do centro germinal tipicamente centrócitos e centroblastos. Os centrócitos são células de pequeno a médio tamanho, com contorno nuclear irregular ou clivado e citoplasma escasso, nucléolo inconspícuo, cromatina condensada e os centroblastos são células grandes (cerca de 3 vezes o tamanho de um linfócito), com cromatina reticular fina, diversos nucléolos (1-3) e quantidades moderadas de citoplasma (SWERDLOW et al., 2017). O LF pode ser dividido em graus (1, 2, 3A e 3B) de acordo com a quantidade de centroblastos por campo pois a agressividade da doença aumenta com o aumento do número de centroblastos (SWERDLOW et al., 2017; FREEDMAN, 2014).

Essa neoplasia representa cerca de 20% de todos os linfomas (NOGAI; DÖRKEN; LENZ, 2011; SWERDLOW et al., 2017), afeta predominantemente indivíduos idosos (mediana 60 anos) (FREEDMAN, 2014) e apresenta um discreto predomínio no gênero feminino (1,7:1) (SWERDLOW et al., 2017). Fenotipicamente as células expressam sIg positivo (IgM, IgG ou raramente IgA), monoclonalidade para cadeias leves de imunoglobulinas (Kappa ou Lambda), CD19, CD20, CD22, CD79a, BCL2, BCL6, CD10, FMC7, CD79b e CD38 e geralmente não expressam CD5, CD43, CD11c, CD23, CD103, CD200 e ciclina D1 (SWERDLOW et al., 2008; FREEDMAN, 2014). Em cerca de 85% dos casos de LF é possível observar a t(14;18)(q32;q21) que resulta na superexpressão da proteína BCL-2 (NOGAI; DÖRKEN; LENZ, 2011; FREEDMAN, 2014).

3.2.4 *Linfoma de Células do Manto*

O linfoma de células do manto (LCM) compreende de 3 a 10% dos casos de NCBM (NOGAI; DÖRKEN; LENZ, 2011; ANSELL, 2015; SWERDLOW et al., 2017), afeta indivíduos de meia idade até os mais idosos, com mediana de idade de 60 anos, e é predominante no gênero masculino (2,4:1) (MATUTES et al., 2004; VOSE, 2015; SWERDLOW et al., 2017).

O diagnóstico é realizado em amostras de biópsia de linfonodo, tecido, MO ou SP nas quais são observadas células com morfologia típica, com tamanho de pequeno a médio, núcleo com contorno

irregular, cromatina dispersa e nucléolo inconspícuo (SWERDLOW et al., 2008; VOSE, 2015; SWERDLOW et al., 2017). A IMF é frequentemente utilizada para a identificação dessas células, as quais expressam CD19, IgM/IgD com forte intensidade, FMC-7, CD43, CD5, CD20, CD22, CD79a, Bcl2 e ciclina D1. Essas células não expressam CD10, Bcl6, TdT, CD11c (VOSE, 2015; SWERDLOW et al., 2017). A expressão de CD23 pode variar de negativo a positivo com fraca intensidade (HALLEK, 2015). A monoclonalidade pode ser evidenciada para expressão das cadeias leves de imunoglobulina, com um predomínio de restrição de cadeias Lambda. Existem variantes morfológicas do LCM, e esses casos podem apresentar fenótipos atípicos, como a ausência de expressão de CD5 ou ainda a expressão de CD10 e Bcl6 (SWERDLOW et al., 2008). Em um estudo realizado por Matutes e colaboradores (2004) foi demonstrada a possibilidade dessas variantes. Nesse trabalho, do total de pacientes diagnosticados como portadores de LCM, 68% apresentaram fenótipo típico (CD5 positivo CD23-) enquanto que 17% e 15% apresentaram fenótipos atípicos, com CD10 negativo CD23- e CD5 positivo CD23 positivo, respectivamente (MATUTES et al., 2004). A presença da t(11;14) (q13;q32) define o LCM, pois é observada na grande maioria dos casos. Essa translocação leva a expressão aberrante da ciclina D1, a qual não é expressa tipicamente em linfócitos normais (SWERDLOW et al., 2008; VOSE, 2015).

O LCM apresenta uma variante blástica, que é fenotipicamente semelhante a forma clássica do LCM (positividade para CD19, CD20, CD22 e CD24 e co-expressão de CD5 e CD43). Entretanto, as células neoplásicas dessa variante blástica geralmente apresentam tamanho maior, o qual é evidenciado pelas características de dispersão da luz na imunofenotipagem por citometria de fluxo (alto FSC e alto SSC), além da positividade para o marcador CD10 (DELFA, 2011).

3.2.5 Tricoleucemia

A tricoleucemia clássica é uma neoplasia indolente e rara que compreende cerca de 2% das leucemias linfoides (WOTHERSPOON; ATTYGALLE; MENDES, 2015; SWERDLOW et al., 2017). A mediana de idade dos pacientes acometidos é de 55 anos, com predomínio do gênero masculino (4:1) (QUEST; JOHNSTON, 2015; TADMOR; POLLIACK, 2015; SWERDLOW et al., 2017).

As células neoplásicas são encontradas predominantemente na MO e no baço. Tipicamente podem ser evidenciadas em menor número

no SP e podem infiltrar o fígado, os linfonodos e a pele (WOTHERSPOON; ATTYGALLE; MENDES, 2015; SWERDLOW et al., 2008). Frequentemente se observa pancitopenia e variado grau de esplenomegalia (QUEST; JOHNSTON, 2015). Morfologicamente trata-se de células linfoides B maduras de médio tamanho com núcleo oval ou indentado (forma de feijão), cromatina reticulada, nucléolo ausente ou inconspícuo e citoplasma abundante e azul pálido com projeções, que envolve o SP e infiltra difusamente a MO e a polpa vermelha esplênica (SWERDLOW et al., 2017).

A presença da mutação *BRAFV600E* é observada em 100% dos casos de tricoleucemia, e está relacionada com a ativação constitutiva das proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (SWERDLOW et al., 2017).

O imunofenótipo da tricoleucemia clássica consiste em monoclonalidade da cadeia leve de imunoglobulina, co-expressão de CD20, CD22, CD79a e CD11c de forte intensidade e expressão de CD103, CD25, CD123, Anexina A1 (marcador mais específico), DBA.44 (CD72), FMC7, CD200, CD305 (LAIR-1) e ciclina D1 (fraca expressão). Ausência de CD10 e CD5, na grande maioria dos casos, e negatividade para o CD27 (SWERDLOW et al., 2008; QUEST; JOHNSTON, 2015).

A tricoleucemia variante não é mais considerada uma desordem biologicamente relacionada a tricoleucemia clássica pois possui características distintas como a presença de leucocitose, monocitose, células com nucléolo proeminente, resistência ao tratamento convencional e imunofenótipo variante (ausência de expressão de CD25, CD123 e anexina A1, por exemplo). Essa neoplasia afeta indivíduos com mediana de idade de 70 anos, também apresenta predomínio do gênero masculino e compreende cerca de 10% dos casos de tricoleucemia clássica e 0,4% de todas as neoplasias linfoides que evoluem com linfocitose (QUEST; JOHNSTON, 2015; MATUTES; MARTÍNEZ-TRILLOS; CAMPO, 2015; SWERDLOW et al., 2017).

3.2.6 Linfoma de Burkitt

O linfoma de Burkitt (LB) pode apresentar-se como leucemia aguda (envolvimento da MO e do SP) ou em sítios extranodais, cuja localização difere de acordo com as variantes clínicas. As variantes clínicas apresentam diferenças na sintomatologia e na morfologia e são divididas em: forma endêmica, forma esporádica e forma associada a imunodeficiência (geralmente em indivíduos soropositivos para HIV)

(JAFEE; PITTALUGA, 2011; SWERDLOW et al., 2017). A forma endêmica ocorre predominantemente na África, sendo a neoplasia mais comum na infância (pico de incidência de 4 a 7 anos), com predomínio masculino e acometimento principal da maxila e demais ossos da face. Já a forma esporádica, tem distribuição mundial, mas apresenta baixa incidência (1 a 2%), afeta tanto crianças quanto adultos, com predomínio de adultos jovens (30 anos) do gênero masculino, com acometimento principal em sítios abdominais sendo o íleo-cecal mais frequente (FREITAS; BARROS; QUINDERE, 2008; SWERDLOW et al., 2017). Morfologicamente as células são de tamanho médio, com núcleos redondos e cromatina finamente agregada e presença de 2 a 5 nucléolos, citoplasma profundamente basofílico e geralmente com vacúolos lipídicos (SWERDLOW et al., 2008; JAFEE; PITTALUGA, 2011). Fenotipicamente, as células expressam IgM, CD19, CD20, CD22, CD10, CD77, Bcl6, CD38 e CD43 e não expressam Bcl2, TdT, CD5 e CD23 (SWERDLOW et al., 2017).

3.2.7 Linfoma Difuso de Grandes Células B

O linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) compreende um grupo heterogêneo de linfomas agressivos nos quais geralmente é observada a presença de células com grande tamanho. Essas neoplasias correspondem a aproximadamente de 30% a 40% dos linfomas em adultos, afetam indivíduos idosos (mediana 70 anos) mas também pode ocorrer em crianças e adultos jovens (NOGAI; DÖRKEN; LENZ, 2011; DELFA, 2011; SWERDLOW et al., 2017). O LDGCB pode ser subdividido em variantes morfológicas (centroblástico, immunoblástico, anaplásico e variantes morfológicas raras) e moleculares (tipo células do centro germinal e tipo células B ativadas) (SWERDLOW et al., 2017).

As células podem expressar os marcadores pan-B CD19, CD20, CD22, CD79a e imunoglobulinas de superfície ou citoplasmáticas (IgM>IgG>IgA) em 50-75% dos casos. O CD30 pode ser expresso em 10 a 20% dos casos, especialmente na variante anaplásica. O CD5 pode estar presente em 5 a 10% dos casos, o CD10 é expresso em 30 a 50% dos casos, BCL-6 em 60 a 90% dos casos, MUM-1 em 35% a 65% dos casos, o BCL-2 em 47 a 84% dos casos. Tem sido adotada uma subdivisão imunofenotípica considerando-se os marcadores CD10, BCL-6 e MUM-1. Casos com expressão de CD10 em mais de 30% das células patológicas são classificados como LDGCB tipo células B do centro germinal bem como casos CD10 e MUM-1 negativos com BCL-

6 positivo. No entanto, essa subdivisão imunofenotípica não se correlaciona bem com a expressão gênica (SWERDLOW et al., 2008).

3.2.8 Linfomas B da Zona Marginal

De acordo com a classificação da OMS (2017), existem três entidades distintas de linfomas da zona marginal (LZM): o linfoma B da zona marginal esplênica (LZME), o linfoma da zona marginal extranodal do tecido linfoide associado a mucosa (Linfoma MALT) e o linfoma da zona marginal nodal (LZMN) (ANGELOPOULOU et al., 2014; SWERDLOW et al., 2017).

Os LZM são raros, visto que o LZMN e o LZME compreendem menos de 2% das neoplasias de células B maduras e o linfoma MALT aproximadamente 7 a 8%. A mediana de idade ao diagnóstico predomina aos 60 anos (ANGELOPOULOU et al., 2014; SWERDLOW et al., 2017).

A distinção entre os tipos LZMN e LZME pode ser difícil e geralmente necessita de integração entre os dados clínicos e laboratoriais. Fenotipicamente, comparados a outros linfomas, as células dos LZM não expressam nenhum marcador específico, por isso o diagnóstico é realizado por exclusão. As células do LZME expressam os antígenos pan-B (CD19, CD20, CD22 e CD79a), IgM positivo e IgD (usualmente) e tipicamente não expressam CD5, CD10, CD43, CD103, CD25, Bcl6, anexina A1 e ciclina D1 (REID; FRIEDBERG, 2013; SWERDLOW et al., 2017). As células do LZMN apresentam fenótipo semelhante as células do LZME, com exceção da expressão positiva para o CD43, presença de Bcl2 e expressão de IgD na minoria dos casos (SWERDLOW et al., 2017). Aproximadamente 75% dos casos apresentam expressão de IgM e a co-expressão de IgM e IgD é observada em 30% dos casos, enquanto que a expressão de IgG é rara. Geralmente não expressam CD5 e CD23, no entanto, foi observado a presença desses marcadores em 17% e 8%, respectivamente. A expressão do CD11c é negativa, assim como a do DBA-44, porém pode ser observado em 20% dos casos (ANGELOPOULOU et al., 2014). As células do linfoma MALT são positivas para os marcadores pan-B (CD19, CD20 e CD79a) e frequentemente expressam IgM, mas podem apresentar com menor frequência a expressão de IgA e IgG. Também apresentam expressão do CD43, CD11c, CD21 e CD35. Não expressam CD5, CD10 e CD23 (SWERDLOW et al., 2017).

3.2.9 Linfoma Linfoplasmocítico e Macroglobulinemia de Waldenström

O linfoma linfoplasmocítico (LLPL) afeta indivíduos adultos (mediana 63-68 anos) e possui um discreto predomínio do gênero masculino (MERCHIONNE; PROCACCIO; DAMMACCO, 2011; SWERDLOW et al., 2017). É uma neoplasia de células linfoides B pequenas, linfócitos plasmocitoides (com citoplasma basofílico abundante) e plasmócitos que geralmente envolve a MO e algumas vezes (15% a 20% dos casos) linfonodos, baço, fígado e as vezes o SP, e que não preenche os critérios para nenhuma outra NCBM que pode apresentar diferenciação plasmocitária. Embora frequentemente associada a paraproteinemia do tipo IgM, esse critério não é essencial para o diagnóstico (BERGER et al., 2005; LIN et al., 2011; SWERDLOW et al., 2017).

A macroglobulinemia de Waldenström (MW) representa menos de 5% de todas as neoplasias de células B maduras e aproximadamente 1% a 2% das neoplasias hematológicas com predomínio em caucasianos (VITOLO; FERRERI; MONTOTO, 2008; KAPOOR et al., 2015). É encontrada em significativa quantidade de pacientes com LLPL, e, é definida como um LLPL com envolvimento da MO e uma gamopatia monoclonal do tipo IgM de qualquer concentração (LIN et al., 2011; SWERDLOW et al., 2017).

De acordo com a revisão realizada por Swerdlow e colaboradores (2016), 90% dos casos de LLPL/MW apresentam a mutação MYD88 L265P (SWERDLOW et al., 2016).

O envolvimento da MO é caracterizado por um padrão de infiltração nodular, difuso e/ou intersticial usualmente composto predominantemente por linfócitos pequenos misturados com um número variável de plasmócitos e linfócitos plasmocitoides. Essas células também podem ser observadas no SP, mas a leucometria não é tão alta, como aquela observada nos casos de LLC (SWERDLOW et al., 2017).

Fenotipicamente, a maioria das células linfoides B expressa imunoglobulina de superfície e as células plasmocitárias imunoglobulinas citoplasmáticas. A monoclonalidade é evidenciada pelas cadeias leves de imunoglobulina com predomínio do tipo Kappa. A maioria dos casos são do tipo IgM, algumas vezes do tipo IgG, raramente do tipo IgA e tipicamente IgD negativas. Nas células B há a expressão de CD19, CD20, CD22, CD79a, CD52, CD79b, CD11c, CD25, CD38, FMC-7, BCL-2 e ausência de CD10 e CD103. O CD5 e o CD23 são expressos em uma minoria de casos (com fraca intensidade) e a co-expressão desses dois marcadores é rara. Os plasmócitos expressam

CD38 e CD138 e a mesma cadeia leve de imunoglobulina monoclonal dos linfócitos patológicos. No entanto, a expressão positiva de CD19 e de CD45 ajuda no diagnóstico diferencial com o MM, pois nesse caso os plasmócitos podem perder a expressão desses marcadores (BERGER et al., 2005; MERCHIONNE; PROCACCIO; DAMMACCO, 2011; KAPOOR et al., 2015; SWERDLOW et al., 2017).

3.3 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DAS NEOPLASIAS DE CÉLULAS B MADURAS

As informações obtidas referentes às análises celulares pela IMF por CF provê dados relevantes no que diz respeito ao diagnóstico, classificação e monitoramento das neoplasias hematológicas, e, em conjunto com a morfologia e a análise molecular e genética são cruciais para a identificação e caracterização das neoplasias de células B maduras (VAN DONGEN et al., 2012a).

O diagnóstico laboratorial pela IMF tem início com marcadores de triagem baseado num número limitado de anticorpos monoclonais (tubo único) direcionados a identificação de todas as subpopulações celulares relevantes na amostra (VAN DONGEN et al., 2012a). O grupo *Euroflow* sugere que os marcadores utilizados na triagem das neoplasias linfoides maduras sejam: CD3, CD4, CD5, CD8, CD19, CD20, CD38, CD45, CD56, sIgLambda, sIgKappa e TCR $\gamma\delta$. Essa combinação permite distinguir as principais subpopulações celulares e definir as células fenotipicamente aberrantes e clonais. Resumidamente, o CD45, em combinação com o CD19 e o CD20, permite distinguir linfócitos B maduros (CD19 positivo, CD20 positivo positivo e CD45 positivo positivo) dos imaturos (CD19 positivo, CD20-/ positivo fraco, CD45 positivo fraco). Já a clonalidade desses linfócitos é avaliada pela expressão das imunoglobulinas de cadeia leve Kappa e Lambda. Os linfócitos T são identificados pela positividade para o CD3 e suas subpopulações, T auxiliar CD4 positivo, T citotóxico CD8 positivo e TCR $\gamma\delta$ positivo. As células NK são reconhecidas pela ausência de CD3 e CD19 e pela positividade para o CD56. O CD38 é útil na identificação de células B precursoras e das células plasmocitárias e proporciona informações relevantes referentes a desordens de células plasmocitárias, como o mieloma múltiplo e outras neoplasias com presença de diferenciação plasmocitária. O CD5 tem valor na avaliação das células T e NK e também na identificação das células B patológicas, como nos casos de LLC e LCM (FLORES-MONTERO et al., 2012).

Após a identificação das células patológicas na triagem, é necessário a utilização de um painel com diversos anticorpos monoclonais para a classificação fenotípica das células neoplásicas. Para a identificação dessas células utiliza-se marcadores comuns em todos os tubos denominados “backbones”. A combinação de cada um dos marcadores no painel tem função de responder uma ou mais questões clínicas relevantes em relação a identificação, enumeração e caracterização das populações celulares da amostra (BÖTTCHER et al., 2012; VAN DONGEN et al., 2012A). O painel de anticorpos proposto pelo grupo Euroflow (Quadro 3) apresenta como marcadores “backbones” o CD19, o CD20 e o CD45. Os marcadores presentes no primeiro tubo, em combinação com os marcadores do tubo de triagem, permitem a identificação dos casos de LLC. Por outro lado, os marcadores presentes nos tubos dois, três e quatro permitem a subclassificação dos outros casos de NCBM, não-LLC, como tricoleucemia, linfoma folicular, linfoma de células do manto, linfoma da zona marginal, linfoma difuso de grandes células B, entre outros (BÖTTCHER et al., 2012).

Quadro 3 - Painel de anticorpos monoclonais utilizado na classificação das neoplasias de células B maduras, publicado pelo grupo Euroflow.

Tubo	FITC	PE	PercP-Cy5.5	Pe-Cy7	APC	APC-H7	PB	PO
1	CD23	CD10	CD79b	CD19	CD200	CD43	CD20	CD45
2	CD31	LAIR1	CD11c	CD19	IgM	CD81	CD20	CD45
3	CD103	CD95	CD22	CD19	CXCR5	CD49d	CD20	CD45
4	CD62L	CD39	HLA-DR	CD19	CD27	-	CD20	CD45

Nota: FITC: isotiocianato de fluoroceína; PE: ficoeritrina; PercP-Cy5.5: complexo proteína piridina de clorofila cianina 5.5; Pe-Cy7: ficoeritrina cianina 7; APC: aloficocianina; APC-H7: aloficocianina-Hilite 7; PB: Pacific Blue; PO: Pacific Orange.

A avaliação dos marcadores CD5 e CD10 nas células neoplásicas permite restringir as possibilidades diagnósticas entre os vários subtipos de neoplasias de células B maduras, pois divide os linfomas em quatro grupos (

Quadro 4). Após essa análise é necessária a avaliação dos outros marcadores imunofenotípicos ou de outros métodos para a conclusão do diagnóstico (CRAIG; FOON, 2008; SANDES et al., 2014).

Quadro 4 - Grupos para diagnóstico diferencial

Grupo 1: CD5 positivo CD10 negativo	
LLC	LCM
LPL	LZM
LDGCB	LLPL
Grupo 2: CD5 negativo CD10 positivo	
LF	LDGCB
LB	TL
Grupo 3: CD5 positivo CD10 positivo	
LF	LDGCB
LCM	LB
Grupo 4: CD5 negativo CD10 negativo	
TL	LZM
LDGCB	LF
LCM	LLPL

Fonte: Adaptado de CRAIG; FOON, 2008

Nota: LLC: Leucemia linfoide crônica; LCM: linfoma de células do manto; LPL: leucemia prolinfocítica; LZM: linfoma da zona marginal; LDGCB: linfoma difuso de grandes células B; LLPL: Linfoma linfoplasmocítico; LF: linfoma folicular; LB: linfoma de Burkitt; TL: tricoleucemia.

O Grupo 1 compreende as neoplasias CD5 positivo, CD10 negativas cujos representantes são a LLC, LCM, LPL, LZM, LDGCB e LLPL. Dos representantes desse grupo, a LLC é a doença que apresenta o fenótipo mais característico, porém não específico (CRAIG; FOON, 2008). De acordo com o estudo de Barna e colaboradores (2008) é possível distinguir a LLC do LCM pela intensidade de expressão do CD23. A grande maioria dos casos de LLC expressam CD23 positivos com forte intensidade, enquanto que os casos de LCM não expressam. Nos casos de positividade para o CD23 no LCM, geralmente a intensidade é fraca; quando o CD23 é positivo com média a forte intensidade é possível analisar outros marcadores como o FMC-7 (geralmente negativo para LLC e positivo nas células do LCM) (BARNA et al., 2008). Recentemente, identificou-se que o marcador CD200 provê uma excelente distinção entre a LLC e o LCM, visto que é positivo na primeira neoplasia e negativo na segunda (SANDES et al., 2014). A distinção entre LDGCB CD5 positivo da variante blastoide do LCM, da LLC, da LPL e do LLPL com o LCM pode ser feito

analisando-se a ciclina D1, visto que essa proteína é expressa apenas nos casos de LCM (ABSI; HSI; KALAYCIO, 2005; BARNA et al., 2008; NADERI; YANG, 2013; SWERDLOW et al., 2017). A metodologia padrão ouro para a detecção da ciclina D1 é a imunohistoquímica, porém como é método laborioso e demorado, alguns trabalhos avaliaram a possibilidade de avaliar por CF, mas não foram conclusivos e sugerem mais comparações com resultados de imunohistoquímica para determinar o valor diagnóstico do ensaio por essa metodologia (ELNENAEI et al., 2001; JAIN et al., 2002). A avaliação histológica da MO é importante para o diagnóstico diferencial entre a LLC e o LLPL CD5 positivo, pois no LLPL a característica morfológica é geralmente intersticial, acompanhado de intensa neoformação de vasos e fibrose. O diagnóstico diferencial mais difícil e controverso é o do LLPL leucemizado. Em um estudo realizado por Konoplev e colaboradores (2005) foi observado que em 75 casos analisados de LLPL, 100% apresentaram expressão de CD19, CD20 e CD52 na IMF por CF. O CD79b foi positivo em 85% dos casos, o CD23 em 61%, o CD38 em 48% e apenas 5% dos casos apresentaram expressão de CD5 (KONOPLEV et al., 2005; LORAND-METZE, 2005), porém outros autores referem que o CD5 pode ser expresso em até 20% dos casos (OWEN et al., 2001; LORAND-METZE, 2005).

As células dos pacientes com LCM podem expressar CD5 em cerca de 5% dos casos e nessas situações pode ser difícil diferenciar dos casos de LLC atípica (por exemplo, com CD23 negativo). O LCM também pode demonstrar diferenciação plasmocitária o que leva a necessidade do diagnóstico diferencial com o LLPL (CRAIG; FOON, 2008). O diagnóstico diferencial da LPL deve ser realizado com a variante blastoide do LCM (ABSI; HSI; KALAYCIO, 2005; DUNGARWALLA; MATUTES; DEARDEN, 2008), com o LCM e com casos de LLC com aumento de prolinfócitos (ABSI; HSI; KALAYCIO, 2005).

O Grupo 2 compreende as neoplasias CD5 negativo, CD10 positivo cujos representantes são o LF, o LDGCB, o LB e a TL. Pode ser difícil distinguir o LDGCB CD10 positivo do LF de alto grau devido a presença de centroblastos (células de maior tamanho), além disso, também existe sobreposição genética dessas duas neoplasias visto que 20% dos casos de LDGCB apresentam a t(14;18)(q32;q21) e de 70% a 95% dos pacientes com LF apresentam a translocação. A expressão de CD10 em pacientes com TL não é frequente, mas ocorre. Nesses casos, a análise de outros marcadores, como CD25 e CD103, são úteis para a conclusão diagnóstica (CRAIG; FOON, 2008).

O Grupo 3 compreende as neoplasias CD5 positivo, CD10 positivo cujos representantes são o LF, o LDGCB, o LCM e o LB. A variante blastoide do LCM, fenotipicamente, é semelhante à forma clássica do LCM, entretanto, as células neoplásicas da forma variante geralmente apresentam maior tamanho, o que é evidenciado na CF pelas características de dispersão da luz (alto FSC e alto SSC); além da positividade para o marcador CD10. Dessa forma, é necessário o diagnóstico diferencial entre a variante blastoide do LCM com o LDGCB, pois também são encontradas células com grande tamanho que podem co-expressar CD5 e CD10 (DELFA, 2011; SWERDLOW et al., 2017).

O Grupo 4 compreende as neoplasias CD5 negativo, CD10 negativo cujos representantes são a TL, o LZM com ou sem linfócitos vilosos, o LLPL, o LDGCB, o LF CD10 negativo e o LCM CD5 negativo. A anexina A1 é o marcador mais específico para o diagnóstico da TL, e, é usado para distinguir TL do LZM e da forma variante da TL (GOLDANIGA et al., 2008; SWERDLOW et al., 2008). A ausência de CD103 e CD25 no LZM também ajuda a distinguir dos casos de TL (REID; FRIEDBERG, 2013). Recentemente, o estudo de Mason e colaboradores (2017) mostrou que a análise do CD200 e do CD1d permite distinguir os casos de TL, TL variante, LZM e LLPL. Nesse trabalho, a TL apresentou forte expressão para CD200 juntamente com a positividade para CD1d, enquanto que TL variante mostrou fraca expressão para ambos marcadores. Ainda, os casos de LLPL mostraram positividade para CD200 em combinação com expressão fraca a negativa de CD1d, em contraste do LZM que apresentou expressão tanto para CD200 quanto para CD1d (MASON et al, 2017).

3.4 NOVOS MARCADORES IMUNOFENOTÍPICOS

Apesar de já existirem marcadores imunofenotípicos preconizados em painéis de diagnóstico para as NCBM, ainda há necessidade do estudo de novos marcadores para serem incluídos na rotina com o objetivo de realizar o diagnóstico diferencial entre algumas neoplasias. É possível verificar na literatura alguns dados referentes a função e expressão em células neoplásicas e não neoplásicas dos marcadores utilizados nesse estudo.

O CD80 e o CD86 pertencem a superfamília das imunoglobulinas (ACUTO; MICHEL, 2003), e ambos são estruturalmente e funcionalmente relacionados (BHAT; CZUCZMAN, 2010). Esses antígenos são moléculas co-estimulatórias cujas vias são bem

caracterizadas e envolvem os receptores CD28/CTLA-4, os quais estão presentes nas células T (GREENWALD; FREEMAN; SHARPE, 2005). A expressão de CD80 e CD86 em células apresentadoras de antígenos está aumentada na presença de patógenos e pela secreção de citocinas produzidas em resposta a esses micro-organismos, o que resulta na ativação dos linfócitos T (SHARPE; ABBAS, 2006). A expressão de CD80 e CD86 foi descrita inicialmente em células apresentadoras de antígenos, no entanto, posteriormente, observou-se expressão desses marcadores em células T cuja funcionalidade ainda não é bem compreendida (TAYLOR et al., 2004). De acordo com a literatura, o CD80 está ausente em células dendríticas não ativadas (ACUTO; MICHEL, 2003) e é expresso em monócitos, somente após ativação (VASILEVKO et al., 2002). Por outro lado, o CD86 é expresso constitutivamente em monócitos (VASILEVKO et al., 2002) e em células B do centro germinal e B maduras (LLINÀS et al., 2011). A capacidade das células B para transmitir o sinal coestimulador às células T por meio do CD80 e do CD86 está muito bem estabelecida. No entanto, a forma como a relação entre o CD80 e o CD86 com o CD28 e o CTLA-4 afeta a função das células B está muito pouco documentada. Além disso, pouco se sabe sobre a proliferação e diferenciação de células B em relação a essas moléculas. Um estudo realizado por Mir e colaboradores (2015) avaliou a interferência desses marcadores nas células de linfomas B e evidenciou que a sinalização por meio do CD80 inibiu o crescimento das células neoplásicas dos linfomas de células B por elevação da expressão das proteínas pro-apoptóticas (caspase-3, caspase-8, Fas, FasL, Bak e Bax) e regulação negativa da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-x. Ou seja, a sinalização de estimulação através do CD80 em linfomas de células B pode retardar a proliferação mediante a regulação positiva da expressão de proteínas proapoptóticas e antiapoptóticas, e, dessa forma, induzir a apoptose. Por outro lado, o CD86 aumentou a quantidade de proteínas antiapoptóticas (Bcl-w e Bcl-x) e diminuiu a concentração de caspase-8. Dessa forma, a coestimulação por meio do CD86 pode aumentar a taxa de proliferação das células dos linfomas e secretar anticorpos que podem ajudar os linfomas a evadir a vigilância imunológica. Assim, os sinais emitidos por anticorpos anti-CD80 e anti-CD86 podem regular diferencialmente a atividade de células B nos linfomas (MIR, 2015).

O CD163, também denominado de proteína M130, é um membro da superfamília classe B de receptores tipo *scavenger* com domínios extracelulares ricos em cisteína com cinco isoformas distintas (BUECHLER et al., 2000). Sua função imunológica é essencialmente

homeostática relacionada com a ligação desse receptor a complexos hemoglobina:haptoglobina. A hemólise intravascular, originada de eritrócitos malformados ou senescentes, ocasiona a liberação de hemoglobina livre tóxica e oxidativa que pode ser complexada à haptoglobina por meio dos macrófagos teciduais do fígado, baço ou MO. Nesse processo, macrófagos que expressam CD163 internalizam o complexo hemoglobina:haptoglobina, o que leva à proteção do tecido contra um dano oxidativo causado pela hemoglobina tóxica. Além disso, o CD163 possui outras funções, pois participa na adesão de células endoteliais, na indução a tolerância e regeneração tecidual (VAN DEN HEUVEL et al., 1999; ONOFRE et al., 2009). Os dados da literatura apontam que a expressão do CD163 parece estar restrita a células da linhagem monocítica (monócitos/macrófagos) (BUECHLER et al., 2000).

A interleucina 10 (IL10) atua na estimulação da sobrevivência, proliferação e diferenciação das células B. No entanto, as funções principais da IL-10 na imunidade é a imunossupressão, inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias, regulação do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e de moléculas coestimulatórias. Essas funções são mediadas pelo receptor da interleucina 10 (IL10R), que consiste em duas subunidades IL10R α e IL10R β (BÉGUELIN et al., 2015) e a subunidade IL10R α também é conhecida como CD210a, cuja região extracelular contém dois domínios de fibronectina tipo III (MATESANZ-ISABEL et al., 2011). Estudos apontam que o CD210a está expresso na maioria das células hematopoiéticas (MOSSER; ZHANG, 2008; MATESANZ-ISABEL et al., 2011).

A apoptose pode ser controlada por duas vias, a via extrínseca (mediada por receptores) e a via intrínseca (mediada pela mitocôndria). Existem diversos ligantes da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) envolvidos na apoptose. Alguns membros dessa família são TRAIL/Apo2L/TNFSF10. A falha na apoptose tem sido considerada como fator para o desenvolvimento de tumores e na resistência à terapia das neoplasias. O ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL) é um poderoso ativador da apoptose em células tumorais com a vantagem de não apresentam toxicidade contra os tecidos normais. O TRAIL pode se ligar a cinco receptores: quatro proteínas transmembranares do tipo I: TRAIL-R1 (CD261, DR4), TRAIL-R2 (CD262, DR5), TRAIL-R3, TRAIL-R4 e um receptor solúvel (SZLISZKA et al., 2009). A família de receptores TRAIL está relacionada a vários eventos celulares, como inflamação, choque séptico e apoptose. O CD261 e o CD262 são proteínas transmembrana do tipo 1

relacionadas à indução de apoptose (CORALLINI et al., 2006) pois contém domínios de morte pelos quais o TRAIL transmite um sinal apoptótico. O TRAIL desencadeia a apoptose por meio da interação com os receptores de morte TRAIL presentes nas células alvo. Estes domínios de morte intracelulares do CD261 e do CD262 são considerados essenciais para a indução da apoptose após a ligação com o receptor (SZLISZKA et al, 2009). Com relação a expressão em células normais o estudo de Llinàs e colaboradores (2011) observou fraca intensidade de expressão de CD261 e de CD262 em células B de memória em amostras de amígdalas (LLINÀS et al., 2011). O CD264 (DcR2) é uma proteína transmembrana (TRAIL-R4) cuja função está relacionada com a inibição da apoptose (CORALLINI et al., 2006). Por falta de um domínio de morte funcional, o CD264 atua como receptor antagonista que compete com os receptores de morte TRAIL-R1 (CD261) e TRAIL-R2 (CD262) para a ligação ao TRAIL. Portanto, esse receptor está envolvido na regulação negativa da apoptose ao sequestrar o TRAIL e estimular os sinais de sobrevivência (SZLISZKA et al., 2009). Com relação a expressão celular, no estudo de Llinàs e colaboradores (2011) foi observada expressão de moderada intensidade de CD264 em células B de memória *unswitched* (CD19 positivo, CD27 positivo e IgD) e também em células B pré-centro germinal (CD19 positivo, CD38 positivo e IgD positivo) (LLINÀS et al., 2011).

Os membros da família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF) são moduladores cruciais na resposta inflamatória e resposta imune celular. Esses receptores medeiam uma variedade de funções biológicas que vão desde a proliferação, diferenciação, apoptose e a sobrevivência celular (PAN et al., 1998). O CD358 (DR6) é um receptor transmembrana tipo 1, membro 21 da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNFRSF21). A super expressão do CD358 permite que o seu domínio de morte citoplasmática induza a apoptose por meio das vias do NF- κ B e da quinase c-Jun N-terminal (JNK) (TUTE, 2011; BENSCHOP; WEI, 2009). Também pode promover a apoptose mediada por BAX e pela liberação do citocromo c das mitocôndrias no citoplasma (ZENG et al., 2012). De acordo com estudos este receptor é amplamente expresso em células hematopoiéticas e não hematopoiéticas, inclusive em células tumorais (MATESANZ-ISABEL et al., 2011; LLINÀS et al., 2011).

O CD361 (EVI2b: *ectopic viral integration site 2B*) é uma proteína transmembrana tipo 1 (MATESANZ-ISABEL et al., 2011) encontrado em células envolvidas ou não com o sistema imune, pouco

caracterizado, cuja função permanece desconhecida (CABEZÓN et al., 2011).

As proteínas relacionadas à resistência a múltiplos fármacos (*multi-drug resistance*- MRD) não são alvos de diagnóstico, mas sim marcadores promissores relacionados a falha terapêutica. De modo geral, essas proteínas funcionam como bombas de efluxo como resultado do transporte ativo do fármaco para fora da célula, fazendo com que as concentrações citotóxicas desejadas não sejam atingidas, o que ocasiona a falha terapêutica (NORGAARD; OLESEN; HOKLAND, 2004). As principais famílias de proteínas implicadas neste fenômeno são a superfamília das transportadoras ABC (*ATP-binding cassette*) e a família das proteínas do grupo *Vault*. Dentre as proteínas do primeiro grupo, as mais estudadas são a Proteína Associada à Resistência a Múltiplos Fármacos 1 (ABCC1/MRP1) e a Proteína de Resistência a Múltiplas Drogas 1 (ABCB1/PgP/MDR1). De acordo com estudos prévios a expressão da ABCC1/MRP1 varia entre os diferentes tecidos e indivíduos pois pode ser expressa nos pulmões, cérebro, testículos, rins, esqueleto, músculo cardíaco e esquelético, placenta, intestinos, fígado e células hematopoiéticas (SUGAWARA et al., 1997; BORST et al., 2000; DEAN; HAMON; CHIMINI, 2001; LESLIE; DEELEY; VAN DER DEEN et al., 2005; COLE; DEELEY, 2006; DEELEY; WESTLAKE; COLE, 2006). A ABCB1/PgP foi o primeiro membro da família de transportadores de efluxo detectado (1972) e é o mais bem caracterizado (STAUD et al., 2010). Essa proteína possui papel fisiológico na defesa das células contra estímulos externos sendo encontrada em tecidos normais envolvidos em processos de absorção e excreção de compostos (como o fígado, os rins e o intestino), na glândula adrenal e em órgãos com função de barreira (como a barreira hematoencefálica, o endotélio capilar e a placenta). Além disso, essa proteína também é detectada nos precursores hematopoiéticos e linfócitos e apresenta papel fundamental na regulação da proliferação e diferenciação dessas células (DUHEM; RIES; DICATO, 1996; SUGAWARA et al., 1997; GOTTESMAN; FOJO; BATES, 2002; MARZOLINI et al., 2004; VAN DER DEEN et al., 2005). A cerca de três décadas atrás, os estudos com a ABCB1/PgP ganharam evidência devido ao seu papel no fenômeno de resistência a múltiplos fármacos em células tumorais (STAUD et al., 2010).

A survivina é uma proteína que atua na regulação da divisão celular e na inibição da apoptose e aumento da proliferação e angiogenese (MAZUR et al., 2004; HE et al., 2015). Essa proteína é normalmente expressa durante o período embrionário e o

desenvolvimento fetal devido às altas taxas de divisão celular, e, dessa forma, torna-se praticamente indetectável nos tecidos dos adultos que já atingiram a fase final de diferenciação. A expressão de survivina é regulada pelo ciclo celular de forma que a expressão máxima ocorre na fase G2/M. Assim, a superexpressão de survivina tem sido relacionada a um potencial oncogênico, visto que essa proteína se encontra abundantemente expressa na maioria dos cânceres, incluindo as neoplasias hematológicas (MAZUR et al., 2004). Foi relatado que existem diferenças na expressão da survivina entre células normais e neoplásicas (HE et al., 2015).

Após essa revisão, realizou-se a caracterização desses marcadores em células consideradas normais e em células neoplásicas.

4 METODOLOGIA

4.1 AMOSTRAS DOS PACIENTES

Para a avaliação dos novos marcadores imunofenotípicos e das proteínas (survivina e proteínas de resistência a múltiplos fármacos) por citometria de fluxo, foram analisadas as amostras de aspirado de MO e SP coletados com EDTA e as amostras de aspirados (punção aspirativa por agulha fina- PAAF) e biópsias de linfonodos e de outros sítios anatômicos conservadas em solução fisiológica 0,9%, de pacientes com suspeita clínica de neoplasias de células linfoides B maduras referenciados a Divisão de Análises Clínicas (DACL) do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC) e do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC), no momento do diagnóstico, entre os meses de novembro de 2013 e maio de 2017, e que 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 CEPSH-UFSC 1.691.983/2016). A inclusão das amostras foi realizada pela análise do perfil imunofenotípico dos pacientes de acordo com os critérios de classificação recomendados pela OMS (2008) utilizando-se o painel de AcMo proposto pelo grupo Euroflow (Quadro 3) (VAN DONGEN et al., 2012B). Dessa forma, foram incluídas no estudo amostras cujo diagnóstico tenha sido NCBM (linfomas e mieloma múltiplo). Foram excluídas do estudo as amostras que apresentaram coágulos, hemólise e baixa viabilidade celular (inferior a 60%).

Para a determinação do número mínimo de casos a ser analisado em cada grupo, foi realizado o cálculo amostral para a estimação de uma média em populações finitas com auxílio da ferramenta disponível no *site* do Laboratório de Epidemiologia e Estatística da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (<http://www.lee.dante.br/>). Para o cálculo amostral, adotou-se um nível de confiança de 95% e um erro máximo da estimativa de 100. O desvio padrão esperado foi calculado a partir dos dados provenientes das amostras do próprio estudo coletadas entre os meses de novembro de 2014 a outubro de 2015. Assim, o desvio padrão utilizado para o cálculo amostral foi de 708. De acordo com o cálculo amostral, para 36 meses de coleta de amostras, o número de casos a ser analisado em cada grupo de NCBM será conforme apresentado na Tabela 1. Os demais grupos de neoplasias não contemplados na tabela apresentaram uma frequência muito baixa, dessa

forma, não foi realizado o cálculo amostral e foram avaliados todos os casos que diagnosticados durante a realização do estudo.

Tabela 1 - Cálculo amostral para os grupos de neoplasias de células B maduras

Neoplasias de células B maduras	n
Leucemia linfoide crônica	26
Linfoma difuso de grandes células B	17
Linfoma folicular	10
Linfoma de Burkitt	10
Tricoleucemia	10

4.2 AMOSTRAS CONTROLE

O grupo controle para obtenção do perfil imunofenotípico das células normais foi constituído por 10 amostras de sangue periférico (cinco do gênero masculino e cinco do gênero feminino) coletadas com EDTA de indivíduos sadios que assinaram o TCLE referente ao projeto submetido ao CEPESH-UFSC nº 746.486/2014. Também foram utilizadas como controles oito amostras de MO de indivíduos sem neoplasias hematológicas (cinco do gênero masculino e três do gênero feminino) coletadas com EDTA. Além disso, foram incluídas no estudo amostras de pacientes com Leucemia linfoblástica aguda B de células B (LLA-B) para a comparação da intensidade de fluorescência média entre as células B imaturas presentes nessas doenças com aquelas observadas em células B maduras presentes nos casos de neoplasias de células linfoides B maduras. Esses pacientes também assinaram o TCLE conforme o CEPESH-UFSC nº 913/2010 ou CEPESH-UFSC 1.691.983/2016.

4.3 IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO

A imunofenotipagem por citometria de fluxo é um método multiparamétrico que avalia as características de dispersão de luz (tamanho e granulosidade) e a intensidade de fluorescência das células à medida que essas passam por um feixe de laser (MACEY, 2007). Para a realização da imunofenotipagem por citometria de fluxo foi utilizado 100µL de amostra biológica cujo protocolo de marcação estava de

acordo com as informações constantes na bula dos fabricantes dos reagentes. Os anticorpos monoclonais utilizados no estudo eram conjugados aos fluorocromos: isotiocianato de fluoroceína (FITC), ficoeritrina (PE), complexo proteína piridina de clorofila (PerCP), complexo proteína piridina de clorofila cianina 5.5 (PerCP-Cy5.5), ficoeritrina cianina 7 (Pe-Cy7), alofococianina (APC), alofococianina cianina 7 (APC-Cy7), alofococianina-Hilite 7 (APC-H7), V450, Pacific Blue (PB), Pacific Orange (PO) ou V500. A informação do fluorocromo, do clone, do volume utilizado e do fabricante pode ser visualizada no Quadro 5.

Quadro 5 - Características dos anticorpos monoclonais para a avaliação imunofenotípica

AcMo e Fluorocromo	Código	Clone	Volume da Bula	Volume Utilizado	Fabricante
CD86 PE	1P-531-T100	BU63	20 µl	7µl	Exbio, CZ
CD210a PE	556013	3F9	20 µl	7µl	BD Biosciences, USA
CD261 PE	1P-403-C100	DR-4-02	5µl	3µl	Exbio, CZ
CD262 PE	1P-461-C100	DR5-01-1	5µl	3µl	Exbio, CZ
CD264 PE	1P-519-C100	TRAIL-R4-01	3µl	3µl	Exbio, CZ
CD358 PE	1P-404-C100	DR-6-04-EC	10 µl	5µl	Exbio, CZ
CD361 PE	1P-643-T100	MEM-216	20 µl	5µl	Exbio, CZ
CD163 PE	556018	GHI/61	20 µl	7µl	BD Pharmingen, USA
PgP PE	557003	17F9	20 µl	10 µl	BD Pharmingen, USA
Survivina PE	IC6472P	91630	10 µl	5µl	R&D Systems, USA
CD19 Pe-Cy7	557835	SJ25C1	5µl	3µl	BD Pharmingen, USA
CD20 APC	340941	L27	20 µl	3 µl	BD Biosciences, USA
CD38 APC-H7	656646	HB7	5µl	3 µl	BD Biosciences, USA
CD38 FITC	A0778	T16	20 µl	7µl	Beckman Coulter, USA
CD80 APC-H7	561134	L307.4	5µl	2,5 µl	BD Pharmingen, USA
CD10 APC	340923	HI10a	5 µl	3 µl	BD Pharmingen, USA
CD3 PercP	PC-514-T100	UCHT1	10 µl	4 µl	Exbio, CZ
CD34 PercP Cy5.5	T9-664-T100	581	4µl	1 µl	Exbio, CZ
CD8 FITC	A07756	B9.11	5µl	5µl	Beckman Coulter, USA
MRP1 FITC	557593	QCRL-3	20 µl	10 µl	BD Pharmingen, USA
CD3 PB	PB-514-T100	UCHT1	4µl	1µl	Exbio, CZ
CD4 PB	PB-359-T100	MEM-241	4µl	1 µl	Exbio, CZ
CD45 PO	PO-684-T100	HI30	4µl	3 µl	Exbio, CZ
CD20 V450	642274	L27	5µl	3 µl	BD Biosciences, USA

Legenda: AcMo: anticorpo monoclonal; FITC: isotiocianato de fluoroceína; PE: ficoeritrina; PerCP: complexo proteína piridina de clorofila; PerCP-Cy5.5: complexo proteína piridina de clorofila cianina 5.5; Pe-Cy7: ficoeritrina cianina 7; APC-H7: alofococianina-Hilite 7; PB: Pacific Blue; PO: Pacific Orange.

O painel de anticorpos monoclonais utilizados para a marcação de membrana nas amostras dos pacientes com neoplasias de células linfoides B maduras pode ser visualizado no Quadro 6. Para casos com suspeita de mieloma múltiplo foi adicionado o CD38 em FITC.

Quadro 6 - Painel de anticorpos monoclonais utilizados para a marcação de membrana celular nas amostras dos pacientes com NCBM

FITC	PE	PE-CY7	APC-H7	PB	PO
CD38*	X	CD19	X	CD3	CD45
CD38*	CD86	CD19	CD80	CD3	CD45
CD38*	CD210a	CD19	X	CD3	CD45
CD38*	CD261	CD19	X	CD3	CD45
CD38*	CD262	CD19	X	CD3	CD45
CD38*	CD264	CD19	X	CD3	CD45
CD38*	CD358	CD19	X	CD3	CD45
CD38*	CD361	CD19	X	CD3	CD45
CD38*	CD163	CD19	X	CD3	CD45

Legenda: FITC: isotiocianato de fluorocéina; PE: ficoeritrina; Pe-Cy7: ficoeritrina cianina 7; APC-H7: alofocianina-Hilite 7; Pacific Blue (PB); Pacific Orange (PO).

Nota: *adicionado apenas nos casos com suspeita de MM e LLPL.

O painel de anticorpos monoclonais utilizados para a marcação intracelular direta nas amostras dos pacientes com NCBM pode ser visualizado no Quadro 7.

Quadro 7 - Painel de anticorpos monoclonais utilizados para a marcação intracelular direta

FITC	PE	PE-CY7	APC-H7	PB	PO
ABCC1/MRP1	ABCB1/PgP	CD19	CD38*	CD3	CD45
X	Survivina	CD19	CD38*	CD3	CD45

Legenda: FITC: isotiocianato de fluorocéina; PE: ficoeritrina; Pe-Cy7: ficoeritrina cianina 7; APC-H7: alofocianina-Hilite 7; Pacific Blue (PB); Pacific Orange (PO).

Nota: * adicionado apenas nos casos com suspeita de MM e LLPL.

O painel de anticorpos monoclonais utilizados para a marcação das amostras controle de SP e de MO podem ser visualizados no Quadro 8.

Quadro 8 - Pannel de anticorpos monoclonais utilizados para a marcação de membrana células nas amostras controle de SP e MO

Material	FITC	PE	PercP/PercP Cy5.5	Pe- Cy7	APC	APC- H7	PB/V450	PO
SP	CD8	*	CD3	CD19	CD20	CD80	CD4/CD20	CD45
MO	X	*	CD34	CD19	CD10	CD38	CD20	CD45

Legenda: FITC: isotiocianato de fluoroceína; PE: ficoeritrina; PerCP: complexo proteína piridina de clorofila; PerCP-Cy5.5: complexo proteína piridina de clorofila cianina 5.5; Pe-Cy7: ficoeritrina cianina 7; APC: alofocianina; APC-H7: alofocianina-Hilite 7; PB: Pacific Blue; PO: Pacific Orange.

Nota: *no fluorocromo PE foram adicionados os anticorpos monoclonais utilizados no estudo (CD86, CD210a, CD261, CD262, CD264, CD358, CD361 e CD163).

4.3.1 Técnica de marcação direta na membrana celular

Para a pesquisa dos antígenos presentes na membrana celular foi realizada a técnica de marcação direta na qual os anticorpos monoclonais já estão conjugados aos fluorocromos. As amostras foram incubadas com os anticorpos monoclonais por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após esse período, os eritrócitos foram lisados com a solução lisante (BD FACS *Lysing Solution* diluída 1/10) e incubados novamente a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por mais 10 minutos. Depois desse período, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 300g e o sobrenadante foi desprezado. Depois, o pellet foi suspenso em solução salina (PBS) (Laborclin, Brasil) para ajustar a suspensão celular em 1×10^6 células/500µL e foi realizada a aquisição no citômetro de fluxo BD FACS Canto II (Becton Dickinson- BD, San Jose, USA).

4.3.2 Técnica de marcação direta intracelular

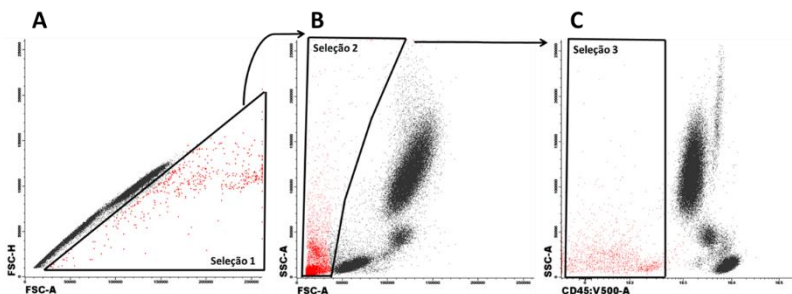
Para a marcação intracelular da survivina e das proteínas de resistência ABCB1/Pgp e ABCC1/MRP1 o protocolo foi semelhante, no entanto, primeiramente as células foram fixadas, e, posteriormente permeabilizadas para que os anticorpos conseguissem atingir os sítios de ligação localizados no interior das células. Para isso, foi utilizado o kit de fixação e permeabilização (ADG Van Der Grub Bio Research GmbH). Foram adicionados 100µL de amostra aos tubos com os volumes indicados dos marcadores de membrana (CD3, CD19 e CD45). As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 10 minutos a

temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Depois foi adicionado 100µL do reagente de fixação (Reagente A) e a amostra foi incubada novamente por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Passado esse tempo, foram adicionados 4 mL de PBS, procedeu-se a homogeneização e a centrifugação por 5 minutos a 300g. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi suspenso com 100µL do meio de permeabilização (Reagente B), e, então adicionados os anticorpos monoclonais com sítio de ligação intracitoplasmático (survivina, ABCB1/PgP e ABCC1/MRP1). As amostras foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após esse período, foram adicionados 4mL de PBS aos tubos, procedeu-se a homogeneização e a centrifugação por 5 minutos a 300g. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspenso com 500µL de PBS, e procedeu-se a aquisição das amostras no citômetro de fluxoBD FACS Canto II (Becton Dickinson- BD, San Jose, USA).

4.3.4 Aquisição das amostras e estratégia de análise dos dados

A aquisição das amostras foi realizada no citômetro de fluxo BD FACS Canto II (Becton Dickinson- BD, San Jose, USA) utilizando-se o programa BD FACS Diva versão 6.1.2 (BD, San Jose, USA) e a análise dos dados foi realizada utilizando-se o programa Infinicyt versão 1.7.1 (Cytognos, Salamanca, Espanha). Na aquisição das amostras foram salvos 50.000 eventos (células) em cada um dos tubos. Para que houvesse o mínimo de perda de células e que não fosse adquirida uma grande quantidade de restos celulares, células mortas ou hemácias não lisadas, o *threshold* (ponto de corte) foi ajustado em 33.000 no parâmetro *Foward Scatter* (FSC) referente ao tamanho celular. Para a análise, cada arquivo referente a um tubo de cada um dos indivíduos foi analisado individualmente, posteriormente, os arquivos foram unificados na opção *merge files* do programa Infinicyt para ser possível sobrepor os parâmetros de interesse e gerar os histogramas com as médias das intensidades de fluorescência média (IFM) dos pacientes e controles. Na análise foram eliminados os restos celulares por meio dos *dot plots* FSC-H versus FSC-A, SSC-A versus FSC-A x SSC-A e SSC-A versus CD45 (Figura 4).

Figura 4 - Estratégia de análise para eliminação dos restos celulares



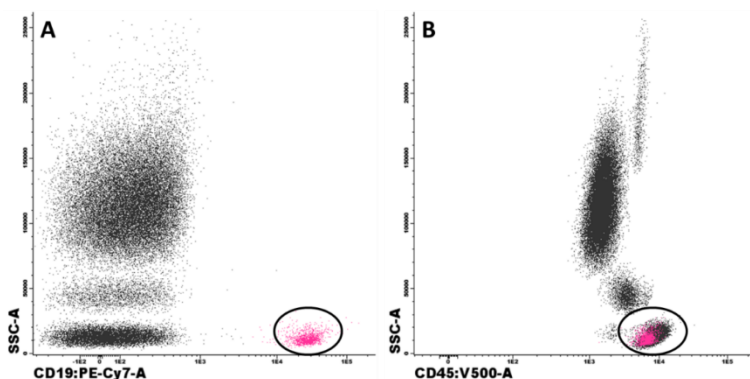
Fonte: A autora, 2016.

Nota: Painei A: Seleção 1, seleção das células com FSC-H e FSC-A divergentes; Painei B: Seleção 2, Restos celulares identificados pelo pequeno tamanho (baixo FSC-A) e pouca granulosidade (baixo SSC-A); Painei C: Seleção 3, restos celulares identificados pela ausência de expressão de CD45 (marcador pan-leucocitário).

Após esta etapa, as células foram selecionadas da seguinte forma:

- Células linfoides B: positividade para CD19 no *dot plot* SSC x CD19 (Figura 5 - A); forte expressão de CD45 no *dot plot* SSC-A x CD45 (Figura 5 - B). Cada caso foi analisado individualmente devido às particularidades de cada neoplasia. Por exemplo, no diagnóstico de mieloma múltiplo cujas células geralmente não expressaram CD19 e/ou CD45 foram avaliados pela localização das células plasmocitárias no *dot plot* FSC-A versus SSC-A (Figura 6- Seleção 1); pela negatividade de CD45 no *dot plot* SSC-A versus CD45 (Figura 6 - Seleção 2) e pela positividade para CD38.

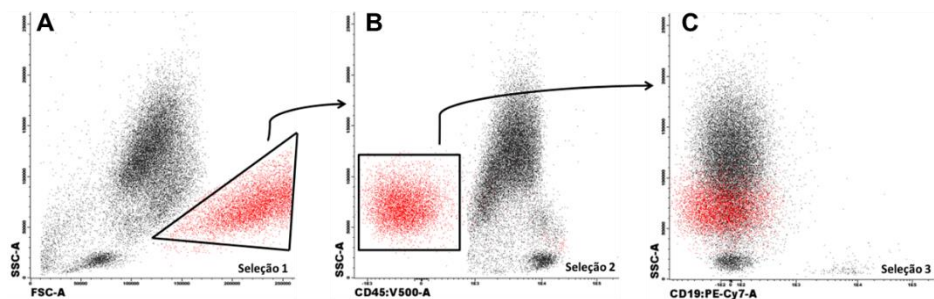
Figura 5 - Figura ilustrativa da estratégia de reconhecimento das células linfoides B pela análise do CD19 e do CD45



Fonte: A autora, 2016.

Nota: Painel A: seleção das células CD19 positivas no *dot plot* SSC-A versus CD19; Painel B: seleção das células com forte expressão de CD45 no *dot plot* SSC-A versus CD45.

Figura 6 - Figura ilustrativa estratégia de reconhecimento das células plasmocitárias CD19 negativas



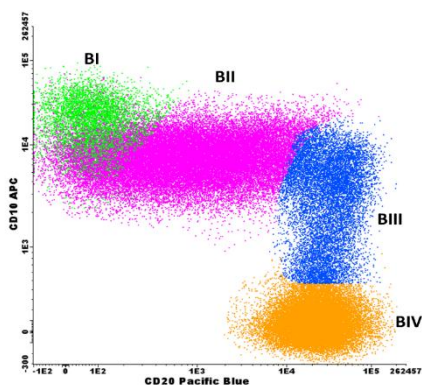
Fonte: A autora, 2016.

Nota: Painel A: Seleção 1, Identificação das células plasmocitárias pelo grande tamanho (alto FSC-A) e grande complexidade citoplasmática (alto SSC-A); Painel B: Seleção 2, Identificação das células plasmocitárias no CD45 (células negativas em vermelho); Painel C: Seleção 3, Visualização das células plasmocitárias no CD19.

- Ainda com relação as células B, analisou-se nas amostras de MO os diversos estágios de maturação (Figura 7) utilizando-se o marcador pan-B CD19, que é bem estabelecido para a análise da diferenciação das

células B, em combinação com os marcadores CD20, CD10 e CD34, separando-as em quatro subpopulações de acordo com a perda de CD10 e a aquisição de CD20. Dessa forma, as células pré-BI apresentaram expressão de CD34, forte expressão de CD10 e ausência de CD20; as células pré-BII não expressavam CD34, mas expressavam CD10 e CD20 (de forma heterogênea); as células B imaturas (BIII) não expressavam CD34, porém expressavam CD10 com fraca intensidade e CD20 com forte intensidade; e as células B maduras (BIV) não expressavam CD34 nem CD10, e apresentam CD20 com forte intensidade (VAN LOCHEM et al., 2004).

Figura 7 - Estágios de maturação das células linfoides B nas amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias



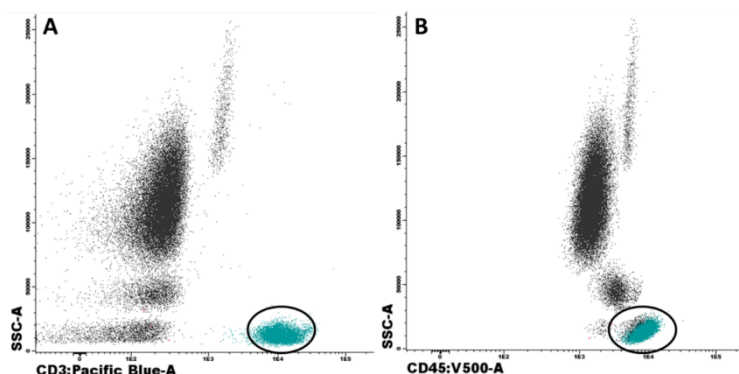
Fonte: A autora, 2017

Nota: B-I: pré-BI; B-II: pré-BII; B-III: imaturas; B-IV: maduras.

- Células linfoides T: positividade para CD3 no *dot plot* SSC-A versus CD3 (Figura 8–A); forte expressão de CD45 no *dot plot* SSC-A x CD45 (Figura 8- B);

- Eosinófilos, neutrófilos, monócitos e basófilos: pela localização de acordo com as características de dispersão de luz nos *dot plots* SSC-A x CD45 (Figura 9- A) e FSC-A x SSC-A (Figura 9- B);

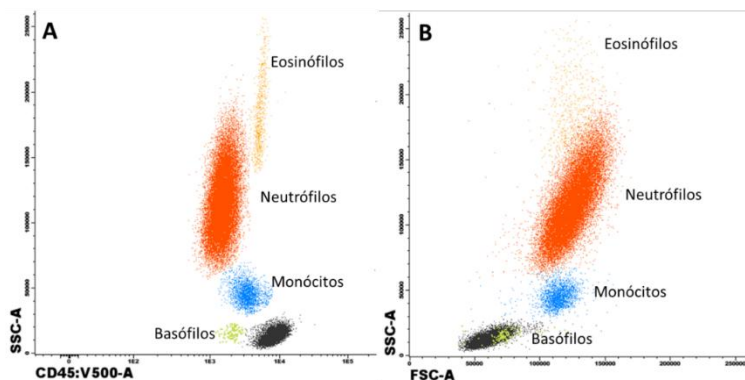
Figura 8 - Figura ilustrativa da estratégia de reconhecimento das células linfoides T pela análise do CD3 e do CD45



Fonte: A autora, 2016.

Nota: Paine A: seleção das células CD3 positivas no *dot plot* SSC-A versus CD3; Paine B: seleção das células com forte expressão de CD45 no *dot plot* SSC-A versus CD45.

Figura 9 - Figura ilustrativa da estratégia de reconhecimento dos eosinófilos, neutrófilos, monócitos e basófilos pela análise do CD45 e das características de dispersão de luz

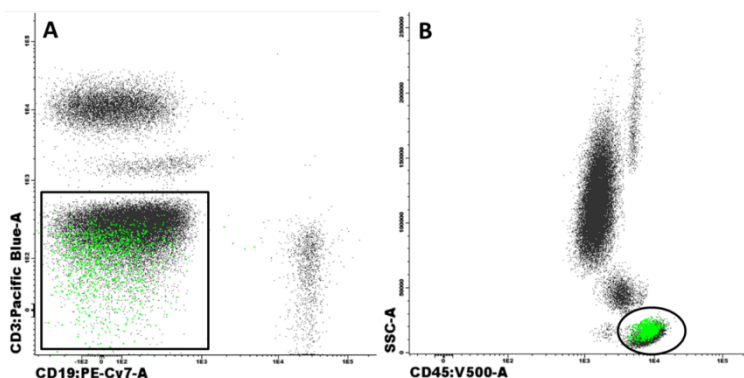


Fonte: A autora, 2016.

Nota: Paine A: Identificação dos eosinófilos, neutrófilos, monócitos e basófilos de acordo com a expressão de CD45; Paine B: Identificação dos eosinófilos, neutrófilos, monócitos e basófilos de acordo com as características de dispersão de luz (SSC-A e FSC-A).

- Células NK: negatividade para CD3 e para CD19 no *dot plot* CD3 x CD19 e na localização no CD45 no *dot plot* SSC x CD45;

Figura 10 - Figura ilustrativa da estratégia de reconhecimento das células NK pela análise do CD3, do CD19 e do CD45

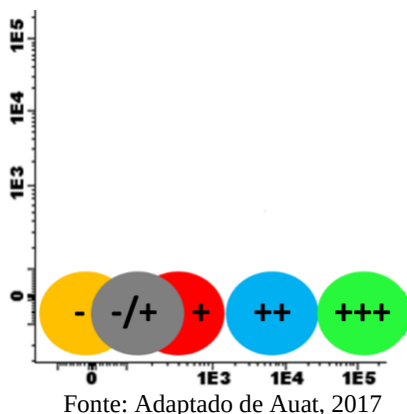


Fonte: A autora, 2016.

Nota: Painel A: seleção das células negativas para CD3 e para CD19 no *dot plot* CD3 versus CD19; Painel B: seleção das células com forte expressão de CD45 no *dot plot* SSC-A versus CD45.

Os dados referentes aos novos marcadores imunofenotípicos e as proteínas (survivina e proteínas associadas a resistência a múltiplos fármacos) foram expressos de forma qualitativa como negativos ou positivos. A expressão foi definida como negativa quando as células B neoplásicas apresentaram localização semelhante e/ou sobreposição completa com o controle negativo (células não marcadas). A presença de expressão foi definida como intensidade fraca (-/+), moderada (+), forte (++) ou intensa (+++) também em relação às células não marcadas (Figura 11). Além disso, avaliou-se a intensidade de fluorescência média (IFM) das células B neoplásicas. Para evitar vieses, a análise estatística e os gráficos foram elaborados subtraindo-se a IFM das células B neoplásicas marcadas da IFM das células B não marcadas. O valor gerado pelo cálculo tem a finalidade de minimizar as variações inerentes a metodologia como alterações nas voltagens dos canais de fluorescência e as diferenças nas configurações das compensações.

Figura 11 - Padrão de expressão qualitativa dos resultados



4.3.5 Controle de Qualidade

A calibração do equipamento BD FACS Canto II foi realizada diariamente utilizando-se o sistema de partículas do reagente CS&T - *Cytometer Setup and Tracking Beads* (BD Biosciences, EUA), que tem como função otimizar as voltagens e permitir que o software caracterize automaticamente e relate as medidas do citômetro. Também foi utilizado o controle positivo de processos Immunotroll Cells® (BeckmanCoulter, USA), o qual possui valores percentuais conhecidos de linfócitos, monócitos e granulócitos e apresenta características de dispersão de luz (FSC e SSC), intensidade de fluorescência e densidade antigênica semelhantes àquelas observadas em amostras de sangue periférico. Além disso, a compensação dos fluorocromos foi padronizada e checada periodicamente seguindo as informações do Consórcio Euroflow (KALINA et al., 2012).

Em todas as amostras de pacientes e controles, a presença de autofluorescência foi avaliada por meio de um tubo contendo apenas células não marcadas com anticorpos monoclonais, mas que passaram pelo mesmo método de preparação das células marcadas. De acordo com o *National Committee for Clinical Laboratory Standards* - NCCLS (1998) a autofluorescência das células não marcadas é causada por pirimidinas e nucleotídeos de flavina, e este controle é importante para identificar interferências de fatores não relacionados aos anticorpos como, por exemplo, medicamentos que podem afetar a autofluorescência celular. Além disso, esse controle foi utilizado para

definir a região considerada negativa e a considerada positiva para a avaliação dos novos marcadores (NCCLS, 1998).

Também foi realizado o controle de fluorescência menos um (FMO, do inglês *Fluorescence-minus-one*). Nesse tipo de controle, a amostra é marcada com todos os anticorpos monoclonais presentes naquele tubo, exceto um (Quadro 9). A análise desse tipo de controle permite a definição precisa das células que apresentam fluorescência acima do sinal de ruído (*background*) e a distinção entre as células positivas e negativas (PERFETTO; CHATTOPADHYAY; ROEDERER, 2004). Isso ocorre porque esse controle avalia a fluorescência intrínseca da célula e a fluorescência devido a ligação do anticorpo monoclonal no canal de detecção, o que permite fixar o limite superior de positividade para as células marcadas (TUNG et al., 2007).

Quadro 9- Exemplo de tubos para a avaliação do controle FMO

Tubo	PE	PE-CY7	PB	V500
A	X	X	X	X
B	X	CD19	CD3	CD45
C	CD210a	CD19	CD3	CD45

Legenda: FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; Pe-Cy7: ficoeritrina cianina 7; PB: Pacific Blue.

Nota: Tubo A: Tubo sem fluorocromos (células não marcadas) para avaliação da autofluorescência celular; Tubo B: Controle FMO, contendo todos os fluorocromos exceto o marcador de interesse; Tubo C: tubo teste contendo todos os fluorocromos.

No presente estudo, foi realizado o controle FMO com os anticorpos monoclonais CD86 (APÊNDICE A), CD163 (APÊNDICE B), CD210a (APÊNDICE C), CD261 (APÊNDICE D), CD262 (APÊNDICE E), CD358 (APÊNDICE F), CD361 (APÊNDICE G), ABCC1/MRP1 (APÊNDICE H) e survivina (APÊNDICE I).

4.3.6 Análise Estatística

A avaliação da distribuição Gaussiana dos parâmetros foi realizada utilizando-se o teste de Shapiro-Wilk. A avaliação das células presentes no SP dos indivíduos considerados saudáveis foi realizada por meio do Test T ou Mann-Whitney. A comparação entre os subtipos de neoplasias de células B maduras foi analisada com o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn-Bonferroni (não paramétricos).

Todos os testes foram aplicados considerando-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) e utilizando-se o programa SPSS, versão 22.0. Os gráficos foram elaborados com o programa GraphPad Prism versão 6.01.

4.4 ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS *in vitro*

Para a validar a utilização do CD80, analisou-se a expressão em monócitos após ativação *in vitro*. Para isso, foram utilizadas amostras de SP de indivíduos saudáveis coletadas com anticoagulante heparina e o agente mitogênico fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris*, PHA (GIBCO). O estudo de Nowell (1960) sugere que o PHA não atua estimulando a mitose por si nos leucócitos, mas inicia a conversão de monócitos e linfócitos a um estado capaz de divisão pois as células provenientes de amostras de SP normais não são mitoticamente ativas.

Para a ativação, a cultura celular foi realizada em fluxo laminar utilizando-se 0,5 ml de amostra de SP e 4 ml de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina 59 e 100 µg/ml de estreptomicina. Em seguida, foram adicionados 100 µl de PHA (GIBCO) e a suspensão celular foi incubada por três dias a 37°C, numa atmosfera com 5% de CO₂. Concomitantemente, foi processada uma cultura de monócitos, nas mesmas condições, contudo sem a adição da fitohemaglutinina (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 para a marcação imunofenotípica (AUAT, 2017).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 195 amostras (Tabela 2) de indivíduos adultos, 113 do gênero masculino (58 ± 18 anos) e 82 do feminino (61 ± 18 anos), nas quais a porcentagem de células B neoplásicas variou entre 0,8% e 96,0%. Para cada marcador o número total de amostras variou devido ao volume de amostra (para amostras com pouco volume não foi possível realizar a marcação para todos os marcadores); ou quantidade de cada anticorpo monoclonal (o volume de uso foi diferente para cada marcador devido à titulação, dessa forma, o número total de testes variou). Para análise estatística, foram considerados como “grupos” as neoplasias que continham mais de três amostras de pacientes, dessa forma, aquelas que continham uma ou duas amostras de pacientes também foram incluídas nas Figuras, porém nenhum teste estatístico foi aplicado para a comparação.

Tabela 2 - Distribuição de gêneros e de tipos de amostras nas diferentes neoplasias de células B analisadas.

Neoplasia	M	F	Total	Amostra
Linfoma intermediário entre LCM e LZME	0	1	1	1 SP
Leucemia prolinfocítica	1	0	1	1 SP
Linfoma de células B CD5 positivo CD10 negativo	1	0	1	1 MO
Linfoma difuso de grandes células B CD5 positivo	1	0	1	1 MO
Linfoma da zona marginal	1	2	3	3 MO
Linfoma difuso de grandes células B CD10 positivo	4	2	6	3 Bx, 1 MO, 2 PAAF
Linfoma linfoplasmocítico	3	4	7	1 Bx, 5 MO, 1 SP
Linfoma difuso de grandes células B CD10 negativo	6	1	7	5 Bx, 1 Liq Asc, 1 SP
Linfoma de Burkitt	6	2	8	6 MO, 1 PAAF, 1 Bx
Tricoleucemia	7	1	8	7 MO, 1 SP
Linfoma de células B CD5 negativo CD10 negativo	3	7	10	3 MO, 7 SP
Linfoma de células do manto	10	5	15	1 Bx, 1 Liq Asc, 8 MO, 5 SP
Linfoma folicular	4	12	16	4 Bx, 7 MO, 3 SP, 2 PAAF
Leucemia linfoblástica aguda B	10	7	17	12 MO, 5 SP
Mieloma múltiplo	23	11	34	34 MO
Leucemia linfocítica crônica	33	27	60	6 Bx, 9 MO, 1 PAAF, 44 SP

Nota: LCM: Linfoma de células do Manto; LZME: Linfoma da Zona Marginal Esplênica; M: Masculino; F: Feminino; SP: Sangue Periférico; MO: Medula Óssea; Bx: Biópsia; PAAF: Punção Aspirativa por Agulha Fina; Liq Asc: Líquido Ascítico.

Do total de casos, 11 não foram classificados em nenhum subtipo de neoplasia de células B maduras, um caso de linfoma de células B CD5 positivo CD10 negativo e 10 casos de Linfomas de células B CD5 negativo CD10 negativo. O caso CD5 positivo CD10 negativo tratava-se de uma amostra de MO com 28% de células B maduras e monoclonais (sIgKappa positivo), cujo fenótipo era semelhante ao observado em uma amostra de SP, coletada no mês anterior. O escore de Matutes para LLC foi igual a dois: CD5 positivo (um ponto) e sIgM negativo (um ponto); CD23 negativo e CD79B positivo não somaram pontos. De acordo com Sandes e colaboradores (2015), o escore de Matutes inferior a quatro associado à expressão fraca ou negativa de CD23 e positividade para CD200 sugere o diagnóstico diferencial entre LLC atípica, leucemia prolinfocítica e outros linfomas. A IFM das células patológicas com os marcadores presentes no painel Euroflow foi comparada com a IFM obtida com amostras das seguintes neoplasias: linfoma de Burkitt, LGDCB, linfoma folicular, linfoma linfoplasmácítico, linfoma de células do manto, linfoma da zona marginal, LLC e tricoleucemia. De acordo com os resultados, 10 dos 17 marcadores analisados sugerem o diagnóstico diferencial entre LLC e linfoma de células do manto.

Os 10 casos de linfomas de células B CD5 negativo CD10 negativo compreendem um grupo imunofenotípico que até os dias de hoje continuam sendo um desafio para o diagnóstico. Embora, de acordo com a literatura, a maioria dos casos sejam referentes a linfoma linfoplasmocítico ou linfoma da zona marginal o diagnóstico correto só pode ser determinado se for realizada a análise do linfonodo ou outra biópsia tecidual, no entanto, isso nem sempre é viável ou necessário clinicamente (HANSON; MORICE, 2008). No presente estudo, não foram coletadas biópsias de tecidos linfoides para a avaliação histopatológica nesses pacientes. Os diagnósticos mais prováveis desse grupo são linfoma da zona marginal ou LDGCB, pois a maioria desses pacientes apresentou o seguinte fenótipo: negatividade para CD5, CD10, CD23, CD11c, CD43, positividade forte para CD20 e pontuação no escore de Matutes entre 0 e 2.

A dificuldade em identificar linfomas de células B CD5 negativo CD10 negativo não ocorreu apenas neste trabalho. Goldaniga e colaboradores (2008) analisaram 56 casos de pacientes com diagnóstico de linfoma com fenótipo CD5 e CD10 negativos de acordo com as características citomorfológicas, achados laboratoriais (como proteínas monoclonais séricas) e aspectos clínicos como a presença de esplenomegalia, desses, somente 49 foram adequadamente classificados.

O restante permaneceu em uma categoria não especificada, como no presente estudo.

No presente estudo, obteve-se seis casos de LLC atípica com pontuação no escore de Matutes inferior a dois. Todos os casos expressavam CD5 e CD200, no entanto, em um dos casos a expressão para CD23 era negativa. Porém, como foi demonstrado pela imuno-histoquímica ausência da expressão da proteína ciclina D1, foi excluído o diagnóstico de LCM.

Das dez amostras de SP de indivíduos considerados saudáveis, cinco eram do gênero masculino (27 ± 4 anos) e cinco do gênero feminino (31 ± 8 anos), e a porcentagem de células linfoides B variou entre 2,5% e 6,2% ($4,2 \pm 1,2\%$). Das oito amostras de MO de indivíduos sem neoplasias hematológicas, cinco eram do gênero masculino (36 ± 25 anos) e três do gênero feminino (23 ± 5 anos), e a porcentagem de células linfoides B variou entre 1,9% e 18,4% ($7,7 \pm 5,3\%$).

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO CD80 E DO CD86

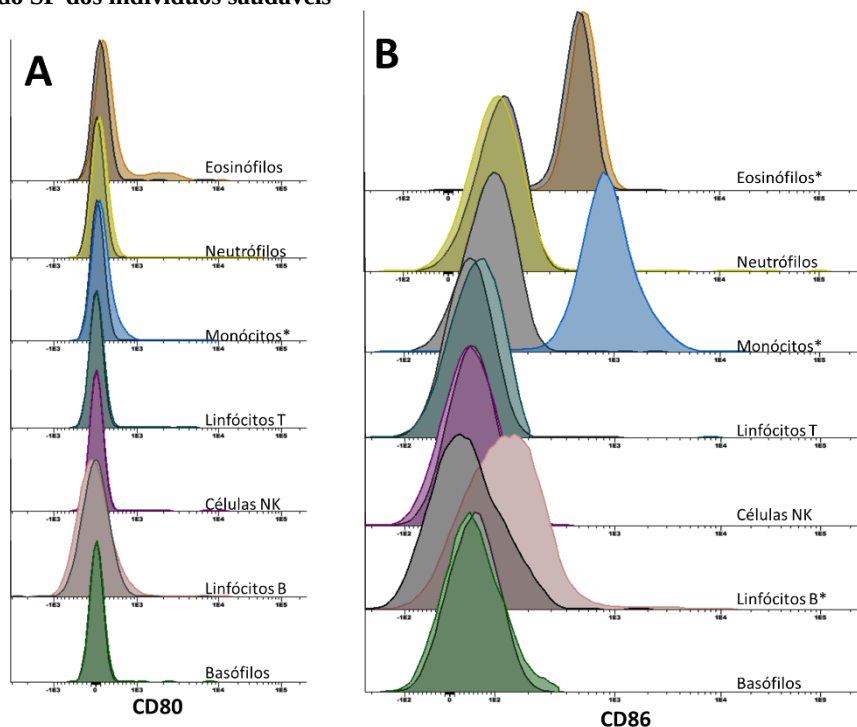
Conforme dados da literatura apresentados anteriormente, observa-se expressão de CD80 e CD86 em células neoplásicas e não neoplásicas. Assim, a expressão desses antígenos foi analisada nas células de SP e MO com ausência de neoplasias hematológicas e posteriormente nas células de pacientes com neoplasias de células B.

5.1.1 Células de sangue periférico de indivíduos saudáveis

Analisou-se o perfil de expressão do CD80 e do CD86 nos eosinófilos, neutrófilos, monócitos, linfócitos (B e T), células NK e basófilos nas amostras de SP de indivíduos considerados saudáveis (controles). A representação gráfica do perfil de expressão nessas células pode ser observada na Figura 12 (A e B) e a média das IFM nos dez indivíduos bem como a significância estatística pode ser observada na Tabela 3. A expressão de todos os marcadores, utilizados neste estudo, foi analisada em células normais e neoplásicas. Em ambos os casos, foi comparada à média das IFM das células não marcadas (controle negativo) com aquela das células marcadas. Embora alguns marcadores em certos tipos celulares apresentassem diferenças estatísticas em relação ao IFM do grupo controle (células não marcadas), essa diferença não foi visualizada nos histogramas. Por exemplo, a expressão do CD86 nos eosinófilos: no histograma a intensidade de expressão coincide com o grupo controle, porém quando

a IFM é avaliada, a mesma é estatisticamente diferente. Porém, na maioria das outras células a expressão dos marcadores a diferença estatística é consistente com os resultados observados nos histogramas.

Figura 12 - Histogramas da caracterização do CD80 e do CD86 nas células do SP dos indivíduos saudáveis



Fonte: A autora, 2017.

Nota: Células marcadas com CD80 e CD86 em cores e células não marcadas (controle negativo) em cinza. Para o CD80 foi realizado Teste t em neutrófilos e linfócitos T e teste Mann-Whitney em linfócitos B, monócitos, eosinófilos, basófilos e células NK. Para o CD86 foi realizado Teste t em monócitos, eosinófilos e neutrófilos e teste Mann-Whitney em linfócitos B, linfócitos T, basófilos e células NK. * $p < 0,05$

Como pode ser observado Tabela 3, de todas as células do SP analisadas, somente os monócitos apresentaram expressão de CD80, porém ao analisar o histograma (Figura 12-A) não foi possível considerar os monócitos como células positivas para o CD80.

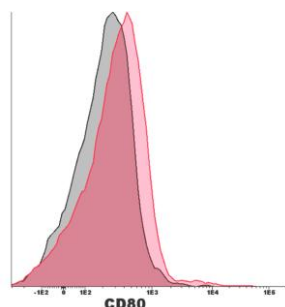
Tabela 3 - Médias das IFM das células não marcadas e das células B marcadas com CD80 e do CD86 nos diferentes tipos celulares do SP dos indivíduos saudáveis

Tipo Celular	Média da IFM		p	Média da IFM		p
	CNM	CD80		CNM	CD86	
Eosinófilos	3	4	0,393	523	602	0,016*
Neutrófilos	55	57	0,565	121	113	0,517
Monócitos	36	132	<0,001*	94	1046	<0,0001*
Basófilos	1	1	0,853	57	53	0,353
Linfócitos B	12	16	0,481	37	168	<0,0001*
Linfócitos T	25	26	0,674	43	43	0,739
Células NK	4	4	0,247	47	45	0,912

Nota: IFM: Intensidade de fluorescência média; CNM: células não marcadas; *
p < 0,05

De acordo com a literatura, o CD80 é expresso em monócitos ativados (VASILEVKO et al., 2002). Dessa forma, realizou-se a ativação dos monócitos com fitohemaglutinina e observou-se fraca expressão (-/ positivo) de CD80 validando-se assim o uso desse anticorpo nesta pesquisa (Figura 13).

Figura 13- Expressão de CD80 em monócitos sem e com ativação com fitohemaglutinina



Fonte: A autora, 2017

Nota: em preto monócitos não ativados, em vermelho monócitos ativados com fitohemaglutinina

Os resultados demonstrados na Figura 12-B mostram que os eosinófilos, monócitos e linfócitos B do SP de indivíduos considerados saudáveis expressam CD86. Esses resultados vão ao encontro daqueles

descritos na literatura, onde está demonstrado que o CD86 é expresso constitutivamente em monócitos (VASILEVKO et al., 2002) e em células B do centro germinal e B maduras (LLINÀS et al., 2011). Apesar de apresentar diferença estatística, não é possível observar expressão para os eosinófilos nas amostras de SP dos indivíduos saudáveis.

5.1.2 Células de medula óssea de indivíduos sem neoplasias hematológicas

A expressão do CD86 foi analisada nos plasmócitos, eosinófilos, monócitos, linfócitos (B e T/NK) e células da série neutrofílica nas amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias hematológicas. A representação gráfica do perfil de expressão nessas células pode ser observada na Figura 14 e a média das IFM da expressão do CD86 nas células dos oito indivíduos bem como a significância estatística, pode ser observada na Tabela 4.

Tabela 4 - Médias das IFM do CD86 nas amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias hematológicas nos diferentes tipos celulares

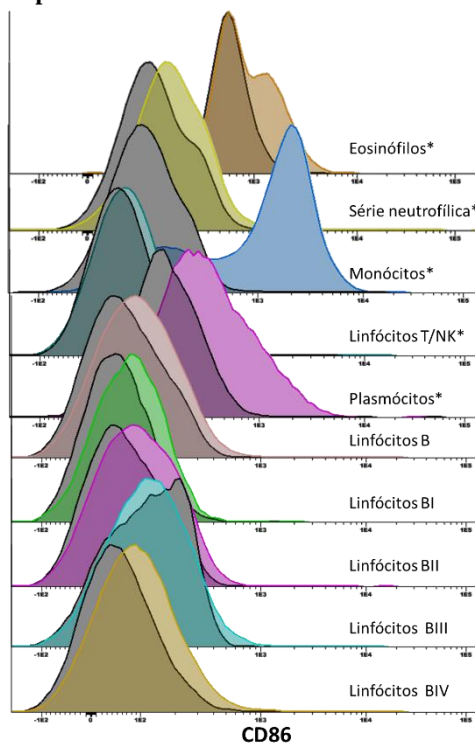
Tipo Celular	Média da IFM		p
	CNM	CD86	
Eosinófilos	580	1136	0,038*
Série Neutrofílica	166	242	0,038*
Monócitos	135	1598	<0,0001*
Plasmócitos	228	597	<0,0001*
Linfócitos B	87	131	0,208
Linfócitos BI	54	84	0,096
Linfócitos BII	86	122	0,310
Linfócitos BIII	97	148	0,111
Linfócitos BIV	100	177	0,161
Linfócitos T/NK	51	84	0,010*

Nota: IFM: Intensidade de fluorescência média; CNM: células não marcadas; *
p < 0,05

Na análise dos histogramas (Figura 14) e da IFM (Tabela 4), foi possível observar que os monócitos expressam CD86 com intensidade moderada. Esses resultados corroboram com o relatado na literatura (VASILEVKO et al., 2002). Além disso, pode-se verificar que os plasmócitos também expressam CD86, porém de forma fraca, e nos eosinófilos a expressão é parcial. Além disso, foi possível observar

positividade muito fraca nos estágios BI, BII e BIV não sendo significativa (Figura 14). Não foram encontrados estudos que avaliaram a expressão nos estágios de maturação das células B para efeitos de comparação.

Figura 14 - Histogramas da caracterização do CD86 nas células de MO dos indivíduos sem neoplasias



Fonte: A autora, 2017.

Nota: Células marcadas com CD86 em cores e células não marcadas (controle negativo) em cinza. Teste t (eosinófilos, linfócitos B, linfócitos BI, BII e BIII) e Mann-Whitney (série neutrofílica, monócitos, linfócitos T/NK, plasmócitos e linfócitos BIV). * $p < 0,05$

5.1.2 Células de pacientes com neoplasias hematológicas

A análise do CD80 e do CD86 foi realizada em células de 147 pacientes com neoplasia de células B (Tabela 5), dos quais 63 (42,8%) eram do gênero feminino (60 ± 20 anos) e 84 (57,2%) do gênero

masculino (58 ± 18 anos). Com relação ao tipo de amostra, uma era biópsia de boca (palato), uma biópsia ocular (órbita), um líquido ascítico, um aspirado de mandíbula, dois aspirados de linfonodo, 15 biópsias de linfonodo, 50 SP e 76 aspirados de MO.

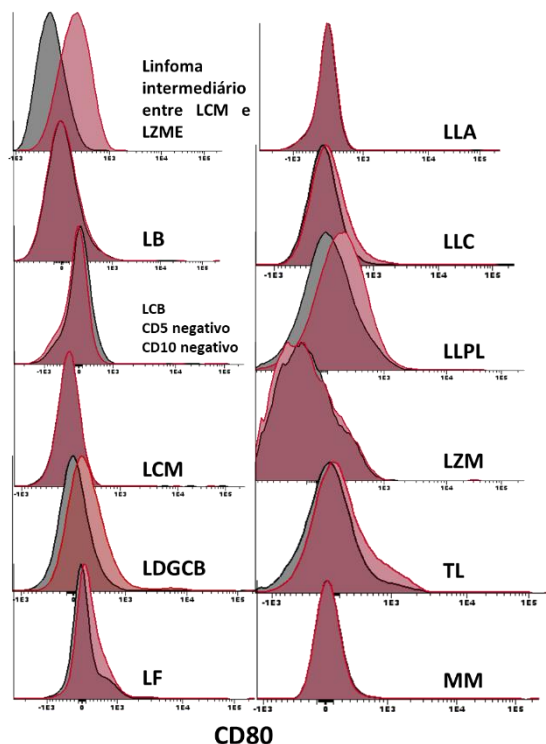
Tabela 5 - Número de casos de cada neoplasia para o CD80 e para o CD86.

Neoplasia	Número de casos
Linfoma com características intermediárias entre LCM e LZME	1
Linfoma difuso de grandes células B CD5 positivo	1
Linfoma de células B CD5 positivo CD10 negativo	1
Linfoma da zona marginal	2
Linfoma linfoplasmocítico	4
Linfoma difuso de grandes células B CD10 positivo	4
Linfoma difuso de grandes células B CD10 negativo	5
Linfoma de Burkitt	5
Linfoma de células B CD5 negativo CD10 negativo	6
Tricoleucemia	6
Linfoma de células do manto	10
Leucemia linfoblástica aguda B	13
Linfoma folicular	13
Mieloma múltiplo	26
Leucemia linfocítica crônica	47

Nota: LCM: linfoma de células do manto; LZME: linfoma da zona marginal esplênica.

Como pode ser visualizado na Figura 15, a expressão de CD80 é fraca nas células B do paciente com diagnóstico de linfoma de células B com características intermediárias entre LCM e LZME e muito fraca nos grupos LDGCB e LLPL. A expressão desse marcador não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos ($p = 0,247$). Na análise da Figura 16 é possível observar uma heterogeneidade de expressão do CD80 principalmente nos pacientes com LDGCB, nos quais a intensidade de expressão variou de fraca a forte (IFM variou de 0 a 2214). A expressão de CD80 nas amostras dos pacientes com LF variou de negativa a positiva com fraca intensidade (IFM entre 0 e 381), já nas amostras de LLC a IFM variou entre 0 e 880 e nas amostras de TL variou entre 0 e 752.

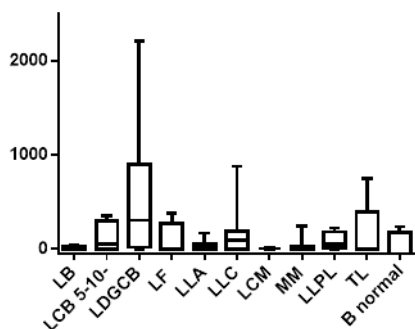
Figura 15 - Histogramas representativos da comparação da expressão entre as células não marcadas e as células dos pacientes com neoplasias de células B no marcador CD80.



Fonte: A autora, 2017.

Nota: Em cinza células não marcadas; em vermelho, células B neoplásicas: LB: Linfoma de Burkitt; LCB: Linfoma de Células B; LCM: Linfoma de células do manto; LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B; LF: Linfoma folicular; LLA: Leucemia linfoblástica aguda; LLC: Leucemia linfocítica crônica; LLPL: linfoma linfoplasmocítico; LZME: linfoma da zona marginal esplênica; LZM: linfoma da zona marginal; TL: tricoleucemia; MM: Mieloma Múltiplo.

Figura 16 - Comparação da expressão de CD80 entre as diferentes neoplasias avaliadas no estudo



Fonte: A autora, 2017.

Nota: LB: Linfoma de Burkitt; LCB: Linfoma de Células B CD5 negativo CD10 negativo; LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B; LF: Linfoma folicular; LLA: Leucemia linfoblástica aguda; LLC: Leucemia linfocítica crônica; LCM: Linfoma de células do manto; MM: Mieloma Múltiplo; LLPL: linfoma linfoplasmocítico; TL: tricoleucemia.

Dorfman e colaboradores (1997) demonstraram que todas as células neoplásicas dos linfomas B do centro germinal, incluindo LF e LDGCB, expressam CD80, embora com fraca intensidade. No entanto, naquele foi observado uma discrepância entre os resultados obtidos da CF com a imuno-histoquímica ou imuno-citoquímica. Na época, concluiu-se que, devido a diferença de sensibilidade, a expressão de CD80 não podia ser detectada por citometria de fluxo, tanto por protocolos de marcação direta quanto indireta. Além disso, foi observado que o CD86 foi expresso em uma pequena porção de casos de linfoma analisados (6 em 20 casos). Diferente do que foi descrito por Dorfman e colaboradores (1997), neste estudo, pode-se observar a expressão de CD80, embora fraca, nas células neoplásicas dos casos de LDGCB por CF.

O estudo de Dogan e colaboradores (1998) evidenciou por imuno-histoquímica, positividade para CD80 em células de pacientes com LF, embora a expressão tenha sido fraca. A desregulação da expressão CD80 nas células neoplásicas foi referenciada como um possível mecanismo desenvolvido pelas células do linfoma folicular para escapar da vigilância imunológica (DOGAN et al., 1998).

Anos depois, com o aprimoramento da citometria de fluxo, no estudo realizado por Dakappagari e colaboradores (2012) foi possível

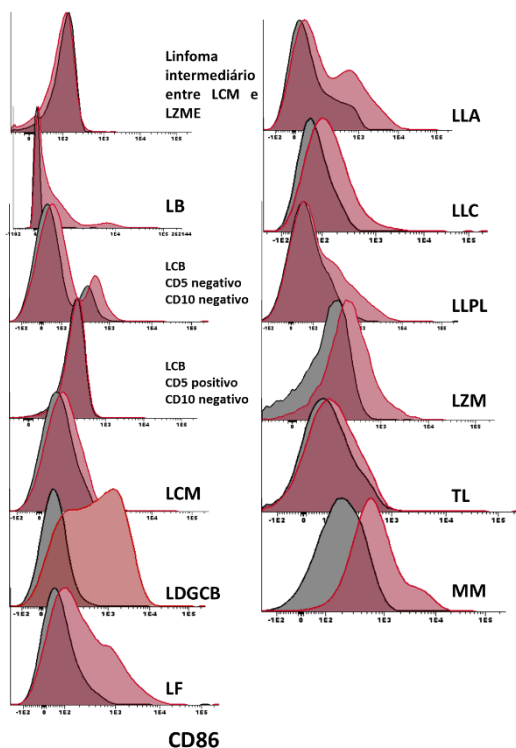
observar a expressão do CD80 em células B patológicas provenientes de biópsias de pacientes com diagnóstico de NCBM. Nesse estudo, o CD80 foi expresso em 97% dos casos de LF, 91% de LZM, 90% de LDGCB, 75% de LCM e 43% de LLC/LLPC.

O estudo de Faure e colaboradores (2011) analisou por CF a expressão do CD80 em 46 casos de LLA-B e encontrou expressão fraca desse marcador em apenas um dos casos (FAURE et al., 2011). No presente estudo, não foi observada positividade para o CD80 em nenhum dos casos de LLA avaliados.

Com relação ao CD86, a análise dos histogramas (Figura 17) demonstrou expressão heterogênea para as células neoplásicas dos pacientes com LDGCB e LF, as quais variaram de negativa a positiva com moderada intensidade. Já para os pacientes com LB, LLA, LLC, LLPL, LZM e MM observou-se fraca (-/ positivo) intensidade de expressão. A avaliação estatística com o teste Kruskal-Wallis mostrou significância ($p < 0,0001$) entre os grupos de neoplasias avaliados. As diferenças foram observadas entre TL e MM ($p = 0,043$), LCM e MM ($p = 0,018$) e LCB, CD10 negativo e MM ($p = 0,038$) e LLC e MM ($p = 0,001$). Entretanto, MM acordo com o Quadro 4, não há necessidade de diagnóstico diferencial entre

Na Figura 18, é possível observar a heterogeneidade de expressão principalmente nos grupos LB, LDGCB e MM nos quais a IFM variou de 53 a 5870, de 10 a 4199 e de 88 a 4271, respectivamente.

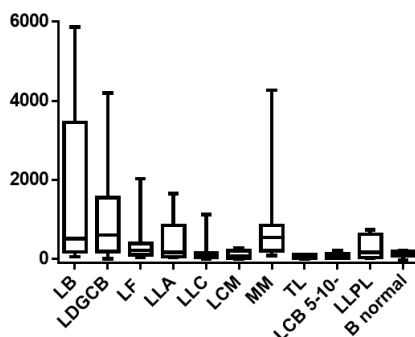
Figura 17 - Histogramas representativos da comparação da expressão entre as células não marcadas e as células dos pacientes com neoplasias de células B no marcador CD86.



Fonte: A autora, 2017.

Nota: Em cinza células não marcadas; em vermelho, células B neoplásicas: LB: Linfoma de Burkitt; LCB: Linfoma de Células B; LCM: Linfoma de células do manto; LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B; LF: Linfoma folicular; LLA: Leucemia linfoblástica aguda; LLC: Leucemia linfocítica crônica; LLPL: linfoma linfoplasmocítico; LZME: linfoma da zona marginal esplênica; LZM: linfoma da zona marginal; TL: tricoleucemia; MM: Mieloma Múltiplo.

Figura 18 - Comparação da expressão de CD86 entre as diferentes neoplasias avaliadas no estudo



Fonte: A autora, 2017.

Nota: LB: Linfoma de Burkitt; LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B; LF: Linfoma folicular; LLA: Leucemia linfoblástica aguda; LLC: Leucemia linfocítica crônica; LCM: Linfoma de células do manto; MM: Mieloma Múltiplo; TL: tricoleucemia; LCB: Linfoma de Células B CD5 negativo CD10 negativo; LLPL: linfoma linfoplasmocítico.

Em 1993, Ranheim e Kipps demonstraram que a expressão de CD86 por CF em células de LLC é de fraca intensidade (RANHEIM; KIPPS, 1993), o que corrobora os dados do presente estudo.

Em 1997, Dorfman e colaboradores demonstraram que todos os linfomas B do centro germinal incluindo LF e LDGCB expressam CD86, embora com fraca intensidade corroborando os dados visualizados no presente estudo, nos quais os linfomas do centro germinativo (LB, LDGCB e LF) também expressaram CD86.

O estudo de Dogan e colaboradores (1998) evidenciou por imuno-histoquímica, positividade para CD86 em células de pacientes com LF, embora a expressão tenha sido fraca. Semelhante ao observado no CD80, a desregulação da expressão do CD86 nas células neoplásicas pode ser o mecanismo pelo qual as células do LF escapam da vigilância imunológica (DOGAN et al., 1998).

No estudo de Chaperot e colaboradores (1999) foram analisadas a expressão de CD80 e CD86 nas células patológicas em casos de linfomas de células B por citometria de fluxo, e não foi observado a expressão dos dois marcadores em 29% dos casos, a expressão de

apenas CD86 em 26% dos casos, a expressão de CD80 foi observada em apenas 16% dos casos e a co-expressão de ambas as moléculas em 30% dos casos (CHAPEROT et al., 1999).

O estudo de Pope e colaboradores (2000) evidenciou por citometria de fluxo a expressão heterogênea de CD86 em células plasmocitárias de pacientes com MM, onde 54% dos pacientes expressavam o marcador ao diagnóstico (POPE et al., 2000).

O estudo de Faure e colaboradores (2011) analisou por citometria de fluxo a expressão do CD86 em 46 casos de LLA-B e observou a expressão em 22 casos. Desses, seis casos com forte expressão (FAURE et al., 2011). No presente estudo, observou-se expressão de CD86 em nove casos, dos quais cinco apresentaram expressão fraca (-/+) e quatro apresentaram intensidade moderada (+).

Assim, apesar do CD80 e do CD86 serem expressos em alguns tipos de NCBM, esses marcadores não são úteis para o diagnóstico diferencial de neoplasias com sobreposição fenotípica.

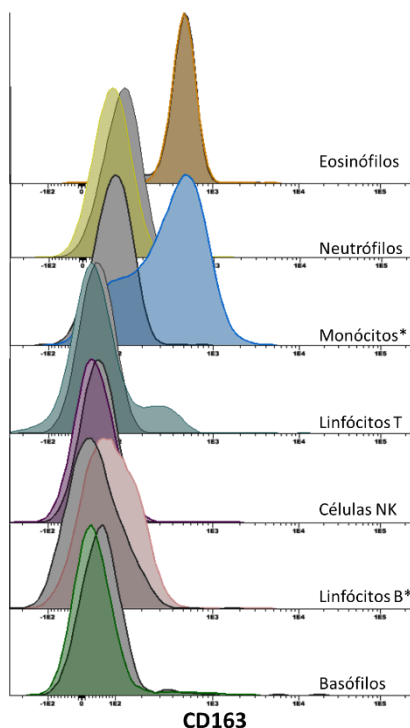
5.3 CARACTERIZAÇÃO DO CD163

Conforme abordado anteriormente, os dados da literatura sugerem que a expressão do CD163 está restrita a células da linhagem monocítica (BUECHLER et al., 2000). No entanto, como havia esse AcMo disponível no laboratório, buscou-se a expressão nas células B demonstrando infidelidade de linhagem nas células neoplásicas. Assim, na sequência, encontra-se a avaliação desse marcador em células de SP e MO com ausência de neoplasias hematológicas e nas células dos pacientes com neoplasias de células B.

5.3.1 Células de sangue periférico de indivíduos saudáveis

Como pode ser observado na Figura 19 e na Tabela 6, dentre todas as células analisadas nas amostras de SP dos indivíduos considerados saudáveis, apenas os monócitos e os linfócitos B apresentaram expressão moderada e fraca, respectivamente, ambos com significância estatística em relação as células não marcadas. Os neutrófilos apresentaram diferenças estatísticas, no entanto, a IFM foi maior nas células não marcadas quando comparado com as células marcadas, não sendo dessa forma relevante.

Figura 19 - Histogramas da caracterização do CD163 nas células do SP dos indivíduos saudáveis



Fonte: A autora, 2017.

Nota: células marcadas com CD163 em cores e células não marcadas (controle negativo) em cinza. * $p < 0,05$ - Teste t (monócitos e eosinófilos) e Mann-Whitney (linfócitos B, linfócitos T, neutrófilos, basófilos e células NK).

Os resultados apresentados divergem com os dados da literatura que apontam que apenas as células da linhagem monocítica (monócitos/macrófagos) expressam CD163 (BUECHLER et al., 2000). Como as células B normais expressaram CD163, levantou-se a hipótese de que as células B neoplásicas de NCBM poderiam expressar CD163. Para responder esse questionamento, avaliou-se a expressão desse marcador nas células B de indivíduos com neoplasias hematológicas e nas células B imaturas da MO, como descrito a seguir.

Tabela 6 - Médias das IFM das células não marcadas e das células B marcadas com CD163 nos diferentes tipos celulares do SP dos indivíduos saudáveis

Tipo Celular	Média da IFM		P
	CNM	CD163	
Eosinófilos	523	557	0,266
Neutrófilos	121	88	0,019*
Monócitos	94	456	<0,0001*
Basófilos	57	50	0,165
Linfócitos B	37	95	0,011*
Linfócitos T	43	73	0,315
Células NK	47	38	0,315

Nota: IFM: Intensidade de fluorescência média; CNM: células não marcadas; *
p < 0,05

5.3.2 Células de medula óssea de indivíduos sem neoplasias hematológicas

Como demonstrado na Tabela 7, apenas os monócitos e os linfócitos T/NK apresentaram expressão de CD163 de forma significativa. No entanto, conforme demonstrado na Figura 20, pode-se considerar apenas os monócitos como positivos para esse marcador. A expressão nos monócitos foi heterogênea devendo ser investigada se a diferença é em relação ao estágio de maturação podendo ser mais expresso em monócitos maduros e menos expresso nos imaturos.

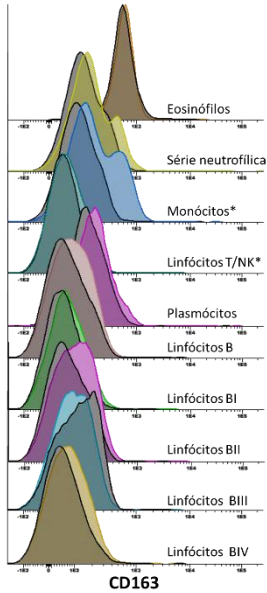
Nas amostras de MO as células linfoides B imaturas não expressaram CD163 de forma significativa, essa expressão fica reservada para as células B maduras do SP (Figura 19). As células linfoides B derivam de uma célula progenitora hematopoiética na MO (BONILLA; OETTGEN, 2010; MESQUITA JÚNIOR et al., 2010) e permanecem nesse local até o estágio de célula B virgem. Nesse estágio, essas células entram na circulação sanguínea e migram para os órgãos linfoides secundários (linfonodos, tecidos linfoides associados à mucosa e baço), nos quais ocorre a diferenciação em células B de memória ou efetora (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010; PEREZ-ANDRES et al., 2010). Essas informações sugerem que a expressão de CD163 nas células B pode estar relacionada com a maturação nos órgãos linfoides secundários ou com o contato com algum antígeno durante sua migração da MO para esses órgãos.

Tabela 7 - Médias das IFM do CD163 nas amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias hematológicas nos diferentes tipos celulares

Tipo Celular	Média da IFM		p
	CNM	CD163	
Eosinófilos	580	1462	0,065
Série Neutrofílica	166	219	0,369
Monócitos	135	569	0,002*
Plasmócitos	229	351	0,161
Linfócitos B	87	108	0,526
Linfócitos BI	54	80	0,252
Linfócitos BII	86	115	0,396
Linfócitos BIII	97	107	0,746
Linfócitos BIV	100	121	0,644
Linfócitos T/NK	51	173	0,038*

Nota: IFM: Intensidade de fluorescência média; CNM: células não marcadas; *
p < 0,05

Figura 20 - Histogramas da caracterização do CD163 nas células de MO dos indivíduos sem neoplasias



Fonte: A autora, 2017.

Nota: Células marcadas com CD163 em cores e células não marcadas (controle negativo) em cinza. Teste t (série neutrofílica, linfócitos B, linfócitos T/NK, linfócitos BI, BII, BIII e BIV) e Mann-Whitney (eosinófilos, monócitos e plasmócitos). * p < 0,05

5.3.3 Células de pacientes com neoplasias hematológicas

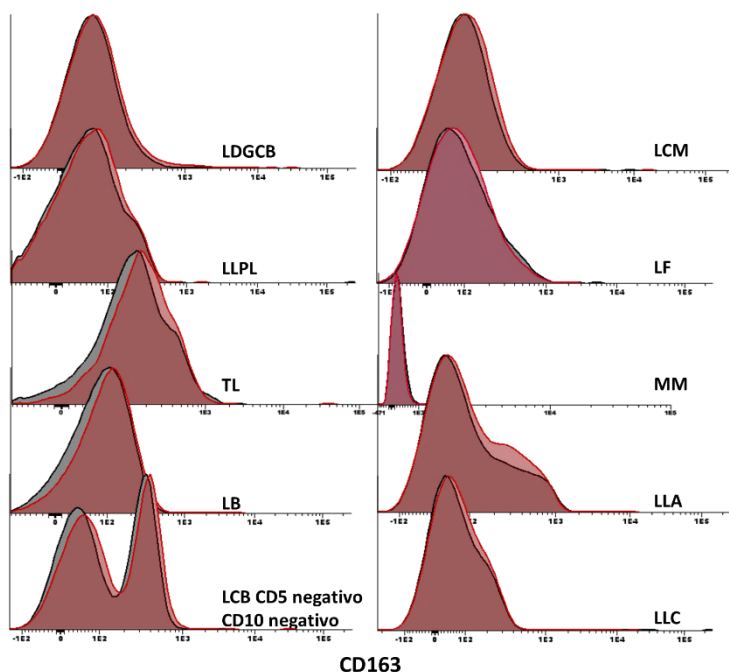
A análise do CD163 foi realizada em células de 83 pacientes com neoplasia de células B (Tabela 8), dos quais 36 (43,4%) eram do gênero feminino (62 ± 20 anos) e 47 (56,6%) do gênero masculino (56 ± 19 anos). Com relação ao tipo de amostra, uma era biópsia de boca (palato), um aspirado de mandíbula, dois aspirados de linfonodo, sete biópsias de linfonodo, 36 SP e 36 aspirados de MO.

Tabela 8 - Número de casos de cada neoplasia para o CD163.

Neoplasia	Número de casos
Linfoma difuso de grandes células B CD5 positivo	1
Linfoma linfoplasmocítico	2
Linfoma difuso de grandes células B CD10 positivo	2
Linfoma difuso de grandes células B CD10 negativo	2
Tricoleucemia	2
Linfoma de Burkitt	3
Linfoma de células B CD5 negativo CD10 negativo	3
Linfoma de células do manto	6
Linfoma folicular	7
Leucemia linfoblástica aguda B	13
Mieloma múltiplo	10
Leucemia linfocítica crônica	32

Na Figura 21, não é possível observar diferenças entre as células marcadas com CD163 (em vermelho) em relação as células não marcadas (em cinza) entre nenhum grupo de neoplasias. No entanto, na avaliação da IFM, verificou-se que as células dos pacientes com LCM expressam esse marcador de forma heterogênea (Figura 23). A análise estatística demonstrou diferenças entre os grupos de neoplasias de células B referentes a expressão de CD163 (Kruskal-Wallis, $p = 0,001$). No pós-teste de Dunn-Bonferroni foi verificada a presença de diferença significativa entre os grupos LCM (IFM de 1 a 27) e MM (IFM de 0 a 3) ($p = 0,007$). No entanto, conforme Quadro 4, não há necessidade de realizar o diagnóstico diferencial essas neoplasias, pois seus fenótipos são muito distintos.

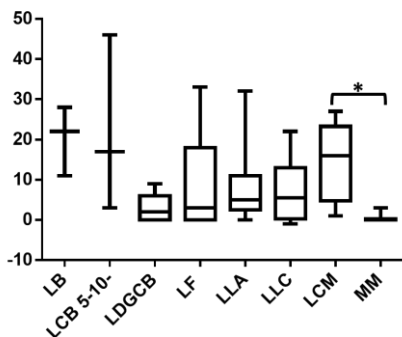
Figura 21 - Histogramas representativos da comparação da expressão entre as células não marcadas e as células dos pacientes com neoplasias de células B no marcador CD163.



Fonte: A autora, 2017.

Nota: Em cinza células não marcadas; em vermelho, células B neoplásicas: LB: Linfoma de Burkitt; LCB: Linfoma de Células B; LCM: Linfoma de células do manto; LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B; LF: Linfoma folicular; LLA: Leucemia linfoblástica aguda; LLC: Leucemia linfocítica crônica; LLPL: linfoma linfoplasmocítico; TL: tricoleucemia; MM: Mieloma Múltiplo.

Figura 22 - Comparação da expressão de CD163 entre as diferentes neoplasias avaliadas no estudo com as células B dos indivíduos saudáveis (controle negativo)



Fonte: A autora, 2017.

Nota: LB: Linfoma de Burkitt; LCB: Linfoma de Células B CD5 negativo CD10 negativo; LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B; LF: Linfoma folicular; LLA: Leucemia linfoblástica aguda; LLC: Leucemia linfocítica crônica; LCM: Linfoma de células do manto; MM: Mieloma Múltiplo.

Poucos estudos foram realizados avaliando-se o CD163 em NCBM. No estudo realizado por Nguyen e colaboradores (2005) a expressão do CD163 foi avaliada por imunohistoquímica em 1105 amostras de neoplasias e em tecidos normais e não foi observada expressão nas células dos pacientes com linfomas (NGUYEN et al., 2005). Outros estudos avaliaram a expressão do CD163 por imunohistoquímica em amostras de pacientes com LDGCB, no entanto, não foi avaliada a expressão nas células B neoplásicas, mas sim nos macrófagos presentes nas amostras (BOHN et al, 2012; ZENG et al, 2015). No presente estudo, também não foi observada a expressão de CD163 significativa nas células B neoplásicas dos pacientes com NCBM que possa ter valor diagnóstico (Figura 21).

5.4 CARACTERIZAÇÃO DO CD210a

Como mencionado anteriormente, o CD210a participa das respostas imunológicas, as quais envolvem as células B. Nesse sentido foi avaliado a expressão desse marcador em células de SP e MO com ausência de neoplasias hematológicas e nas células dos pacientes com neoplasias de células B.

5.4.1 Células de sangue periférico de indivíduos saudáveis

Como pode ser observado na Tabela 9 e Figura 23 , todas as células das amostras de SP dos indivíduos consideráveis saudáveis expressam CD210a, com significância estatística. Pode-se observar pela IFM, que os monócitos, os linfócitos T e as células NK apresentam expressão moderada desse marcador, já os neutrófilos, os linfócitos B e os basófilos apresentam expressão fraca.

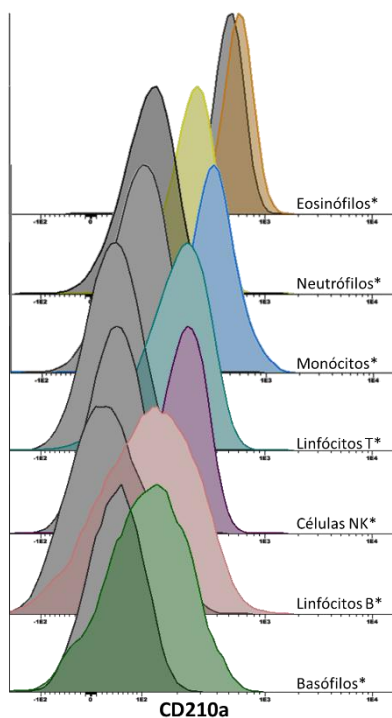
Os resultados do presente trabalho são semelhantes aos descritos por Matesanz-Isabel e colaboradores (2011), que demonstraram a expressão de CD210a na maioria das células hematopoiéticas, especificamente em monócitos, nas células dendríticas monocitoides e nos linfócitos T e B (pró-B, pré-B, imaturas, maduras, centro germinal e de memória) (MATESANZ-ISABEL et al., 2011). Por outro lado, o estudo de Llinàs e colaboradores (2010) avaliaram a expressão de CD210a apenas nas células B e observaram que apenas as células B do centro germinal expressam o marcador (LLINÀS et al., 2011).

Tabela 9 - Médias das IFM das células não marcadas e das células B marcadas com CD210a nos diferentes tipos celulares do SP dos indivíduos saudáveis

Tipo Celular	Média da IFM		P
	CNM	CD210a	
Eosinófilos	523	673	<0,0001*
Neutrófilos	121	265	<0,0001*
Monócitos	94	394	<0,0001*
Basófilos	57	132	<0,0001*
Linfócitos B	37	140	0,001*
Linfócitos T	43	231	<0,0001*
Células NK	47	237	<0,0001*

Nota: IFM: Intensidade de fluorescência média; CNM: células não marcadas; *
p < 0,05

Figura 23 - Histogramas da caracterização do CD210a nas células do SP dos indivíduos saudáveis



Fonte: A autora, 2016.

Nota: células marcadas com CD210a em cores e células não marcadas (controle negativo) em cinza. Teste t (eosinófilos) e Mann-Whitney (linfócitos B, monócitos, neutrófilos, linfócitos T, basófilos e células NK). * $p < 0,05$.

5.4.2 Células de medula óssea de indivíduos sem neoplasias hematológicas

Na análise dos resultados obtidos da avaliação da expressão do CD210a nas células das amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias hematológicas, pode observar-se que, de forma semelhante ao encontrado no SP, todas as células hematopoiéticas analisadas expressam CD210a com significância estatística (Figura 24 e Tabela 10).

Os resultados apresentados (Figura 24 e Tabela 10) mostram que os monócitos, os neutrófilos e os linfócitos T/NK apresentaram

expressão moderada e os eosinófilos expressão parcial, o que corrobora os dados de Matesanz-Isabel e colaboradores (2011). Também foi observada fraca expressão em células B e plasmócitos. Ao avaliar os estágios de maturação das células B, foi observada fraca intensidade para todos os estágios com exceção do estágio BIII (imaturas) as quais não apresentaram expressão, diferentemente do observado por Matesanz-Isabel e colaboradores (2011) que observaram expressão fraca em todos os estágios maturativos. Após avaliar a expressão de CD210a nas células hematopoiéticas no SP e MO, partiu-se para a etapa de avaliação nas amostras de pacientes com NCBM.

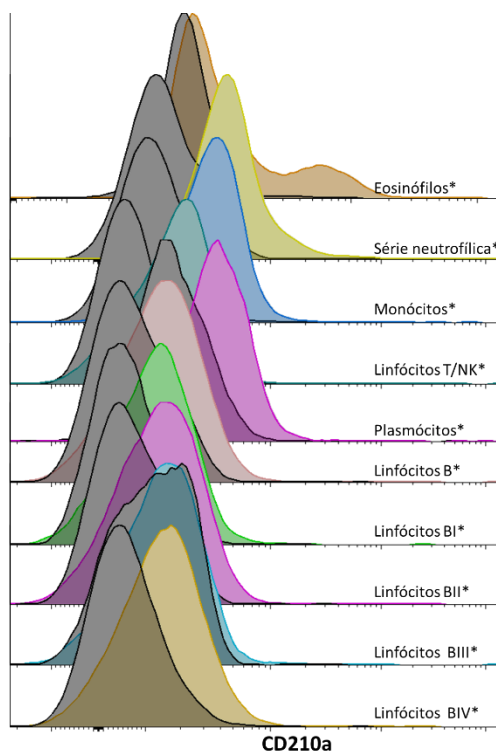
Tabela 10 - Médias das IFM do CD210a nas amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias hematológicas nos diferentes tipos celulares

Tipo Celular	Média da IFM		p
	CNM	CD210a	
Eosinófilos	580	2730	<0,0001*
Série Neutrofílica	166	593	<0,0001*
Monócitos	135	385	<0,0001*
Plasmócitos	229	1221	0,0011*
Linfócitos B	87	227	0,003*
Linfócitos BI	54	395	0,023*
Linfócitos BII	86	295	0,038*
Linfócitos BIII	97	271	0,007*
Linfócitos BIV	100	222	0,032*
Linfócitos T/NK	51	186	<0,0001*

Nota: IFM: Intensidade de fluorescência média; CNM: células não marcadas;

* $p < 0,05$

Figura 24 - Histogramas da caracterização do CD210a nas células de MO dos indivíduos sem neoplasias



Fonte: A autora, 2017.

Nota: Células marcadas com CD210a em cores e células não marcadas (controle negativo) em cinza. Teste t (linfócitos B, linfócitos BI e BIV) e Mann-Whitney (eosinófilos, série neutrofílica, monócitos, plasmócitos, linfócitos T/NK, linfócitos BII e BIII). * $p < 0,05$

5.4.3 Células de pacientes com neoplasias hematológicas

A análise do CD210a foi realizada em células de 150 pacientes com neoplasia de células B (Tabela 11), dos quais 64 (43,2%) eram do gênero feminino (60 ± 18 anos) e 86 (56,8%) do gênero masculino (57 ± 20 anos). Com relação ao tipo de amostra, uma era biópsia de boca (palato), uma biópsia ocular (órbita), dois líquidos ascíticos, um aspirado de mandíbula, dois aspirados de linfonodo, 15 biópsias de linfonodo, 52 SP e 76 aspirados de MO.

Tabela 11 - Número de casos de cada neoplasia para o CD210a.

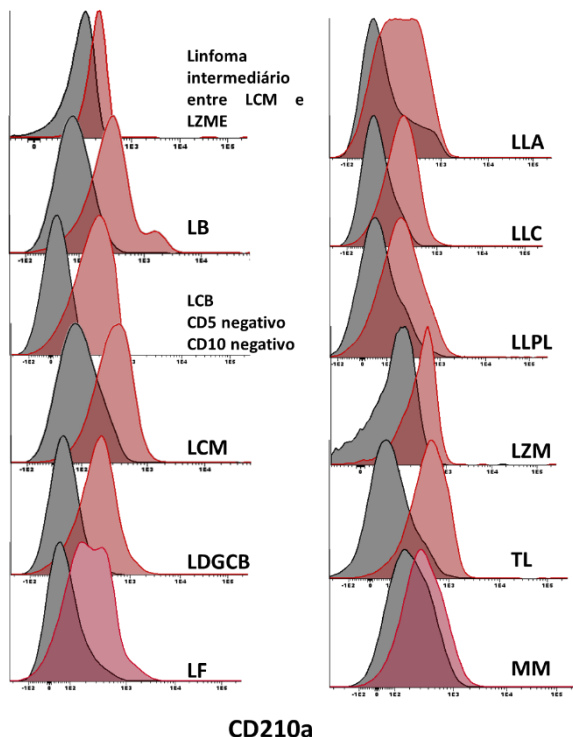
Neoplasia	Número de casos
Linfoma com características intermediárias entre LCM e LZME	1
Linfoma difuso de grandes células B CD5 positivo	1
Linfoma da zona marginal	2
Linfoma linfoplasmocítico	4
Linfoma difuso de grandes células B CD10 positivo	4
Linfoma difuso de grandes células B CD10 negativo	6
Tricoleucemia	6
Linfoma de Burkitt	7
Linfoma de células B CD5 negativo CD10 negativo	7
Linfoma de células do manto	11
Leucemia linfoblástica aguda B	14
Linfoma folicular	14
Mieloma múltiplo	27
Leucemia linfocítica crônica	46

Nota: LCM: linfoma de células do manto; LZME: linfoma da zona marginal esplênica.

De acordo com a Figura 25, as células neoplásicas de todos os grupos de neoplasias de células B apresentaram expressão de CD210a com intensidade variando entre fraca e moderada.

Como pode ser observado na Figura 26, há diferenças significativas de expressão do CD210a entre os grupos de NCBM ($p < 0,0001$). Na análise entre as neoplasias, foi identificado diferenças entre as células neoplásicas dos pacientes com LLA e MM ($p < 0,0001$) e entre as células dos pacientes com LLC e MM ($p < 0,0001$). A variação na IFM das células com MM foi altíssima (de 132 a 13588) enquanto que nos casos de LLA (0 a 606) e LLC (104 a 558) a variação foi baixa. Porém, o diagnóstico diferencial entre MM e LLA é irrelevante, assim como entre MM e LLC (Quadro 4).

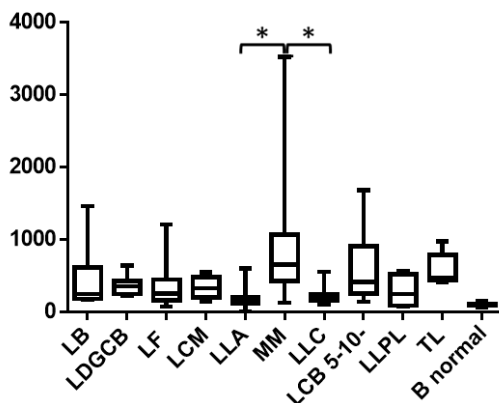
Figura 25 - Histogramas representativos da comparação da expressão entre as células não marcadas e as células dos pacientes com neoplasias de células B no marcador CD210a.



Fonte: A autora, 2017.

Nota: Em cinza células não marcadas; em vermelho, células B neoplásicas: LB: Linfoma de Burkitt; LCB: Linfoma de Células B; LCM: Linfoma de células do manto; LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B; LF: Linfoma folicular; LLA: Leucemia linfoblástica aguda; LLC: Leucemia linfocítica crônica; LLPL: linfoma linfoplasmocítico; TL: tricoleucemia; MM: Mieloma Múltiplo.

Figura 26 - Comparação da expressão de CD210a entre as diferentes neoplasias avaliadas no estudo



Fonte: A autora, 2017.

Nota: LB: Linfoma de Burkitt; LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B; LF: Linfoma folicular; LCM: Linfoma de células do manto; LLA: Leucemia linfoblástica aguda; MM: Mieloma Múltiplo; LLC: Leucemia linfocítica crônica; LCB: Linfoma de Células B CD5 negativo CD10 negativo; LLPL: linfoma linfoplasmocítico; TL: tricoleucemia.

Apenas o estudo de Faure e colaboradores (2011) analisou por CF a expressão do CD210a em 46 casos de LLA-B e encontrou positividade fraca em quatro casos (FAURE et al., 2011). No presente estudo, avaliou-se a expressão do CD210a em 13 casos de LLA-B e observou-se expressão moderada em três casos, fraca em oito e negativa em dois.

Com os dados obtidos no presente estudo verificou-se que o CD210a de fato é expresso nas células hematopoiéticas, inclusive dos linfócitos B, e também está expresso nas NCBM, não sendo útil no diagnóstico diferencial das neoplasias com sobreposição fenotípica.

5.5 CARACTERIZAÇÃO DO CD261

Conforme abordado anteriormente, o CD261 está relacionado a apoptose. Anormalidades na regulação da apoptose podem ser um importante mecanismo de desenvolvimento de neoplasias e dessa forma esses marcadores merecem ser estudados. Abaixo encontra-se a

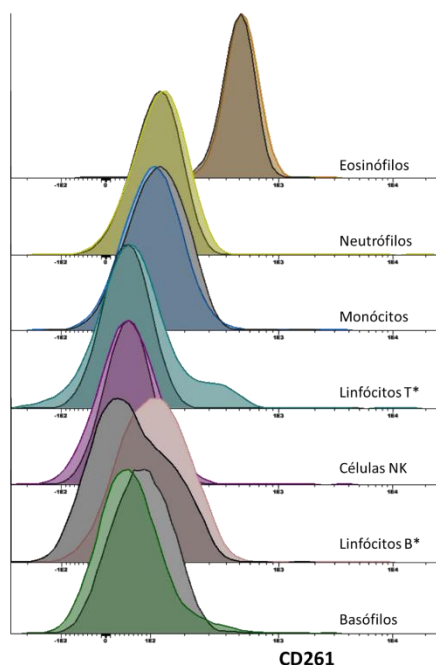
avaliação do CD261 em células de SP e MO com ausência de neoplasias hematológicas e nas células dos pacientes com neoplasias de células B.

5.5.1 Células de sangue periférico de indivíduos saudáveis

Como pode ser observado na

Figura 27 e Tabela 12, apenas os linfócitos T e B das amostras de SP de indivíduos considerados saudáveis apresentaram expressão significativa de CD261, porém com fraca intensidade. Esses resultados são similares ao observados no estudo de Llinàs e colaboradores (2011), onde foi observada expressão de fraca intensidade de CD261 em células B de memória de amígdalas (LLINÀS et al., 2011).

Figura 27 - Histogramas da caracterização do CD261 nas células do SP dos indivíduos saudáveis



Fonte: A autora, 2016.

Nota: células marcadas com CD261 em cores e células não marcadas (controle negativo) em cinza. Teste t (neutrófilos e eosinófilos) e Mann-Whitney (linfócitos B, linfócitos T, monócitos, basófilos e células NK). * $p < 0,05$

Tabela 12 - Médias das IFM das células não marcadas e das células B marcadas com CD261 nos diferentes tipos celulares do SP dos indivíduos saudáveis

Tipo Celular	Média da IFM		p
	CNM	CD261	
Eosinófilos	523	575	0,060
Neutrófilos	121	134	0,585
Monócitos	94	121	0,123
Basófilos	57	84	1,000
Linfócitos B	37	128	0,011*
Linfócitos T	43	99	0,023*
Células NK	47	57	0,481

Nota: IFM: Intensidade de fluorescência média; CNM: células não marcadas; *
 $p < 0,05$

5.5.2 Células de medula óssea de indivíduos sem neoplasias hematológicas

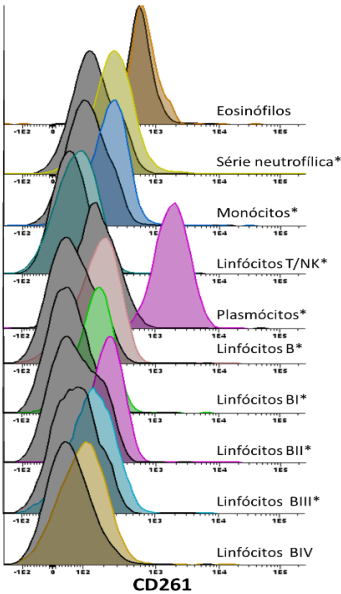
Diferente do que foi observado no SP (Figura 27 e Tabela 12), as células da série neutrofílica, os monócitos e os linfócitos B da MO mostraram expressão fraca de CD261 (Figura 28 e Tabela 13). No entanto, os plasmócitos mostraram expressão moderada e homogênea desse marcador, diferente do observado no estudo de Llinàs e colaboradores (2011) nas quais essas células apresentaram IFM muito baixa, considerada até negativa. Assim, levantou-se a possibilidade das células neoplásicas de NCBM expressarem de forma diferenciada esse marcador. Com relação aos estágios de maturação das células B, foi observada fraca expressão nos estágios BI, BII e BIII.

Tabela 13 - Médias das IFM do CD261 nas amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias hematológicas nos diferentes tipos celulares

Tipo Celular	Média da IFM		p
	CNM	CD261	
Eosinófilos	580	1366	0,059
Série Neutrofílica	166	315	0,005*
Monócitos	135	433	0,003*
Plasmócitos	229	1821	<0,0001*
Linfócitos B	87	194	0,007*
Linfócitos BI	54	176	<0,0001*
Linfócitos BII	86	247	<0,0001*
Linfócitos BIII	97	207	0,004*
Linfócitos BIV	100	164	0,182
Linfócitos T/NK	51	84	0,015*

Nota: IFM: Intensidade de fluorescência média; CNM: células não marcadas; *p < 0,05

Figura 28 - Histogramas da caracterização do CD261 nas células de MO dos indivíduos sem neoplasias



Fonte: A autora, 2017.

Nota: Células marcadas com CD261 em cores e células não marcadas (controle negativo) em cinza. Teste t (eosinófilos, plasmócitos, linfócitos BI, BII e BIII) e Mann-Whitney (série neutrofílica, monócitos, linfócitos B, linfócitos BII e linfócitos T/NK). * p < 0,05

5.5.3 Células de pacientes com neoplasias hematológicas

A análise do CD261 foi realizada em células de 161 pacientes com neoplasia de células B (Tabela 14), dos quais 67 (41,6%) eram do gênero feminino (60 ± 19 anos) e 94 (58,4%) do gênero masculino (58 ± 18 anos). Com relação ao tipo de amostra, uma era biópsia de boca (palato), uma biópsia ocular (órbita), um líquido ascítico, um aspirado de mandíbula, dois aspirados de linfonodo, 14 biópsias de linfonodo, 61 SP e 80 aspirados de MO.

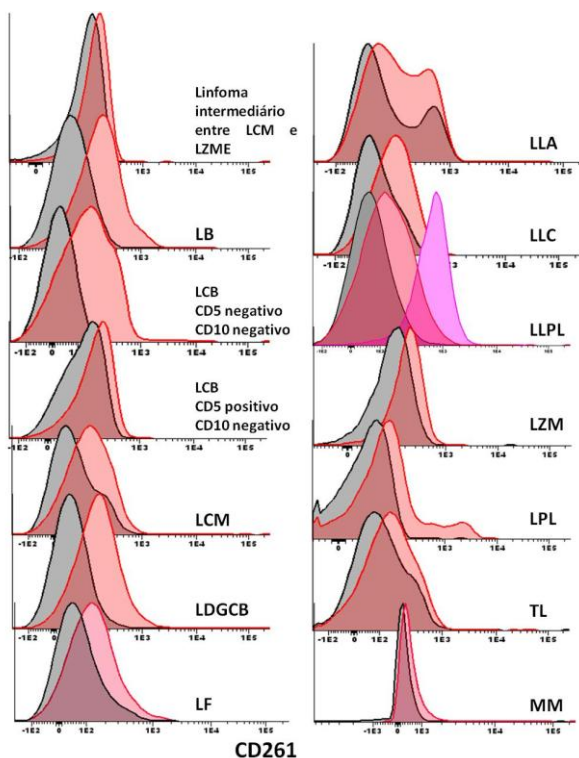
Tabela 14 - Número de casos de cada neoplasia para o CD261.

Neoplasia	Número de casos
Linfoma com características intermediárias entre LCM e LZME	1
Leucemia prolinfocítica	1
Linfoma difuso de grandes células B CD5 positivo	1
Linfoma de células B CD5 positivo CD10 negativo	2
Linfoma da zona marginal	2
Linfoma difuso de grandes células B CD10 positivo	3
Linfoma linfoplasmocítico	5
Linfoma difuso de grandes células B CD10 negativo	5
Linfoma de Burkitt	6
Linfoma de células B CD5 negativo CD10 negativo	7
Tricoleucemia	7
Linfoma de células do manto	13
Linfoma folicular	13
Leucemia linfoblástica aguda B	15
Mieloma múltiplo	29
Leucemia linfocítica crônica	51

Nota: LCM: linfoma de células do manto; LZME: linfoma da zona marginal esplênica.

Como mostra Figura 29, houve expressão fraca de CD261 nas células neoplásicas dos pacientes com LB, LCB CD10 negativo CD10 negativo, LDGCB, LF e LLC e expressão heterogênea variando de negativa a moderada nos casos de LLPL. Curiosamente, o CD261 não apresenta expressão em plasmócitos clonais no MM e é expresso de forma moderada pelos plasmócitos em amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias hematológicas (Figura 28).

Figura 29 - Histogramas representativos da comparação da expressão entre as células não marcadas e as células dos pacientes com neoplasias de células B no marcador CD261.



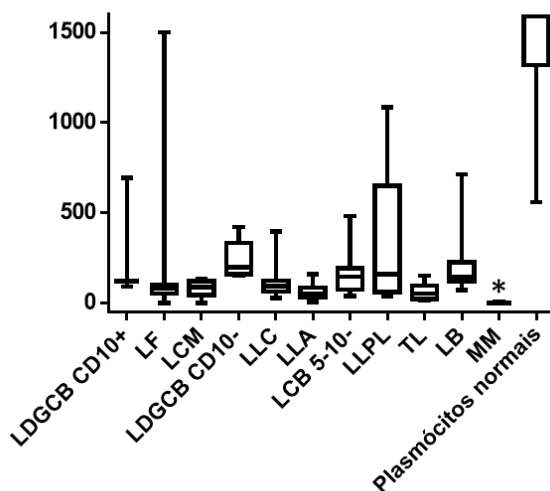
Fonte: A autora, 2017.

Nota: Em cinza células não marcadas; em vermelho e em rosa, células neoplásicas; LB: Linfoma de Burkitt; LCB: Linfoma de Células B; LCM: Linfoma de células do manto; LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B; LF: Linfoma folicular; LLA: Leucemia linfoblástica aguda; LLC: Leucemia linfocítica crônica; LLPL: linfoma linfoplasmocítico; LZM: linfoma da zona marginal; LZME: linfoma da zona marginal esplênica; LPL: leucemia pró-linfocítica; TL: tricoleucemia; MM: Mieloma Múltiplo.

A avaliação estatística por meio do teste de Kruskal-Wallis mostrou diferenças entre os grupos com relação a expressão do CD261 ($p < 0,0001$). A aplicação do pós-teste de Dunn-Bonferroni mostrou diferenças significativas entre todos os grupos e MM: LB e MM ($p < 0,0001$), LCB CD5 negativo CD10 negativo e MM ($p < 0,0001$), LCM

e MM ($p = 0,002$), LDGCB CD10 negativo e MM ($p < 0,0001$), LDGCB CD10 positivo e MM ($p = 0,008$), LF e MM ($p = 0,001$), LLA e MM ($p = 0,020$), LLC e MM ($p < 0,0001$) e LLPL e MM ($p = 0,001$) (Figura 30). Essa diferença se deve ao fato de todos os grupos expressarem de forma fraca ou moderada o CD261 e as células dos pacientes com MM praticamente não expressarem o marcador (IFM entre 0 e 5). No entanto, o diagnóstico diferencial entre o MM e esses grupos de NCBM não é relevante, conforme Quadro 4.

Figura 30 - Comparação da expressão de CD261 entre as diferentes neoplasias avaliadas no estudo



Fonte: A autora, 2017.

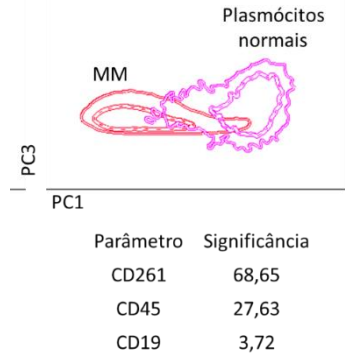
Nota: LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B; LF: Linfoma folicular; LCM: Linfoma de células do manto; LLC: Leucemia linfocítica crônica; LLA: Leucemia linfoblástica aguda; LCB: Linfoma de Células B CD5 negativo CD10 negativo; LLPL: linfoma linfoplasmocítico; TL: tricoleucemia; LB: Linfoma de Burkitt; MM: Mieloma Múltiplo.

Conforme abordado anteriormente, o LLPL apresenta linfócitos e plasmócitos clonais, e ambos expressam a mesma cadeia leve de imunoglobulina monoclonal. A expressão positiva de CD19 e de CD45 poderia auxiliar no diagnóstico diferencial com o MM, pois os plasmócitos neoplásicos observados no MM podem perder a expressão

desses marcadores, fato não observado nos plasmócitos do LLPL. Os plasmócitos dos casos de LLPL apresentaram moderada expressão de CD261 enquanto que as células B apresentaram fraca expressão. Dessa forma, a expressão encontrada na Figura 29 (Histograma 10) demonstra em rosa a expressão em plasmócitos e em vermelho a expressão em linfócitos B neoplásicos.

Os plasmócitos não neoplásicos (normais) são caracterizados pela expressão de CD19, CD22 e CD45. No MM, a proliferação clonal dos plasmócitos neoplásicos na MO comumente não expressam CD19 e apresentam expressão fraca ou negativa do CD45. Nesse aspecto, o MM difere das outras neoplasias de células B que normalmente expressam esses marcadores (SHAJI-KUMAR; KIMLINGER; MORICE, 2010; JEONG et al, 2012; CHAUFFAILLE, 2016). Como pode ser observado na Figura 28 os plasmócitos presentes em amostras de MO de indivíduos controles expressam CD261, no entanto, os plasmócitos clonais nos casos de MM, avaliados neste trabalho, não expressam esse marcador (Figura 29). Conforme pode ser observado na Figura 31, a significância do CD261 em auxiliar na separação entre plasmócitos normais e plasmócitos clonais de MM é de 68,65%, contribuindo até mais que a expressão de CD19 e CD45. Dessa forma, a expressão do CD261 pode ser utilizada como ferramenta auxiliar no diagnóstico imunofenotípico de MM. Além disso, a expressão de CD261 difere nos casos de MM e LLPL visto que os plasmócitos dos casos de LLPL expressam CD261 enquanto que os plasmócitos clonais dos casos de MM perdem a expressão desse marcador.

Figura 31 - Separador de populações automático mostrando a separação entre entre plasmócitos normais e plasmócitos clonais de MM no CD261



Fonte: A autora, 2017. **Nota:** MM: mieloma múltiplo

Até o momento, não foram encontrados estudos que avaliaram a expressão do CD261 para efeitos de comparação.

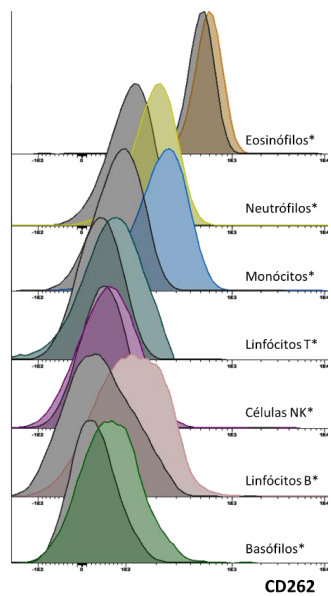
5.6 CARACTERIZAÇÃO DO CD262

Da mesma forma como o CD261, o CD262 está relacionado a apoptose. Assim, também se avaliou a expressão desse marcador em células de SP e MO com ausência de neoplasias hematológicas e nas células dos pacientes com neoplasias de células B, para investigar a sua importância como marcador de diagnóstico imunofenotípico de NCBM, como segue abaixo.

5.6.1 Células de sangue periférico de indivíduos saudáveis

Conforme Figura 32 e Tabela 15, com relação ao CD262, no presente estudo, observa-se uma fraca intensidade de expressão em neutrófilos, monócitos, linfócitos B e T e basófilos, inclusive com diferenças estatísticas. Para efeitos de comparação, buscou-se dados na literatura e foi encontrado apenas o estudo de Llinàs e colaboradores (2011) no qual foi observada expressão de fraca intensidade de CD262 apenas em células B de memória (LLINÀS et al., 2011).

Figura 32 - Histogramas da caracterização do CD262 nas células do SP dos indivíduos saudáveis



Fonte: A autora, 2017.

Nota: células marcadas com CD262 em cores e células não marcadas (controle negativo) em cinza.

Tabela 15 - Médias das IFM das células não marcadas e das células B marcadas com CD262 nos diferentes tipos celulares do SP dos indivíduos saudáveis

Tipo Celular	Média da IFM		p
	CNM	CD262	
Eosinófilos	523	635	0,008*
Neutrófilos	121	207	<0,0001*
Monócitos	94	242	<0,0001*
Basófilos	57	75	0,028*
Linfócitos B	37	139	0,001*
Linfócitos T	43	72	<0,0001*
Células NK	42	70	0,005*

Nota: IFM: Intensidade de fluorescência média; CNM: células não marcadas; *
p < 0,05

5.6.2 Células de medula óssea de indivíduos sem neoplasias hematológicas

Semelhante ao que foi observado nas amostras de SP (Figura 33, Tabela 16), as células das amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias hematológicas também expressam CD262, inclusive observou-se expressão nos estágios de maturação dos linfócitos B: BI, BII e BIV. Não foram encontrados dados na literatura para efeitos de comparação.

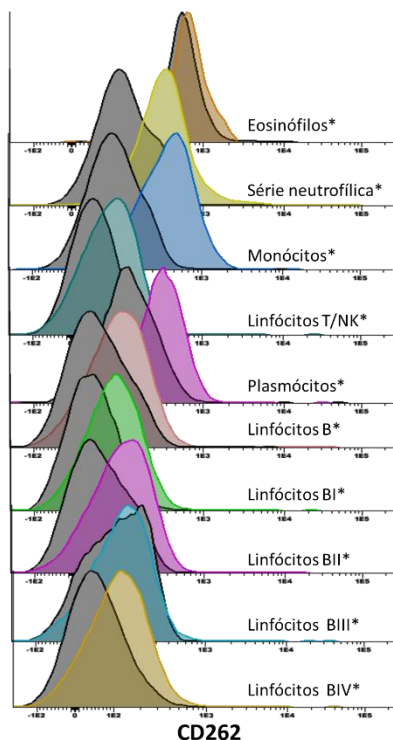
Como foi observada expressão em células linfoides B, prosseguiu-se a investigação da expressão desse antígeno nas células neoplásicas de NCBM.

Tabela 16 - Médias das IFM do CD262 nas amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias hematológicas nos diferentes tipos celulares

Tipo Celular	Média da IFM		p
	CNM	CD262	
Eosinófilos	580	795	0,021*
Série Neutrófila	166	468	0,001*
Monócitos	135	489	<0,0001*
Plasmócitos	229	447	0,002*
Linfócitos B	87	153	0,047*
Linfócitos BI	54	126	0,001*
Linfócitos BII	86	158	0,033*
Linfócitos BIII	97	157	0,046*
Linfócitos BIV	100	169	0,145
Linfócitos T/NK	51	110	0,003*

Nota: IFM: Intensidade de fluorescência média; CNM: células não marcadas; *
p < 0,05

Figura 33 - Histogramas da caracterização do CD262 nas células de MO dos indivíduos sem neoplasias



Fonte: A autora, 2017.

Nota: Células marcadas com CD262 em cores e células não marcadas (controle negativo) em cinza. Teste t (eosinófilos, plasmócitos, linfócitos B, linfócitos BI, BII, BIII e BIV) e Mann-Whitney (série neutrofílica, monócitos e linfócitos T/NK). * $p < 0,05$

5.6.3 Células de pacientes com neoplasias hematológicas

A análise do CD262 foi realizada em células de 162 pacientes com neoplasia de células B (Tabela 17), dos quais 68 (42%) eram do gênero feminino (60 ± 19 anos) e 94 (58%) do gênero masculino (58 ± 18 anos). Com relação ao tipo de amostra, uma era biópsia de boca (palato), uma biópsia ocular (órbita), um líquido ascítico, um aspirado de mandíbula, dois aspirados de linfonodo, 14 biópsias de linfonodo, 61 SP e 81 aspirados de MO.

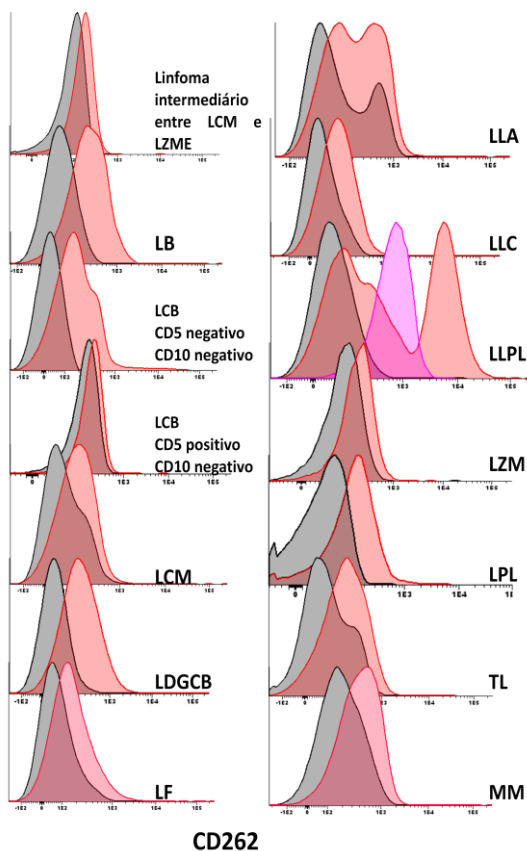
Tabela 17- Número de casos de cada neoplasia para o CD262.

Neoplasia	Número de casos
Linfoma com características intermediárias entre LCM e LZME	1
Leucemia prolinfocítica	1
Linfoma difuso de grandes células B CD5 positivo	1
Linfoma de células B CD5 positivo CD10 negativo	2
Linfoma da zona marginal	2
Linfoma difuso de grandes células B CD10 positivo	3
Linfoma linfoplasmocítico	5
Linfoma difuso de grandes células B CD10 negativo	5
Linfoma de Burkitt	6
Linfoma de células B CD5 negativo CD10 negativo	7
Tricoleucemia	7
Linfoma de células do manto	13
Linfoma folicular	14
Leucemia linfoblástica aguda B	15
Mieloma múltiplo	29
Leucemia linfocítica crônica	51

Nota: LCM: linfoma de células do manto; LZME: linfoma da zona marginal esplênica.

Como mostra a Figura 34, as células neoplásicas dos pacientes com LB, LCB CD10 negativo CD10 negativo, LDGCB, LF, LLC, LZM, LPL, TL e MM apresentam expressão variada do CD262. Nos casos de LLPL, a expressão foi bem heterogênea variando de fraca a forte. No entanto, apenas um caso apresentou expressão forte de CD262 nas células B neoplásicas. Semelhante ao observado no CD261, os plasmócitos de LLPL apresentaram expressão moderada e os plasmócitos dos casos de MM expressão mais fraca.

Figura 34 - Histogramas representativos da comparação da expressão entre as células não marcadas e as células dos pacientes com neoplasias de células B no marcador CD262



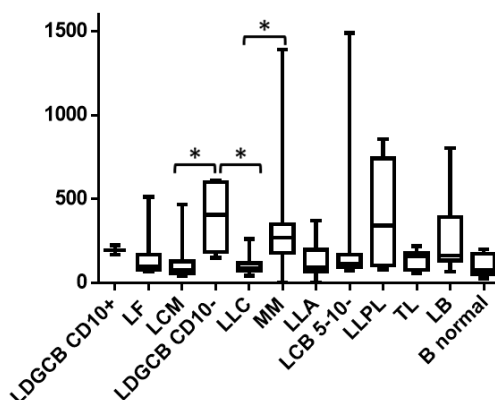
Fonte: A autora, 2017.

Nota: Em cinza células não marcadas; em vermelho e em rosa, células neoplásicas; LB: Linfoma de Burkitt; LCB: Linfoma de Células B; LCM: Linfoma de células do manto; LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B; LF: Linfoma folicular; LLA: Leucemia linfoblástica aguda; LLC: Leucemia linfocítica crônica; LLPL: linfoma linfoplasmocítico; LZM: linfoma da zona marginal; LZME: linfoma da zona marginal esplênica; LPL: leucemia pró-linfocítica; TL: tricoleucemia; MM: Mieloma Múltiplo.

A análise estatística com o teste Kruskal-Wallis revelou diferenças entre os grupos ($p < 0,0001$) nos quais o pós-teste de Dunn-

Bonferroni evidenciou significância entre: LCM e LDGCB CD10 negativo ($p = 0,026$), LCM e MM ($p = 0,001$), LDGCB CD10 negativo e LLC ($p = 0,024$) e LLC e MM ($p < 0,0001$) (Figura 35).

Figura 35 - Comparação da expressão de CD262 entre as diferentes neoplasias avaliadas no estudo



Fonte: A autora, 2017.

Nota: LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B; LF: Linfoma folicular; LCM: Linfoma de células do manto; LLC: Leucemia linfocítica crônica; MM: Mieloma Múltiplo; LLA: Leucemia linfoblástica aguda; LCB: Linfoma de Células B CD5 negativo CD10 negativo; LLPL: linfoma linfoplasmocítico; TL: tricoleucemia; LB: Linfoma de Burkitt.

Conforme dados da literatura presentes no Quadro 4, dos casos avaliados neste trabalho, é relevante a realização do diagnóstico diferencial entre o LCM e LDGCB CD10 negativo e LDGCB CD10 negativo e LLC (Grupo 1 CD5 positivo CD10 negativo na revisão da literatura).

No programa Infinicyt, a ferramenta de separador de populações automático (APS) divide as células de acordo com componentes principais (PC1 e PC2) e mostra o grau de significância de cada parâmetro ou marcador na separação das populações. No entanto, essa ferramenta não conseguiu separar totalmente esses casos. Deve-se continuar os estudos com esse marcador, aumentando-se o tamanho amostral para verificar a possibilidade de separação dos casos com a ferramenta APS. Foi obtido um bom grau de separação apenas entre LLC e MM no qual o CD262 contribuiu com 34,91% (Figura 36).

Figura 36 - Separador de populações automático mostrando a separação entre LLC e MM no CD262



Fonte: A autora, 2017.

Nota: LLC: Leucemia linfocítica crônica; MM: mieloma múltiplo.

Os estudos encontrados na literatura observaram expressão do CD262 em vários subtipos de NCBM, corroborando os dados desse estudo. Por exemplo, o estudo de Ramos-Medina (2011) avaliou a expressão de CD262 por imunohistoquímica e observou positividade em 10 casos de LLC/LLPC (n = 10), em 10 casos de LCM (n = 10), em 9 casos de LF (n = 10), em 8 casos de LB (n = 8) e em nove casos de LDGCB (n = 10) (RAMOS-MEDINA et al., 2011). Já o estudo realizado por Fanoni e colaboradores (2011) analisou a expressão de CD262 também por imunohistoquímica em linfomas de células B primário da pele (tipo LF n = 10, LZM n = 10 e LDGCB tipo “da perna” n = 5) e observaram que o marcador se mostrou positivo como sendo pan-leucocitário, com padrão não restrito a linhagem de células B (FANONI et al., 2011).

O estudo de Faure e colaboradores (2011) analisou por citometria de fluxo a expressão do CD262 em 46 casos de LLA-B e encontrou positividade fraca em três casos (FAURE et al., 2011). No presente estudo, observou-se positividade do CD262 em bem mais casos de LLA-B visto que foram avaliados 15 casos dos quais 11 expressaram CD262 com fraca intensidade e quatro foram totalmente negativos para este marcador.

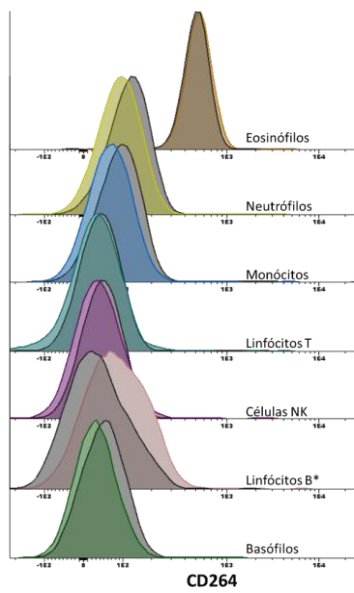
5.7 CARACTERIZAÇÃO DO CD264

Como visto anteriormente, o CD264 (DcR2) é uma proteína transmembrana (TRAIL-R4) cuja função está relacionada com a inibição da apoptose. Como muitos tipos de neoplasias apresentam resistência a apoptose, o estudo desse marcador em NCBM se mostra relevante. Assim, a sua expressão foi avaliada inicialmente em células de SP e MO com ausência de neoplasias hematológicas e depois nas células dos pacientes com neoplasias de células B.

5.7.1 Células de sangue periférico de indivíduos saudáveis

Na análise do perfil de expressão do CD264 nas amostras de SP dos indivíduos considerados saudáveis, pode-se observar ausência de expressão nas células hematopoiéticas, com exceção dos linfócitos B que apresentaram fraca intensidade (Figura 40, Tabela 18). Esse resultado vem ao encontro do estudo de Llinàs e colaboradores (2011) no qual foi observada expressão de moderada intensidade de CD264 em células B de memória *unswitched* e também em células B pré-centro germinal (LLINÀS et al., 2011). Até o momento não foram encontrados outros estudos que avaliaram a expressão desse marcador em amostras de SP de indivíduos saudáveis.

Figura 37 - Histogramas da caracterização do CD264 nas células do sangue periférico dos indivíduos saudáveis



Fonte: A autora, 2017.

Nota: células marcadas com CD264 em cores e células não marcadas (controle negativo) em cinza. Teste t (eosinófilos) e Mann-Whitney (linfócitos B, linfócitos T, monócitos, neutrófilos, basófilos e células NK). * $p < 0,05$

Tabela 18 -Médias das IFM das células não marcadas e das células B marcadas com CD264 nos diferentes tipos celulares do SP dos indivíduos saudáveis

Tipo Celular	Média da IFM		p
	CNM	CD264	
Eosinófilos	523	588	0,296
Neutrófilos	121	97	0,019*
Monócitos	94	71	0,035*
Basófilos	57	36	0,023*
Linfócitos B	37	95	0,003*
Linfócitos T	43	30	0,190
Células NK	47	39	0,105

Nota: IFM: Intensidade de fluorescência média; CNM: células não marcadas; * $p < 0,05$

5.7.2 Células de medula óssea de indivíduos sem neoplasias hematológicas

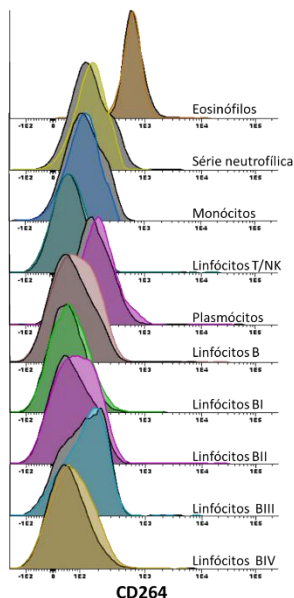
A expressão do CD264 foi analisada nas células da amostra de MO e observou-se que os plasmócitos, eosinófilos, monócitos, linfócitos (B e T/NK) e células da série neutrofílica não expressam esse marcador (Figura 38 e Tabela 19).

Tabela 19 - Médias das IFM do CD264 nas amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias hematológicas nos diferentes tipos celulares

Tipo Celular	Média da IFM		p
	CNM	CD264	
Eosinófilos	580	705	0,334
Série Neutrofílica	166	191	0,161
Monócitos	135	135	0,161
Plasmócitos	229	535	0,065
Linfócitos B	87	116	0,105
Linfócitos BI	54	79	0,268
Linfócitos BII	86	116	0,384
Linfócitos BIII	97	135	0,313
Linfócitos BIV	100	130	0,546
Linfócitos T/NK	51	68	0,105

Nota: IFM: Intensidade de fluorescência média; CNM: células não marcadas.

Figura 38 - Histogramas da caracterização do CD264 nas células de MO dos indivíduos sem neoplasias



Fonte: A autora, 2017.

Nota: Células marcadas com CD264 em cores e células não marcadas (controle negativo) em cinza. Teste t (eosinófilos, linfócitos BI, BII, BIII e BIV) e Mann-Whitney (plasmócitos, série neutrofílica, monócitos, linfócitos B e linfócitos T/NK). * $p < 0,05$

5.7.3 Células de pacientes com neoplasias hematológicas

A análise do CD264 foi realizada em células de 100 pacientes com neoplasia de células B (Tabela 20), dos quais 42 (42%) eram do gênero feminino (60 ± 19 anos) e 58 (58%) do gênero masculino (58 ± 18 anos). Com relação ao tipo de amostra, uma era biópsia de boca (palato), uma biópsia ocular (órbita), um aspirado de mandíbula, oito biópsias de linfonodo, 41 SP e 48 aspirados de MO.

Tabela 20 - Número de casos de cada neoplasia para o marcador CD264.

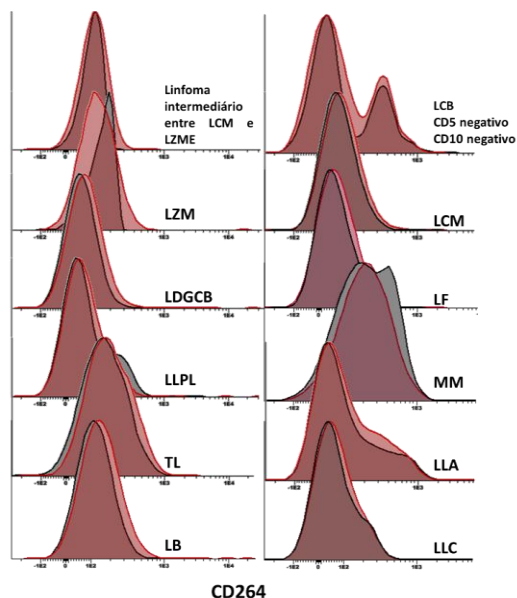
Neoplasia	Número de casos
Linfoma com características intermediárias entre LCM e LZME	1
Linfoma da zona marginal	1
Linfoma difuso de grandes células B CD5 positivo	1
Linfoma linfoplasmocítico	2
Linfoma difuso de grandes células B CD10 positivo	2
Linfoma difuso de grandes células B CD10 negativo	3
Tricoleucemia	3
Linfoma de Burkitt	4
Linfoma de células B CD5 negativo CD10 negativo	4
Linfoma de células do manto	6
Linfoma folicular	7
Mieloma múltiplo	14
Leucemia linfoblástica aguda B	13
Leucemia linfocítica crônica	39

Nota: LCM: linfoma de células do manto; LZME: linfoma da zona marginal esplênica.

Ao realizar a comparação visual entre as células não marcadas (preto) com as células dos pacientes (vermelho) foi possível visualizar que nenhum dos grupos apresentou positividade, inclusive, alguns histogramas ficaram totalmente sobrepostos (Figura 42).

Estatisticamente, o CD264 também não demonstrou diferença entre os grupos (Kruskall-Wallis, $p = 0,131$). Até a presente data, não foram encontrados trabalhos mostrando a expressão do CD264 em células de pacientes com neoplasias de células B maduras, encontrou-se apenas o estudo de Faure e colaboradores (2011) que analisou por citometria de fluxo a expressão do CD264 em 46 casos de LLA-B e encontrou positividade fraca em dois casos (FAURE et al., 2011). No presente estudo, foram avaliados 13 casos de LLA-B e não foi observada expressão do CD264 em nenhum dos casos.

Figura 39 - Histogramas representativos da comparação da expressão entre as células não marcadas (preto) e as células dos pacientes com neoplasias de células B (vermelho) no marcador CD264



Fonte: A autora, 2017.

Nota: Em cinza células não marcadas; em vermelho, células B neoplásicas: LB: Linfoma de Burkitt; LCB: Linfoma de Células B; LCM: Linfoma de células do manto; LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B; LF: Linfoma folicular; LLA: Leucemia linfoblástica aguda; LLC: Leucemia linfocítica crônica; LLPL: linfoma linfoplasmocítico; LZM: linfoma da zona marginal; LZME: linfoma da zona marginal esplênica; LPL: leucemia pró-linfocítica; TL: tricoleucemia; MM: Mieloma Múltiplo.

5.8 CARACTERIZAÇÃO DO CD358

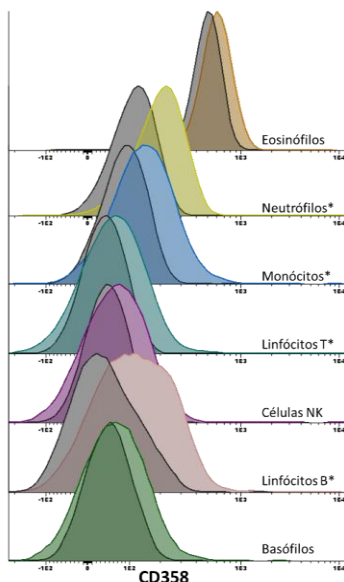
Estudos demonstram que o CD358 está relacionado a alguns tipos de tumores não hematológicos, como o câncer de ovário e sarcoma sinovial em adultos (YANG et al, 2012; SASAROLI et al., 2011) e em neoplasias hematológicas de linhagem T, como o linfoma angioimunoblástico T (WANG et al., 2017). Assim, criou-se a hipótese de se estudar esse marcador em neoplasias de células B maduras. Abaixo encontra-se a avaliação do CD358 em células de SP e MO com

ausência de neoplasias hematológicas e nas células dos pacientes com neoplasias de células B.

5.8.1 Células de sangue periférico de indivíduos saudáveis

Como pode ser observado na Figura 43 e Tabela 21, foi observada fraca expressão do CD358 nos neutrófilos, monócitos, linfócitos B e T, células NK e basófilos. Esses resultados estão em consonância com o estudo Matesanz-Isabel e colaboradores (2011) e de Llinàs e colaboradores (2011), que mostram que este receptor está amplamente expresso nas células hematopoiéticas e não hematopoiéticas, e em células tumorais. No SP estava presente principalmente em monócitos e com menor intensidade de expressão em linfócitos B e T (MATESANZ-ISABEL et al., 2011; LLINÀS et al., 2011).

Figura 40 - Histogramas da caracterização do CD358 nas células do SP dos indivíduos saudáveis



Fonte: A autora, 2017.

Nota: células marcadas com CD358 em cores e células não marcadas (controle negativo) em cinza., Test t (monócitos, eosinófilos e neutrófilos) e Mann-Whitney (linfócitos B, linfócitos T, basófilos e células NK). * $p < 0,05$

Tabela 21 - Médias das IFM das células não marcadas e das células B marcadas com CD358 nos diferentes tipos celulares do SP dos indivíduos saudáveis

Tipo Celular	Média da IFM		p
	CNM	CD358	
Eosinófilos	523	661	0,002
Neutrófilos	121	197	<0,001*
Monócitos	94	165	<0,001*
Basófilos	57	109	0,315
Linfócitos B	37	208	<0,001*
Linfócitos T	43	76	<0,001*
Células NK	47	73	0,063

Nota: IFM: Intensidade de fluorescência média; CNM: células não marcadas; * p < 0,05

5.8.2 Células de medula óssea de indivíduos sem neoplasias hematológicas

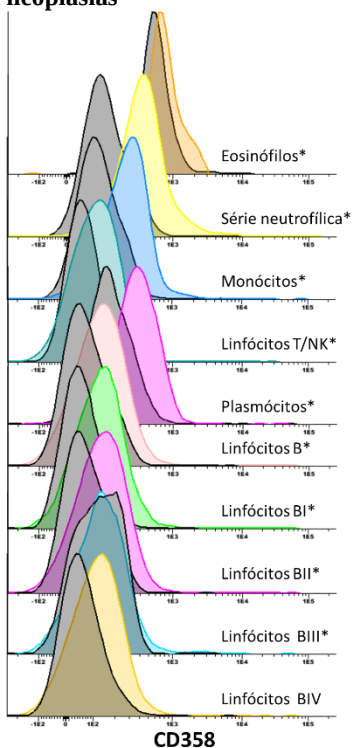
A expressão do CD358 também foi analisada nas células das amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias hematológicas e pode-se observar fraca expressão do CD358 nos neutrófilos, monócitos, plasmócitos e linfócitos B e T (Tabela 22, Figura 41). Com relação aos estágios de maturação das células B, observou-se fraca expressão nos estágios BI (pró-B), BII (pré-B) e BIV (maduras). Diferentemente do observado nos estudos de Matesanz-Isabel e colaboradores (2011) e de Llinàs e colaboradores (2011) que mostraram a expressão de CD358 nas células pró-B, pré-B e B imaturas.

Tabela 22 - Médias das IFM do CD358 nas amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias hematológicas nos diferentes tipos celulares

Tipo Celular	Média da IFM		p
	CNM	CD358	
Eosinófilos	580	2614	0,007*
Série Neutrofilica	166	539	0,001*
Monócitos	135	504	<0,0001*
Plasmócitos	229	560	<0,0001*
Linfócitos B	87	187	0,007*
Linfócitos BI	54	206	<0,0001*
Linfócitos BII	86	196	0,008*
Linfócitos BIII	97	229	0,001*
Linfócitos BIV	100	203	0,061
Linfócitos T/NK	51	117	0,005*

Nota: IFM: Intensidade de fluorescência média; CNM: células não marcadas; * p < 0,05

Figura 41 - Histogramas da caracterização do CD358 nas células de MO dos indivíduos sem neoplasias



Fonte: A autora, 2017.

Nota: Células marcadas com CD358 em cores e células não marcadas (controle negativo) em cinza. Teste t (linfócitos B, plasmócitos, linfócitos BII, BII e BIV) e Mann-Whitney (eosinófilos, série neutrofílica, monócitos, linfócitos BI e linfócitos T/NK). * $p < 0,05$

5.8.3 Células de pacientes com neoplasias hematológicas

A análise do CD358 foi realizada em células de 131 pacientes com neoplasia de células B (Tabela 14), dos quais 56 (42,7%) eram do gênero feminino (60 ± 19 anos) e 75 (57,3%) do gênero masculino (58 ± 18 anos). Com relação ao tipo de amostra, uma era biópsia de boca (palato), uma biópsia ocular (órbita), um aspirado de mandíbula, dois aspirados de linfonodo, 12 biópsias de linfonodo, 47 SP e 80 aspirados de MO.

Tabela 23- Número de casos de cada neoplasia para o CD358.

Neoplasia	Número de casos
Linfoma com características intermediárias entre LCM e LZME	1
Linfoma difuso de grandes células B CD5 positivo	1
Linfoma de células B CD5 positivo CD10 negativo	1
Linfoma da zona marginal	1
Linfoma difuso de grandes células B CD10 positivo	2
Linfoma linfoplasmocítico	3
Tricoleucemia	5
Linfoma difuso de grandes células B CD10 negativo	5
Linfoma de Burkitt	5
Linfoma de células B CD5 negativo CD10 negativo	6
Linfoma de células do manto	8
Leucemia linfoblástica aguda B	14
Linfoma folicular	10
Mieloma múltiplo	21
Leucemia linfocítica crônica	44

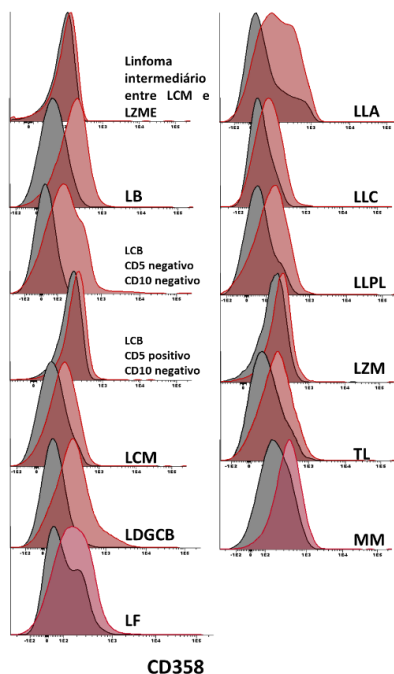
Nota: LCM: linfoma de células do manto; LZME: linfoma da zona marginal esplênica.

A análise do CD358 demonstrou fraca expressão nas células dos pacientes com LB, LCB CD10 negativo CD10 negativo, LCM, LDGCB, LF, LLC, LLPL, TL e MM (Figura 42).

A análise estatística do CD358 por meio do teste de Kruskal-Wallis demonstrou diferença entre os grupos ($p < 0,0001$). O pós-teste de Dunn-Bonferroni evidenciou diferença entre os casos de LLC e MM ($p < 0,0001$) (Figura 43). No entanto, conforme os dados do

Quadro 4, não há necessidade de se realizar o diagnóstico diferencial entre os casos de LLC e MM.

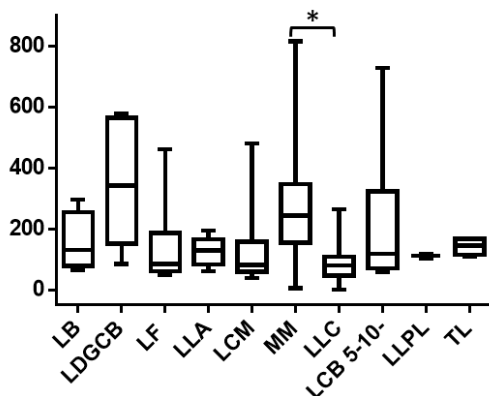
Figura 42 - Histogramas representativos da comparação da expressão entre as células não marcadas e as células dos pacientes com neoplasias de células B no marcador CD358



Fonte: A autora, 2017.

Nota: Em cinza células não marcadas; em vermelho, células B neoplásicas: LB: Linfoma de Burkitt; LCB: Linfoma de Células B; LCM: Linfoma de células do manto; LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B; LF: Linfoma folicular; LLA: Leucemia linfoblástica aguda; LLC: Leucemia linfocítica crônica; LLPL: linfoma linfoplasmocítico; LZM: linfoma da zona marginal; LZME: linfoma da zona marginal esplênica; LPL: leucemia pró-linfocítica; TL: tricoleucemia; MM: Mieloma Múltiplo.

Figura 43 - Comparação da expressão de CD358 entre as diferentes neoplasias avaliadas no estudo



Fonte: A autora, 2017.

Nota: LB: Linfoma de Burkitt; LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B; LF: Linfoma folicular; LLA: Leucemia linfoblástica aguda; LCM: Linfoma de células do manto; MM: Mieloma Múltiplo; LLC: Leucemia linfocítica crônica; LCB: Linfoma de Células B CD5 negativo CD10 negativo; LLPL: linfoma linfoplasmocítico; TL: tricoleucemia.

Até o momento, não foram encontrados estudos que avaliaram a expressão do CD358 em NCBM para efeitos de comparação.

5.9 CARACTERIZAÇÃO DO CD361

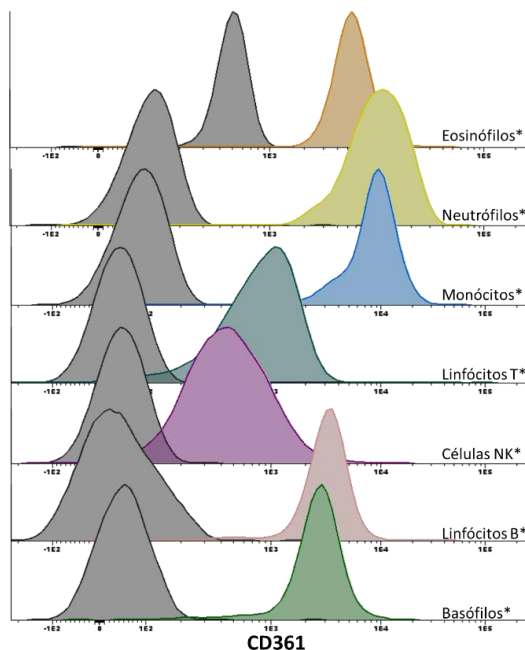
Neste trabalho, foi investigado a importância da expressão do CD361 para o diagnóstico das neoplasias de células B, porém antes foi necessário analisar a sua expressão em células de SP e MO com ausência de neoplasias hematológicas.

5.9.1 Células de sangue periférico de indivíduos saudáveis

Os resultados da Figura 44 e Tabela 24 mostram claramente que o CD361 é expresso em todas as células analisadas no SP (eosinófilos, neutrófilos, linfócitos B e T, células NK e basófilos), o que corrobora com os dados do estudo de Matesanz-Isabel e colaboradores (2011), que demonstraram a expressão desse antígeno nas células B maduras,

linfócitos T, monócitos, neutrófilos, células NK e células dendríticas plasmocitárias (MATESANZ-ISABEL et al., 2011).

Figura 44- Histogramas da caracterização do CD361 nas células do SP dos indivíduos saudáveis



Fonte: A autora, 2017.

Nota: células marcadas com CD361 em cores e células não marcadas (controle negativo) em cinza. Test t (monócitos, eosinófilos e neutrófilos) e Mann-Whitney (linfócitos B, linfócitos T, basófilos e células NK). * $p < 0,05$.

Tabela 24 - Médias das IFM das células não marcadas e das células B marcadas com CD361 nos diferentes tipos celulares do SP dos indivíduos saudáveis

Tipo Celular	Média da IFM		p
	CNM	CD361	
Eosinófilos	523	6629	<0,0001*
Neutrófilos	121	11096	<0,0001*
Monócitos	94	9341	<0,0001*
Basófilos	57	2809	<0,0001*
Linfócitos B	37	3351	<0,0001*
Linfócitos T	43	988	<0,0001*
Células NK	47	637	<0,0001*

Nota: IFM: Intensidade de fluorescência média; CNM: controle não marcado. *
p < 0,05

5.9.2 Células de medula óssea de indivíduos sem neoplasias hematológicas

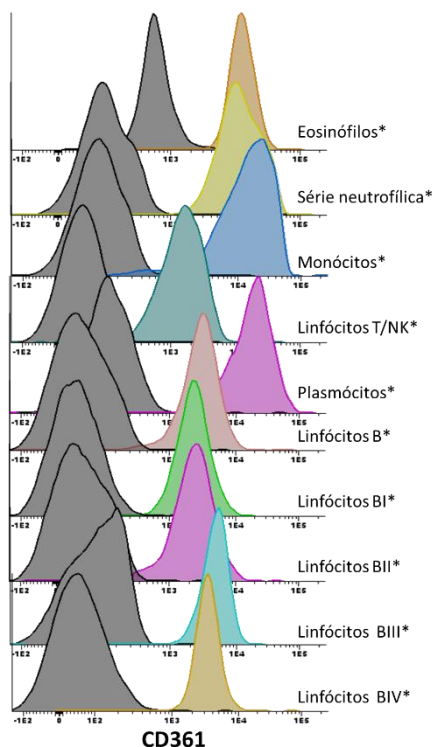
Assim como no SP (Figura 44, Tabela 24), a expressão de CD361 também foi observada em todas as linhagens avaliadas nas amostras de MO (Figura 45, Tabela 25). Esses resultados confirmam aqueles observados por Matesanz-Isabel e colaboradores (2011), no qual a expressão do CD361 foi observada em células B em diversos estágios de maturação (pró-B, pré-B, imatura, madura, centro germinal, memória e plasmócitos), linfócitos T, monócitos, granulócitos, células NK e células dendríticas plasmocitárias (MATESANZ-ISABEL et al., 2011).

Tabela 25 - Médias das IFM do CD361 nas amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias hematológicas nos diferentes tipos celulares

Tipo Celular	Média da IFM		p
	CNM	CD361	
Eosinófilos	580	11689	0,007*
Série Neutrofílica	166	12379	<0,0001*
Monócitos	135	15687	<0,0001*
Plasmócitos	229	19732	<0,0001*
Linfócitos B	87	2999	<0,0001*
Linfócitos BI	54	2388	<0,0001*
Linfócitos BII	86	2634	<0,0001*
Linfócitos BIII	97	4619	<0,0001*
Linfócitos BIV	100	3259	<0,0001*
Linfócitos T/NK	51	1539	<0,0001*

Nota: IFM: Intensidade de fluorescência média; CNM: células não marcadas; *
p < 0,05

Figura 45 - Histogramas da caracterização do CD361 nas células de MO dos indivíduos sem neoplasias



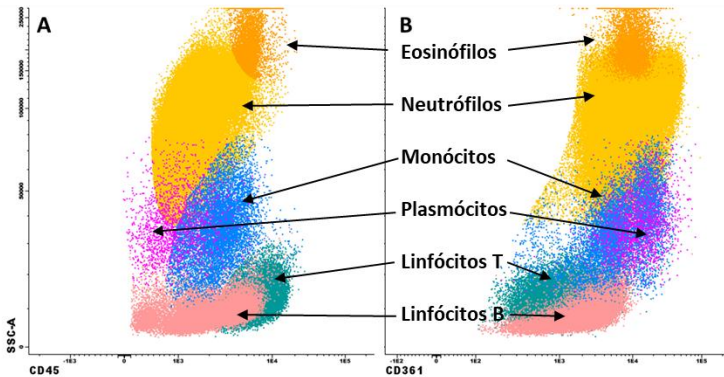
Fonte: A autora, 2017.

Nota: Células marcadas com CD361 em cores e células não marcadas (controle negativo) em cinza. Teste t (plasmócitos, linfócitos BI e BII) e Mann-Whitney (eosinófilos, série neutrofílica, monócitos, linfócitos B, linfócitos T/NK, linfócitos BIII e BIV). * $p < 0,05$

O CD45 é denominado antígeno leucocitário comum (pan-leucocitário) pois é expresso apenas em células do sistema hematopoietico, com exceção de plaquetas e eritrócitos (CRAIG et al., 1994). O CD361 também apresentou expressão em todas as células leucocitárias presentes nas amostras de SP e MO. A comparação da expressão do CD45 e do CD361 pode ser observada na Figura 46, na qual é possível observar a semelhança no perfil de expressão dos leucócitos entre os dois marcadores. Em algumas populações celulares é possível observar apenas variação na intensidade de expressão (Figura

51, Painéis A e B). Esses resultados mostram que o CD361 pode ser considerado um antígeno pan-leucocitário. Além disso, no processo maturativo normal, as células B apresentam fraca expressão de CD45, a qual vai aumentando progressivamente com a maturação (SEEGMILLER et al., 2009). Já na avaliação do CD361 isso não foi observado, pois todos os estágios de maturação das células B apresentaram intensidade de expressão semelhantes.

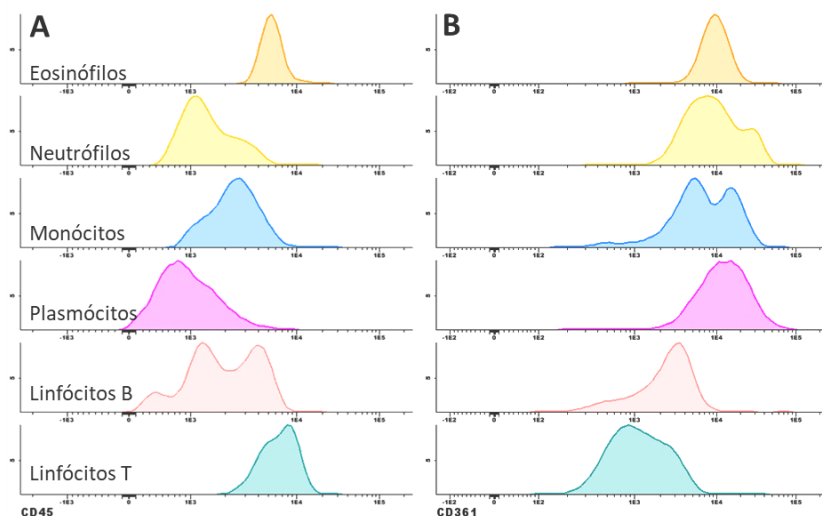
Figura 46- Perfil de expressão do CD45 e do CD361 nas células leucocitárias da MO.



Fonte: A autora, 2017.

Nota: Paineis A: perfil de expressão do CD45; Paineis B: perfil de expressão do CD361.

Figura 47 -Variação na intensidade de expressão dos leucócitos no CD45 e no CD361



Fonte: A autora, 2017.

Nota: Pannel A: perfil de expressão do CD45; Pannel B: perfil de expressão do CD361.

5.9.3 Células de pacientes com neoplasias hematológicas

A análise do CD361 foi realizada em células de 163 pacientes com neoplasia de células B (Tabela 26), dos quais 70 (42,9%) eram do gênero feminino (63 ± 18 anos) e 93 (57,1%) do gênero masculino (60 ± 17 anos). Com relação ao tipo de amostra, uma era biópsia de boca (palato), uma biópsia ocular (órbita), um aspirado de mandíbula, dois aspirados de linfonodo, 14 biópsias de linfonodo, 63 SP e 81 aspirados de MO.

Tabela 26 - Número de casos de cada neoplasia para o CD361.

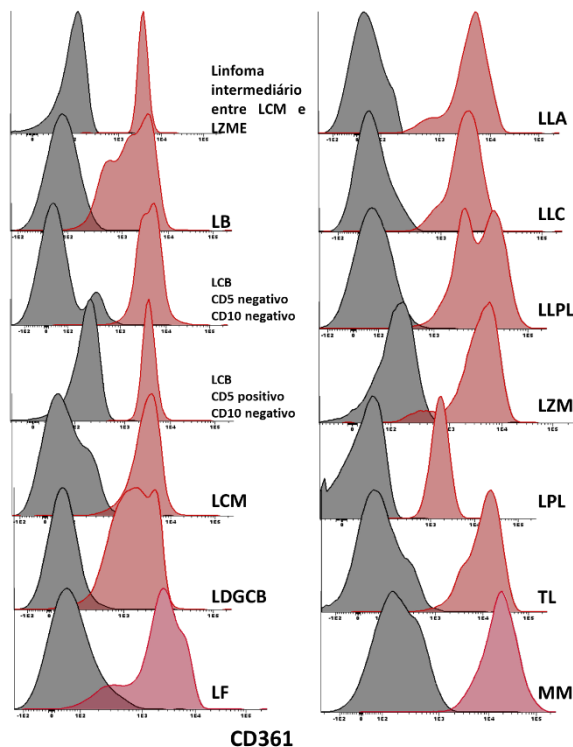
Neoplasia	Número de casos
Linfoma com características intermediárias entre LCM e LZME	1
Linfoma difuso de grandes células B CD5 positivo	1
Linfoma de células B CD5 positivo CD10 negativo	1
Leucemia prolinfocítica	1
Linfoma da zona marginal	2
Linfoma linfoplasmocítico	5
Linfoma difuso de grandes células B CD10 positivo	3
Linfoma difuso de grandes células B CD10 negativo	5
Linfoma de células do manto	14
Tricoleucemia	7
Linfoma de Burkitt	7
Linfoma de células B CD5 negativo CD10 negativo	9
Leucemia linfoblástica aguda B	14
Linfoma folicular	14
Mieloma múltiplo	29
Leucemia linfocítica crônica	50

Nota: LCM: linfoma de células do manto; LZME: linfoma da zona marginal esplênica.

A análise da expressão do CD361 nas células neoplásicas dos grupos de neoplasias de células B demonstrou positividade em todos os grupos analisados (Figura 48) cuja expressão variou de fraca a moderada.

A análise estatística da expressão do CD361 por meio do teste Kruskal-Wallis demonstrou diferenças significativas ($p < 0,0001$). O pós-teste de Dunn-Bonferroni identificou diferenças entre: LB e MM ($p < 0,0001$), LCB CD10 negativo e MM ($p = 0,019$), LCM e MM ($p < 0,0001$), LDGCB CD10 negativo e MM ($p < 0,0001$), LDGCB CD10 positivo e MM ($p = 0,001$), LF e MM ($p < 0,0001$), LLA e MM ($p = 0,004$), LLC e MM ($p < 0,0001$) e LF e TL ($p = 0,018$) (Figura 49). No entanto, a diferenciação fenotípica entre essas neoplasias e o MM não é necessária (Quadro 4).

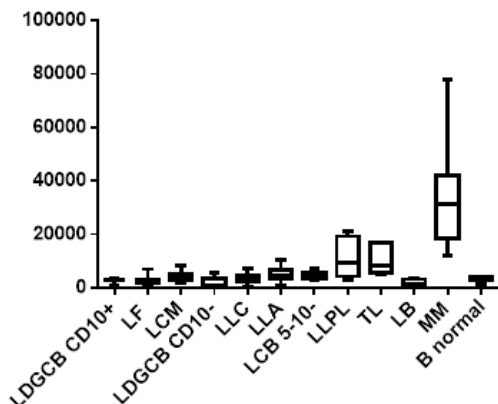
Figura 48 - Histogramas representativos da comparação da expressão entre as células não marcadas e as células dos pacientes com neoplasias de células B no marcador CD361



Fonte: A autora, 2017.

Nota: Em cinza células não marcadas; em vermelho, células B neoplásicas: LB: Linfoma de Burkitt; LCB: Linfoma de Células B; LCM: Linfoma de células do manto; LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B; LF: Linfoma folicular; LLA: Leucemia linfoblástica aguda; LLC: Leucemia linfocítica crônica; LLPL: linfoma linfoplasmocítico; LZM: linfoma da zona marginal; LZME: linfoma da zona marginal esplênica; LPL: leucemia pró-linfocítica; TL: tricoleucemia; MM: Mieloma Múltiplo.

Figura 49 - Comparação da expressão de CD361 entre as diferentes neoplasias avaliadas no estudo



Fonte: A autora, 2017.

Nota: LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B; LF: Linfoma folicular; LCM: Linfoma de células do manto; LLC: Leucemia linfocítica crônica; LLA: Leucemia linfoblástica aguda; LCB: Linfoma de Células B CD5 negativo CD10 negativo; LLPL: linfoma linfoplasmocítico; TL: tricoleucemia; LB: Linfoma de Burkitt; MM: Mieloma Múltiplo.

O estudo realizado por Fanoni e colaboradores (2011) analisou a expressão de CD361 por imunohistoquímica em linfomas de células B primários da pele (tipo LF n = 10, tipo zona marginal n = 10 e LDGCB tipo “da perna” n = 5) e observaram que esse marcador se mostrou como pan-leucocitário, com padrão não restrito a linhagem de células B (FANONI et al., 2011), semelhante ao observado neste estudo, porém as metodologias são diferentes.

O estudo de Faure e colaboradores (2011) analisou por citometria de fluxo a expressão do CD361 em 46 casos de LLA-B e encontrou expressão nos blastos leucêmicos em 25 casos. Desses, 15 casos apresentaram forte expressão (FAURE et al., 2011). No presente estudo, foram avaliados 14 casos de LLA-B dos quais 13 apresentaram intensa (positivo positivo positivo) expressão e apenas um caso apresentou forte (positivo positivo) expressão. Uma alteração frequente observada em casos de LLA-B é a negatividade ou fraca expressão de CD45 nas células B neoplásicas, que está associada a hiperdiploidia (SEEGMILLER et al., 2009). A ausência de expressão de CD45 nos blastos leucêmicos está relacionada a um bom prognóstico (BEHM et

al., 1992). A relação da expressão de CD361 com a ausência ou presença de CD45 nos blastos leucêmicos não pode ser realizada pois todos os casos analisados no presente estudo apresentaram expressão de CD45 nos blastos leucêmicos. No entanto, seria interessante analisar a expressão do CD361 em casos CD45 negativos para avaliar se existe alguma diferença com relação aos casos CD45 positivos, seja na intensidade de expressão de CD361 ou no prognóstico.

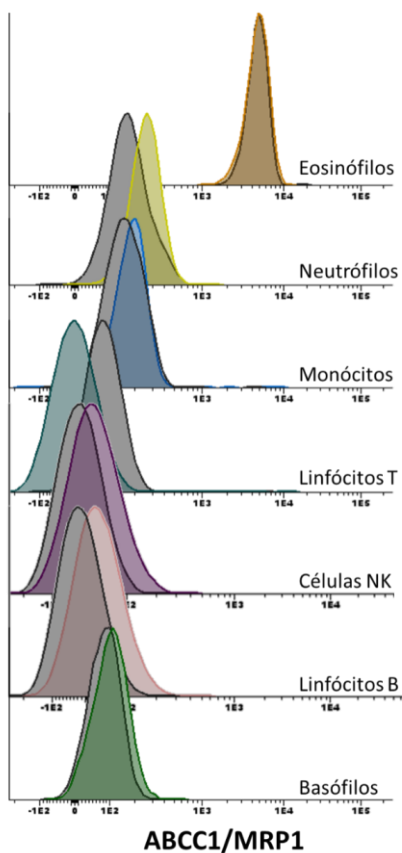
5.10 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA ABCC1/MRP1

Como descrito anteriormente, as proteínas relacionadas à resistência a múltiplos fármacos não são alvos de diagnóstico, mas sim marcadores promissores relacionados a falha terapêutica (NORGAARD; OLESEN; HOKLAND, 2004). Nesse sentido, a expressão dessa proteína (ABCC1/MRP1) foi avaliada em células de SP e MO com ausência de neoplasias hematológicas e nas células dos pacientes com neoplasias de células B.

5.10.1 Células de sangue periférico de indivíduos saudáveis

Analisou-se o perfil de expressão da ABCC1/MRP1 nos eosinófilos, neutrófilos, monócitos, linfócitos (B e T), células NK e basófilos nas amostras de SP dos indivíduos saudáveis (controles) e foi observado expressão muito fraca em neutrófilos, células NK e linfócitos B (Figura 50, Tabela 27.)

Figura 50 - Histogramas da caracterização do ABCC1/MRP1 nas células dos indivíduos saudáveis



Fonte: A autora, 2016.

Nota: células marcadas com ABCC1/MRP1 em cores e células não marcadas (controle negativo) em cinza. Test t (linfócitos B, eosinófilos e basófilos) e Mann-Whitney (monócitos, linfócitos T, neutrófilos e células NK). * $p < 0,05$

Tabela 27 - Médias das IFM das células não marcadas e das células B marcadas com ABCC1/MRP1 nos diferentes tipos celulares do SP dos indivíduos saudáveis

Tipo Celular	Média da IFM		p
	CNM	ABCC1/MRP1	
Eosinófilos	4587	4476	0,730
Neutrófilos	556	271	0,130
Monócitos	168	184	0,442
Basófilos	44	115	<0,0001*
Linfócitos B	-21	24	<0,0001*
Linfócitos T	-39	2	<0,0001*
Células NK	-28	11	0,003*

Nota: IFM: Intensidade de fluorescência média; CNM: células não marcadas; * p < 0,05

5.10.2 Células de medula óssea de indivíduos sem neoplasias hematológicas

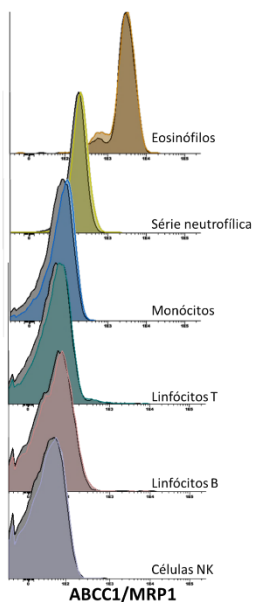
A expressão da ABCC1/MRP1 também foi analisada nos plasmócitos, nos eosinófilos, nos monócitos, nos linfócitos (B e T/NK) e nas células da série neutrofílica nas amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias hematológicas, e, como pode ser observado na Figura 55 e Tabela 28, essas células não expressam essa proteína. Como a proteína ABCC1/MRP1 estava expressa apenas fracamente nas células B maduras do sangue periférico foi levando a hipótese que a expressão dessas proteínas poderia estar associada a proliferação de células patológicas nas neoplasias de células B maduras. Assim, em outra etapa deste trabalho a expressão da ABCC1/MRP1 foi avaliada em células de pacientes com NCBM.

Tabela 28 - Médias das IFM da ABCC1/MRP1 nas amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias hematológicas nos diferentes tipos celulares

Tipo Celular	Média da IFM		p
	CNM	ABCC1/MRP1	
Eosinófilos	5765	5510	0,343
Série Neutrofílica	378	422	0,193
Monócitos	175	190	0,343
Linfócitos B	135	152	0,114
Linfócitos T	165	167	1
Linfócitos NK	88	89	0,686

Nota: IFM: Intensidade de fluorescência média; CNM: células não marcadas; * p < 0,05

Figura 51 - Histogramas da caracterização da ABCC1/MRP1 nas células de MO dos indivíduos sem neoplasias



Fonte: A autora, 2017.

Nota: Células marcadas com ABCC1/MRP1 em cores e células não marcadas (controle negativo) em cinza. Teste t (série neutrofílica) e Mann-Whitney (eosinófilos, monócitos, linfócitos B, linfócitos T e linfócitos NK). * $p < 0,05$

5.10.3 Células de pacientes com neoplasias hematológicas

A análise da ABCC1/MRP1 foi realizada em células de 95 pacientes com neoplasia de células B (Tabela 29), dos quais 40 (42%) eram do gênero feminino (62 ± 17 anos) e 55 (58%) do gênero masculino (60 ± 16 anos). Com relação ao tipo de amostra, uma era biópsia de boca (palato), uma biópsia ocular (órbita), um aspirado de mandíbula, dois aspirados de linfonodo, seis biópsias de linfonodo, 25 SP e 59 aspirados de MO.

Tabela 29- Número de casos de cada neoplasia para a ABCC1/MRP1.

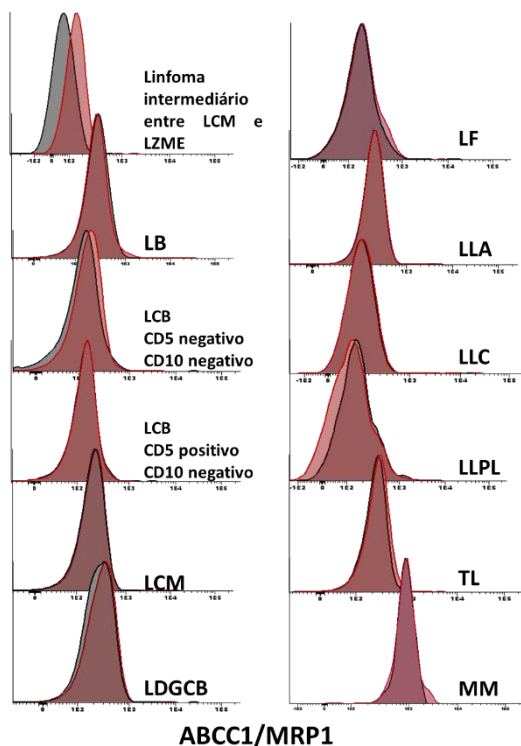
Neoplasia	Número de casos
Linfoma com características intermediárias entre LCM e LZME	1
Linfoma difuso de grandes células B CD5 positivo	1
Linfoma de células B CD5 positivo CD10 negativo	1
Linfoma da zona marginal	2
Linfoma linfoplasmocítico	2
Linfoma difuso de grandes células B CD10 positivo	2
Linfoma difuso de grandes células B CD10 negativo	2
Linfoma de células B CD5 negativo CD10 negativo	5
Tricoleucemia	5
Linfoma de Burkitt	6
Linfoma de células do manto	6
Leucemia linfoblástica aguda B	6
Linfoma folicular	8
Mieloma múltiplo	21
Leucemia linfocítica crônica	27

Nota: LCM: linfoma de células do manto; LZME: linfoma da zona marginal esplênica.

A expressão da proteína ABCC1/MRP1 não foi observada nas células de nenhum dos grupos de neoplasias de células B, com exceção das células do paciente com Linfoma de células B com características intermediárias entre LCM e LZME, que apresentou expressão muito fraca (Figura 56).

Na análise estatística, não se evidenciou diferença entre os grupos com relação a expressão da proteína ABCC1/MRP1 (Kruskall-Wallis, $p = 0,259$). A análise dessa proteína nas células dos pacientes com neoplasias de células B ocorreu apenas no momento do diagnóstico, e não foi avaliada a expressão gênica por biologia molecular. Dessa forma, não é possível afirmar se as células neoplásicas não expressam essas proteínas ou se passam a expressar somente após o tratamento quimioterápico.

Figura 52 - Histogramas representativos da comparação da expressão entre as células não marcadas e as células dos pacientes com neoplasias de células B no marcador ABCC1/MRP1



Fonte: A autora, 2017.

Nota: Em cinza células não marcadas; em vermelho, células B neoplásicas: LB: Linfoma de Burkitt; LCB: Linfoma de Células B; LCM: Linfoma de células do manto; LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B; LF: Linfoma folicular; LLA: Leucemia linfoblástica aguda; LLC: Leucemia linfocítica crônica; LLPL: linfoma linfoplasmocítico; LZM: linfoma da zona marginal; LZME: linfoma da zona marginal esplênica; LPL: leucemia pró-linfocítica; TL: tricoleucemia; MM: Mieloma Múltiplo.

5.11 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA ABCB1/PGP

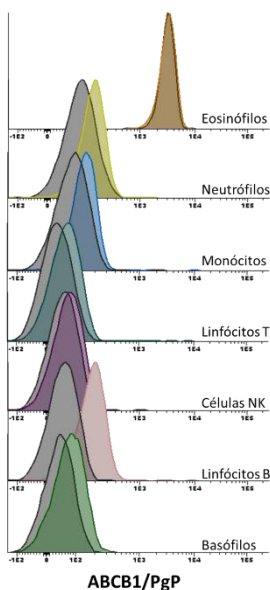
Semelhante ao caso da ABCC1/MRP1, a ABCB1/PGP não é um alvo de diagnóstico, mas sim de prognóstico (NORGAARD; OLESEN; HOKLAND, 2004). Nesse sentido, a expressão dessa proteína

(ABCB1/PGP) foi avaliada em células de SP e MO com ausência de neoplasias hematológicas e nas células dos pacientes com neoplasias de células B.

5.11.1 Células de sangue periférico de indivíduos saudáveis

Os resultados da Figura 57 e Tabela 30, mostram que apesar de apresentar diferença estatística em algumas células marcadas e não marcadas com a proteína ABCB1/PgP, na avaliação dos histogramas foi possível observar uma fraca expressão apenas nos linfócitos B, o que corrobora os dados da literatura, no qual foi observada expressão apenas em linfócitos (DUHEM; RIES; DICATO, 1996; SUGAWARA et al., 1997; GOTTESMAN; FOJO; BATES, 2002; MARZOLINI et al., 2004; VAN DER DEEN et al., 2005).

Figura 53 - Histogramas da caracterização do ABCB1/PgP nas células dos indivíduos saudáveis



Fonte: A autora, 2016.

Nota: células marcadas com ABCB1/PgP em cores e células não marcadas (controle negativo) em cinza. * $p < 0,05$, Test t (linfócitos B, eosinófilos, basófilos e células NK) e Mann-Whitney (monócitos, linfócitos T, e neutrófilos).

Tabela 30 - Médias das IFM das células não marcadas e das células B marcadas com ABCB1/PgP nos diferentes tipos celulares do SP dos indivíduos saudáveis

Tipo Celular	Média da IFM		p
	CNM	ABCB1/PgP	
Eosinófilos	2661	2929	0,318
Neutrófilos	135	191	0,065
Monócitos	92	143	<0,0001*
Basófilos	50	81	<0,0001*
Linfócitos B	55	187	<0,0001*
Linfócitos T	39	65	0,002*
Células NK	51	71	<0,0001*

Nota: IFM: Intensidade de fluorescência média; CNM: células não marcadas; *
p < 0,05

5.11.2 Células de medula óssea de indivíduos sem neoplasias hematológicas

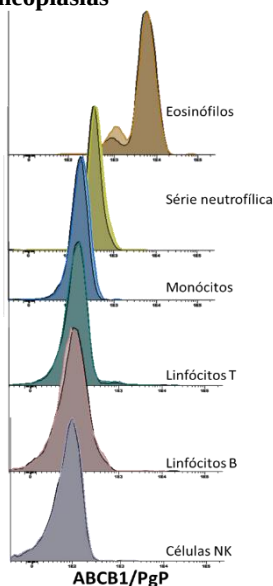
A expressão da ABCB1/PgP foi analisada nas células das amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias hematológicas, e, diferente do observado nas células das amostras de SP, na MO não foi observada expressão da ABCB1/PgP em nenhum dos tipos celulares avaliados (Figura 54, Tabela 31)

Tabela 31 - Médias das IFM da ABCB1/PgP nas amostras de MO dos indivíduos sem neoplasias hematológicas nos diferentes tipos celulares

Tipo Celular	Média da IFM		p
	CNM	ABCB1/PgP	
Eosinófilos	3146	3024	1
Série Neutrofílica	196	211	0,408
Monócitos	78	85	0,343
Linfócitos B	72	95	0,079
Linfócitos T	72	109	0,343
Linfócitos NK	37	42	0,686

Nota: IFM: Intensidade de fluorescência média; CNM: células não marcadas; *
p < 0,05

Figura 54 - Histogramas da caracterização da ABCB1/PgP nas células de MO dos indivíduos sem neoplasias



Fonte: A autora, 2017.

Nota: Células marcadas com ABCB1/PgP em cores e células não marcadas (controle negativo) em cinza. Teste t (série neutrofilica e linfócitos B) e Mann-Whitney (eosinófilos, monócitos, linfócitos NK e linfócitos T). * $p < 0,05$

5.11.3 Células de pacientes com neoplasias hematológicas

A análise da ABCB1/PgP foi realizada em células de 95 pacientes com neoplasia de células B (Tabela 32), dos quais 40 (42%) eram do gênero feminino (62 ± 17 anos) e 55 (58%) do gênero masculino (60 ± 16 anos). Com relação ao tipo de amostra, uma era biópsia de boca (palato), uma biópsia ocular (órbita), um aspirado de mandíbula, dois aspirados de linfonodo, seis biópsias de linfonodo, 25 SP e 59 aspirados de MO.

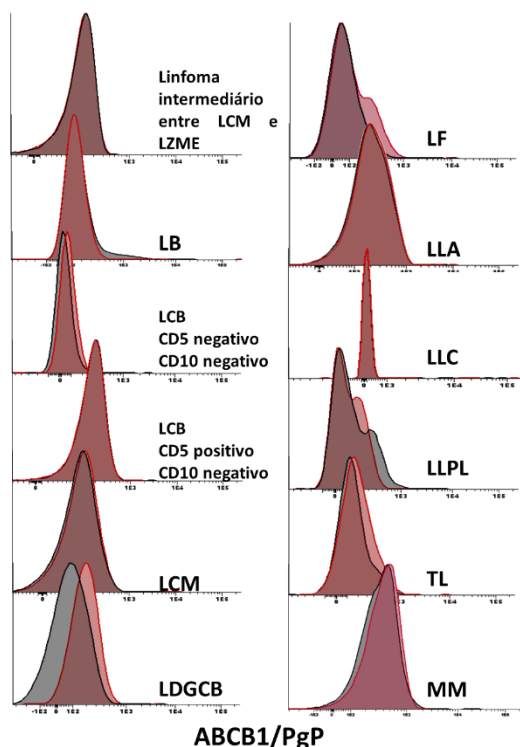
Tabela 32 - Número de casos de cada neoplasia para a ABCB1/PgP.

Neoplasia	Número de casos
Linfoma com características intermediárias entre LCM e LZME	1
Linfoma difuso de grandes células B CD5 positivo	1
Linfoma de células B CD5 positivo CD10 negativo	1
Linfoma da zona marginal	2
Linfoma linfoplasmocítico	2
Linfoma difuso de grandes células B CD10 positivo	2
Linfoma difuso de grandes células B CD10 negativo	2
Linfoma de células B CD5 negativo CD10 negativo	5
Tricoleucemia	5
Linfoma de Burkitt	6
Linfoma de células do manto	6
Leucemia linfoblástica aguda B	6
Linfoma folicular	8
Mieloma múltiplo	21
Leucemia linfocítica crônica	27

Nota: LCM: linfoma de células do manto; LZME: linfoma da zona marginal esplênica.

Da mesma forma como ocorreu com a ABCC1/MRP1, a expressão da proteína ABCB1/PgP não foi visualizada nas células de nenhum dos grupos de neoplasias de células, com exceção das células dos pacientes com LDGCB, nas quais foi observada expressão muito fraca (Figura 55). De fato, para avaliar a importância prognóstica dessas proteínas em pacientes com neoplasias de células B há necessidade de avaliar o genótipo por biologia molecular, apenas o fenótipo não parece ser o suficiente.

Figura 55 - Histogramas representativos da comparação da expressão entre as células não marcadas e as células dos pacientes com neoplasias de células B no marcador ABCB1/PgP



Fonte: A autora, 2017.

Nota: Em cinza células não marcadas; em vermelho, células B neoplásicas: LB: Linfoma de Burkitt; LCB: Linfoma de Células B; LCM: Linfoma de células do manto; LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B; LF: Linfoma folicular; LLA: Leucemia linfoblástica aguda; LLC: Leucemia linfocítica crônica; LLPL: linfoma linfoplasmocítico; LZME: linfoma da zona marginal esplênica; TL: tricoleucemia; MM: Mieloma Múltiplo.

Na análise estatística, não se evidenciou diferença entre os grupos com relação a expressão da proteína ABCB1/PgP (Kruskal-Wallis, $p = 0,08$).

Poucos estudos avaliaram a expressão das proteínas de resistência em linfomas pois a maioria dos estudos avaliou em células de pacientes com leucemias agudas, inclusive o nosso grupo de pesquisa (MORAES et al., 2012; MORAES et al., 2013). Com relação a NCBM, foi encontrado o estudo de Miller e colaboradores (1991), que avaliou a expressão dessa proteína, por imunohistoquímica, 42 pacientes com linfomas (antes do tratamento), e a expressão foi detectada em apenas um caso, o qual tinha linfoma de células T. Esse mesmo estudo avaliou 11 biópsias de pacientes selecionados para um estudo de resistência à fármacos e sete amostras (dois linfomas de Hodgkin e cinco linfomas de grau intermediário) apresentaram positividade para a ABCB1/PgP (MILLER et al., 1991). Diferentemente do observado no estudo de Miller e colaboradores, no presente estudo apenas o grupo LDGCB (um linfoma de alto grau) apresentou fraca expressão de ABCB1/PgP.

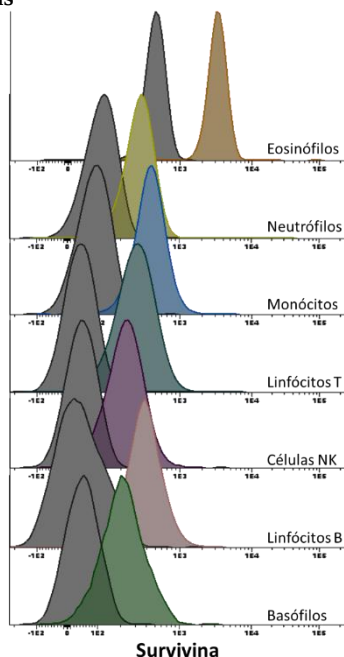
5.12 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA SURVIVINA

A proteína survivina é observada em vários tipos de neoplasias, inclusive nas hematológicas (MORI et al., 2002; CONG; HAN, 2004; ESH et al., 2011), no entanto, poucos estudos têm demonstrado a importância dessa proteína para o diagnóstico e avaliação prognóstica em NCBM. Assim, neste trabalho foi avaliada a expressão desse marcador em células de SP e nas células dos pacientes com NCBM.

5.12.1 Células de sangue periférico de indivíduos saudáveis

Analisou-se o perfil de expressão da survivina nos eosinófilos, neutrófilos, monócitos, linfócitos (B e T), células NK e basófilos nas amostras de SP dos indivíduos saudáveis (controles) e pode-se observar que todas as células analisadas expressam survivina (Figura 56, Tabela 33). Esses resultados são diferentes daqueles descritos por Fukuda e Pelus (2006) que também avaliou a expressão da survivina em tecidos adultos normais e observaram a ausência de expressão nos neutrófilos maduros e expressão em neutrófilos imaturos. No entanto, as células neutrofílicas maduras podem expressar a survivina quando estimuladas *in vitro* ou em condições inflamatórias *in vivo*. Além disso, o estudo também observou que os linfócitos T no SP também podem expressar survivina (FUKUDA; PELUS, 2006).

Figura 56 - Histogramas da caracterização da survivina nas células dos indivíduos saudáveis



Fonte: A autora, 2016.

Nota: células marcadas com survivina em cores e células não marcadas (controle negativo) em cinza. * $p < 0,05$, Test t (monócitos, eosinófilos e neutrófilos) e Mann-Whitney (linfócitos B, linfócitos T, basófilos e células NK).

Tabela 33 - Médias das IFM das células não marcadas e das células B marcadas com survivina nos diferentes tipos celulares do SP dos indivíduos saudáveis

Tipo Celular	Média da IFM		p
	CNM	Survivina	
Eosinófilos	542	3325	<0,0001*
Neutrófilos	117	374	<0,0001*
Monócitos	91	493	<0,0001*
Basófilos	56	267	<0,0001*
Linfócitos B	38	420	<0,0001*
Linfócitos T	42	333	<0,0001*
Células NK	47	262	<0,0001*

Nota: IFM: Intensidade de fluorescência média; CNM: células não marcadas; * $p < 0,05$

5.12.2 Células de pacientes com neoplasias hematológicas

A análise da survivina foi realizada em células neoplásicas de 85 pacientes com neoplasia de células B (Tabela 34), dos quais 38 (32%) eram do gênero feminino (62 ± 20 anos) e 47 (68%) do gênero masculino (58 ± 18 anos). Com relação ao tipo de amostra, uma era biópsia de boca (palato), uma biópsia ocular (órbita), um aspirado de mandíbula, dois aspirados de linfonodo, quatro biópsias de linfonodo, 31 SP e 45 aspirados de MO.

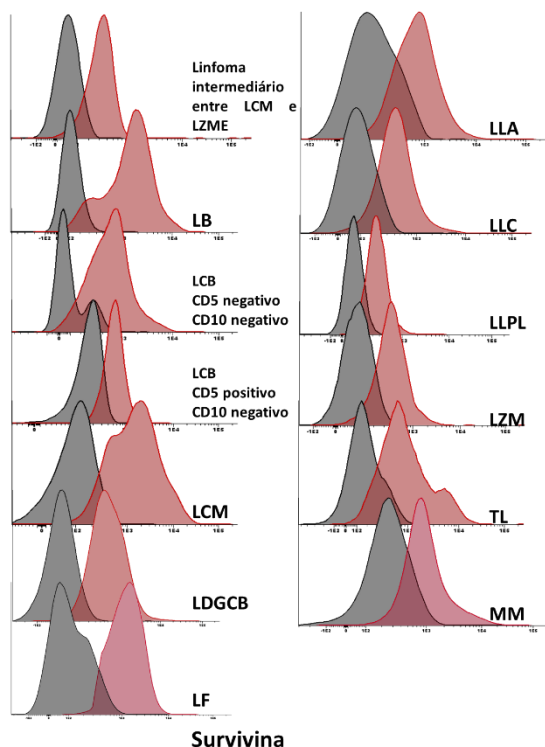
Tabela 34- Número de casos de cada neoplasia para a survivina

Neoplasia	Número de casos
Linfoma com características intermediárias entre LCM e LZME	1
Linfoma da zona marginal	1
Linfoma difuso de grandes células B CD5 positivo	1
Linfoma linfoplasmocítico	1
Linfoma de células B CD5 positivo CD10 negativo	1
Linfoma difuso de grandes células B CD10 positivo	2
Linfoma difuso de grandes células B CD10 negativo	3
Tricoleucemia	2
Linfoma de Burkitt	4
Linfoma de células B CD5 negativo CD10 negativo	4
Linfoma de células do manto	6
Linfoma folicular	6
Mieloma múltiplo	15
Leucemia linfoblástica aguda B	11
Leucemia linfocítica crônica	27

Nota: LCM: linfoma de células do manto; LZME: linfoma da zona marginal esplênica.

Como pode ser visualizado na Figura 57, a expressão da proteína survivina foi observada nas células neoplásicas de todos os grupos de neoplasias de células B.

Figura 57 - Histogramas representativos da comparação da expressão entre as células não marcadas e as células dos pacientes com neoplasias de células B no marcador survivina

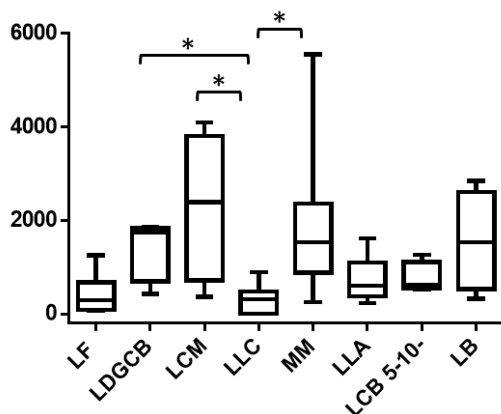


Fonte: A autora, 2017.

Nota: Em cinza células não marcadas; em vermelho, células B neoplásicas: LB: Linfoma de Burkitt; LCB: Linfoma de Células B; LCM: Linfoma de células do manto; LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B; LF: Linfoma folicular; LLA: Leucemia linfoblástica aguda; LLC: Leucemia linfocítica crônica; LLPL: linfoma linfoplasmocítico; LZM: linfoma da zona marginal; LZME: linfoma da zona marginal esplênica; LPL: leucemia pró-linfocítica; TL: tricoleucemia; MM: Mieloma Múltiplo.

A análise estatística revelou diferenças entre os grupos (Kruskall-Wallis, $p < 0,0001$) nos quais os casos de LCM e LLC ($p = 0,012$), LDGCB e LLC ($p = 0,019$) e LLC e MM ($p < 0,0001$) foram significativos no pós-teste de Dunn-Bonferroni (Figura 58).

Figura 58 - Comparação da expressão da survivina entre as diferentes neoplasias avaliadas no estudo



Fonte: A autora, 2017.

Nota: LF: Linfoma folicular; LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B; LCM: Linfoma de células do manto; LLC: Leucemia linfocítica crônica; MM: Mieloma Múltiplo; LLA: Leucemia linfoblástica aguda; LCB: Linfoma de Células B CD5 negativo CD10 negativo; LB: Linfoma de Burkitt.

A maioria dos estudos relacionados à survivina é realizado em amostras de tumores sólidos, os quais mostram correlação entre a superexpressão da survivina e o curso clinicamente desfavorável da doença, resistência a fármacos, pior prognóstico e menor sobrevida (AHMED et al., 2012; MORAES, 2013). Existem poucas informações referentes a superexpressão da survivina em pacientes com linfomas, e os dados existentes foram obtidos por meio de avaliação da expressão da proteína por imunohistoquímica (MAZUR et al., 2004; MARKOVIC et al., 2012).

O estudo de Ambrosini, Adida e Altieri (1997) observou a expressão da survivina em 50% dos linfomas de alto grau (centroblásticos e imunoblásticos) e ausência nos linfomas de baixo grau (linfocíticos). O estudo de Adida e colaboradores (2000) analisou a expressão da survivina, por imunohistoquímica, em 222 casos de LDGCB (96% centroblástico e 4% imunoblástico) e observou a expressão dessa proteína em 60% (134) dos casos. O estudo de Gu e Lin (2005) avaliou a expressão da survivina por imuno-histoquímica em 219 indivíduos com diversos subtipos de linfomas. Os resultados mostraram

que a survivina foi fortemente expressa em casos de LDGCB e LB e fracamente expressa nos casos de LF, MALT e LZM com diferenças significativas entre os dois grupos ($p < 0,01$). O estudo de Bedewy e colaboradores (2013) avaliou por imunohistoquímica 15 amostras de linfonodo com hiperplasia linfoide reativa e observou expressão de survivina em 2 casos (13,3%). Também analisou 80 casos de NCBM, e observou positividade para a survivina em 32 casos (40%). Com relação aos subtipos de NCBM, a survivina foi expressa em 44% dos LDGCB ($n = 50$), 18,7% dos LF ($n = 16$), 50% dos casos de LLC/LLPC ($n = 8$), 25% dos casos de LCM ($n = 4$) e 100% dos casos de LB ($n = 2$). Observaram também que a expressão nos linfomas agressivos (LDBCG, LB e LCM) foi mais intensa quando comparada aos indolentes (LF e LLC/LLPC). Diferente dos resultados apresentados pelos outros estudos, no presente estudo foi possível visualizar que todos os grupos de neoplasias apresentaram expressão para survivina (Figura 57).

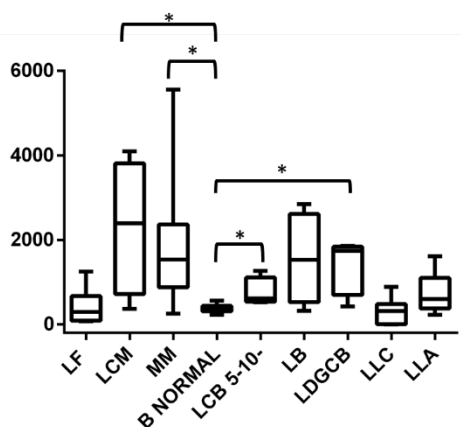
Para avaliar a superexpressão da survivina nas neoplasias de células B, as células B normais presentes no SP foram comparadas com as células B neoplásicas dos pacientes com neoplasias (Figura 59). Assim, foi possível observar diferenças entre os linfócitos B normais e as células neoplásicas no LCM ($p = 0,019$), no MM ($p = 0,001$), no LCB CD5 negativo CD10 negativo ($p = 0,011$) e no LDGCB ($p = 0,005$). Conforme abordado anteriormente, a maioria dos linfomas mimetizam os estágios normais de maturação das células B, e um dos critérios de classificação se baseia na expressão fenotípica, no estágio de diferenciação e na localização no linfonodo das células B neoplásicas (Figura 3). Uma limitação da metodologia do estudo, foi comparar a superexpressão da survivina com as células B presentes no sangue periférico e não com células B de linfonodos. Isso se deve a dificuldade na obtenção de amostras de linfonodos não neoplásicas para serem utilizadas para comparação.

A metanálise realizada por He e colaboradores (2015) analisou 12 estudos que avaliaram a expressão da survivina em 885 casos de linfomas B e T por imunohistoquímica. Quando a análise foi estratificada entre as neoplasias de linhagens B e T, encontrou-se associação entre o prognóstico e a expressão de survivina apenas nos casos de NCBM. A associação pode não ter sido verificada nos casos de linfomas T devido ao baixo número amostral. Nos casos de NCBM, pacientes com superexpressão de survivina tiveram 1,55 vezes mais risco de pior prognóstico quando comparados com aqueles sem superexpressão de survivina. Embora o valor prognóstico da survivina já tenha sido investigado em NCBM os resultados ainda são conflitantes

devido a maioria dos estudos serem retrospectivos e possuírem diferentes padronizações metodológicas conferindo muita heterogeneidade aos estudos.

Os dados do presente estudo apontam que as neoplasias que apresentaram superexpressão de survivina (LCM, MM, LCB CD5 negativo CD10 negativo e LDGCB) merecem mais estudos avaliando-se os fatores envolvidos no prognóstico desses pacientes.

Figura 59 - Comparação da expressão da survivina entre os linfócitos B normais do SP e as diferentes neoplasias avaliadas no estudo



Fonte: A autora, 2017.

Nota: LF: Linfoma folicular; LCM: Linfoma de células do manto; MM: Mieloma Múltiplo; B normal: linfócitos B não neoplásicos; LCB: Linfoma de Células B CD5 negativo CD10 negativo; LB: Linfoma de Burkitt; LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B; LLC: Leucemia linfocítica crônica; LLA: Leucemia linfoblástica aguda.

6 CONCLUSÕES

Os resultados mais relevantes observados nesse estudo foram que:

- ✓ O CD361 é expresso em todas as células analisados no SP e na MO com perfil de expressão semelhante aos leucócitos no marcador pan-leucocitário CD45;
- ✓ A superexpressão da survivina foi observada em células neoplásicas nos casos de LCM, MM, LCB CD5 negativo CD10 negativo e LDGCB. São necessários mais estudos avaliando-se os fatores envolvidos no prognóstico desses pacientes.
- ✓ No SP, nenhum tipo celular avaliado expressou CD261. Nas amostras de MO expressão muito fraca em células da série neutrofílica, monócitos e linfócitos B e expressão moderada e homogênea nos plasmócitos. Houve diferença significativa entre todos os grupos de NCBM e o MM, referentes a expressão de CD261. Os resultados mostram que os plasmócitos normais expressam CD261 enquanto que os plasmócitos clonais perdem a expressão desse marcador. Dessa forma, a expressão do CD261 pode ser utilizada como ferramenta auxiliar no diagnóstico imunofenotípico de MM pois a significância do CD261 em auxiliar na separação entre plasmócitos normais e plasmócitos clonais contribui até mais que a expressão de CD19 e CD45;
- ✓ O CD262 apresentou fraca intensidade de expressão em neutrófilos, monócitos, linfócitos B e T e basófilos no SP e em neutrófilos, monócitos, linfócitos B e T/NK e plasmócitos na MO. Esse marcador foi útil no diagnóstico diferencial de neoplasias com necessidade de distinção diagnóstica (LCM e LDGCB CD10 negativo, LDGCB CD10 negativo e LLC);
- ✓ Finalmente, os dados apontam que o marcador mais eficiente para a distinção entre células normais e neoplásicas foi o CD261 e o marcador com maior utilidade no diagnóstico diferencial entre as NCBM foi o CD262.

7 PERSPECTIVAS

- ✓ Incluir os marcadores CD261 e CD262 na rotina do setor de Oncohematologia do HU/UFSC para aumentar o número de amostras analisadas.
- ✓ Avaliar a expressão de CD163 em relação ao estágio de maturação monocítico;
- ✓ Avaliar a ABCC1/MRP1 e a ABCB1/PgP por biologia molecular;
- ✓ Avaliar a survivina em mais casos de NCBM e analisar seu valor prognóstico.

REFERÊNCIAS

ABSI, A; HSI, E; KALAYCIO, M. Prolymphocytic Leukemia. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 6, p. 197–208, 2005.

ACUTO, O; MICHEL, F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signaling. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 12, p. 939-951, 2003.

AHMED, M. B.; SHEHATA, H. H.; MOUSSA, M. et al. Prognostic significance of survivin and tumor necrosis factor-alpha in adult acute lymphoblastic leukemia. **Clin Biochem**, v. 45, n. 1-2, p. 112-6, 2012.

AMBROSINI, G.; ADIDA, C.; ALTIERI, D. C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. **Nat Med.**, v. 3, n. 8, p. 917-21, 1997.

ANGELOPOULOU, M.K.; KALPADAKIS, C.; PANGALIS, G. A. et al. Nodal marginal zone lymphoma. **Leukemia & Lymphoma**, v. 55, n. 6, p.1240–1250, 2014.

ANSELL, S. M. Non-Hodgkin Lymphoma: Diagnosis and Treatment. **Mayo Clin.Proc.** v. 90, n. 8, p. 1152-1163, 2015.

AUAT, M. **Investigação da importância dos marcadores imunofenotípicos CD150 e CD307a para o diagnóstico de neoplasias de células linfoides B maduras.** 2017. 119 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Farmácia), Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

BARNA, G.; REINIGER, L.; TÁTRAI, P. et al. The cut-off levels of CD23 expression in the differential diagnosis of MCL and CLL. **Hematol Oncol**, v. 26, n. 3, p. 167–170, 2008.

BEDEWY, A.M.; ELGAMMAL, M. M.; BEDEWY, M. M.; EL-MAGHRABY, S. M. Assessing DcR3 expression in relation to survivin and other prognostic factors in B cell non-Hodgkin's lymphoma. **Ann Hematol.**, v. 92, n. 10, p.1359-67, 2013.

BÉGUELIN, W.; SAWH, S.; CHAMBWE, N. et al. IL10 receptor is a novel therapeutic target in DLBCLs. **Leukemia**, v. 29, n. 8, p. 1684-1694, 2015.

BEHM, F. G.; RAIMONDI, S. C.; SCHELL, M. J. et al. Lack of CD45 Antigen on Blast Cells in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Is Associated With Chromosomal Hyperdiploidy and Other Favorable Prognostic Features. **Blood**, v. 79, n. 4, p. 1011-1016, 1992.

BENSCHOP, R.; WEI, T.; NA, S. Tumor necrosis factor receptor superfamily member 21: TNFR-related death receptor-6, DR6. **Adv Exp Med Biol.**, v. 647, p. 186-94, 2009.

BERGER, F.; TRAVERSE-GLEHEN, A.; FELMAN, P. et al. Clinicopathologic Features of Waldenström's Macroglobulinemia and Marginal Zone Lymphoma: Are They Distinct or the Same Entity?. **Clinical Lymphoma**, v. 5, n. 4, p. 220-224, 2005.

BHAT, S.; CZUCZMAN, M.S. Galiximab: a review. **Expert Opin Biol Ther.**, v. 10, n. 3, p. 451-458, 2010.

BOHN, O. L.; MARAGULIA, J. C.; CRISPIN, H. et al. Tumor associated macrophage expression, CD163, is associated with poorer outcome in diffuse large B-cell lymphoma, **Blood**, v. 120, p. 1583, 2012.

BORST, P.; EVERS, R.; KOOL, M. et al. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. **J Natl Cancer Inst**, v. 92, n. 16, p. 1295-1302, 2000.

BÖTTCHER, S.; RAWSTRON, A.; LUCIO, P. et al. Section 8. Antibody Panel For B-Cell Chronic Lymphoproliferative Diseases (B-CLPD). In: VAN DONGEN, J. J. M.; LHERMITTE, L.; BÖTTCHER, S. et al.; EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. **Leukemia**, v. 26, p. 1908–1975, 2012.

BUECHLER, C.; RITTER, M.; ORSÓ, E. et al. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. **J Leukoc Biol.**, v. 67, n. 1, p. 97-103, 2000.

CABEZÓN, R.; SINTES, J.; LLINÀS, L. BENITEZ-RIBAS, D. Analysis of HLDA9 mabs on plasmacytoid dendritic cells. **Immunol Lett.**, v. 134, n. 2, p. 167-173, 2011.

CHAPEROT, I.; PLUMAS, J.; JACOB, MC. et al., Functional expression of CD80 and CD86 allows immunogenicity of malignant B cells from non-Hodgkin's lymphomas. **Experimental Hematology**, n. 27, p. 479-488, 1999.

CHAUFFAILLE, M. L. L. F. **Diagnósticos em hematologia**. Ed Manole: São Paulo, 2016.

CHEN, W.; LUU, H. S. Immunophenotyping by Multiparameter Flow Cytometry. **Methods Mol Biol.**, v. 1633, p. 51-73, 2017.

COLE, S. P.; DEELEY, R. G. Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. **Trends PharmacolSci**, v. 27, n. 8, p. 438-46, 2006.

CONG, X. L.; HAN, Z. C. Survivin and leukemia. **Int J Hematol.**, v. 80, n. 3, p. 232-238, 2004.

CORALLINI, F.; MILANI, D.; NICOLIN, V. et al., TRAIL, caspases and maturation of normal and leukemic myeloid precursors. **Leukemia & Lymphoma**, v. 47, n. 8, p. 1459 - 1468, 2006.

CRAIG, F.E.; FOON, K.A. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. **Blood.**, v. 111, n. 8, p. 3941-67, 2008.

CRAIG, W.; POPPEMA, S.; LITTLE, M. T. et al. CD45 isoform expression on human haemopoietic cells at different stages of development. **Br J Haematol.**, v. 88, n. 1, p. 24-30, 1994.

DAKAPPAGARI, N.; HO, S.N.; GASCOYNE, R.D. et al. CD80 (B7.1) is expressed on both malignant B cells and nonmalignant stromal cells in non-Hodgkin lymphoma. **Cytometry B ClinCytom.** v.82, n. 2, p. 112-119, 2012.

DEAN, M.; HAMON, Y.; CHIMINI, G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. **J Lipid Res**, v. 42, n. 7, p. 1007-17, 2001.

DEELEY, R. G.; WESTLAKE, C.; COLE, S. P. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. **PhysiolRev**, v. 86, n. 3, p. 849-99, 2006.

DELFA, S. B. **Nuevas estrategias inmunofenotípicas aplicadas al diagnóstico y clasificación de síndromes linfoproliferativos crónicos**. 2011. 180 f. Tese (Doutorado em Medicina)- Universidad de Salamanca, Salamanca, 2011.

DORFMAN, D. M.; SCHULTZE, J. L.; SHAHSAFAEI, A.; et al. In vivo expression of B7-1 and B7-2 by follicular lymphoma cells can prevent induction of T-cell anergy but is insufficient to induce significant T-cell proliferation, **Blood**, v. 1, n. 90, p. 4297-4306, 1997.

DOGAN, A.; DU, M.Q.; AIELLO, A.; et al. Follicular lymphomas contain a clonally linked but phenotypically distinct neoplastic B-cell population in the interfollicular zone. **Blood**, v. 15, n. 91, p. 4708-4714, 1998.

DUHEM, C.; RIES, F.; DICATO, M. What Does Multidrug Resistance (MDR) Expression Mean in the Clinic? **Oncologist**, v. 1, n. 3, p. 151-158, 1996.

DUNGARWALLA, M.; MATUTES, E.; DEARDEN, C. E.; Prolymphocytic leukaemia of B- and T-cell subtype: state-of-the-art paper. **European Journal of Haematology**, v. 80, p. 469-476, 2008.

ELNENAEI, M. O.; JADAYEL, D. M.; MATUTES, E. et al. Cyclin D1 by flow cytometry as a useful tool in the diagnosis of B-cell malignancies. **Leuk Res.**, v. 25, n. 2, p. 115-23, 2001.

ESH, A. M.; ATFY, M.; AZIZI, N. A.; EL NAGGAR, M. M.; KHALIL, E. E.; SHERIEF, L. Prognostic significance of survival in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Indian J Hematol Blood Transfus.**, v. 27, n. 1, p. 18-25, 2011.

FANONI, D.; TAVECCHIO, S.; RECALCATI, S. et al. New monoclonal antibodies against B-cell antigens: possible new strategies for diagnosis of primary cutaneous B-cell lymphomas. **ImmunolLett.**, v. 134, n. 2, p.157-160, 2011.

FAURE, G. C.; AMSELLEM, S.; ARNOULET, C. et al. Mutual benefits of B-ALL and HLDA/HCDM HLDA 9th Barcelona 2010. **ImmunolLett.**, v. 134, n. 2, p. 145-149, 2011.

FERLAY, J.; BRAY, F.; FORMAN, D. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: **IARC Cancer Base**, n. 10, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int. J. Cancer**, v. 136, p. E359–E386, 2015.

FLORES-MONTERO, J.; ALMEIDA, J.; PEREZ, J.J., et al. Section 2. Lymphoid Screening Tube (LST). *In*: VAN DONGEN, J. J. M; LHERMITTE, L.; BÖTTCHER, S. et al.; EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. **Leukemia**, v. 26, p. 1908–1975, 2012.

FREEDMAN, A. S. Follicular lymphoma: 2014 update on diagnosis and management. **American Journal of Hematology**, v. 89, n. 4, p. 429-436, 2014.

FREITAS, R. A.; BARROS, S. S. L.V.; QUINDERE, L. B. Linfoma de Burkitt oral: relato de caso. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, São Paulo, v.74, n. 3, 2008.

FUKUDA, S.; PELUS, L.M. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. **Mol Cancer Ther.**, v. 5, p. 1087-98, 2006.

GOLDANIGA, M.; FERRARIO, A.; CORTELAZZO, S. et al. A multicenter retrospective clinical study of CD5/CD10 negativonegative chronic B cell leukemias. **Am J Hematol.**, v. 83, n. 5, p. 349-354, 2008.

GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 1, p. 48-58, 2002.

GREENWALD, R.J.; FREEMAN, G.J.; SHARPE, A.H. The B7 family revisited. **Annu Rev Immunol**. v. 23, p. 515-548, 2005.

GU, X.; LIN, H.; SHAO, J. et al. Analysis of Survivin Expression in the Subtypes of Lymphoma, **The Chinese-German Journal of Clinical Oncology**, v. 4, n. 4, p. 238-243, 2005.

HALLEK, M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. **American Journal of Hematology**, v. 90, n. 5, May 2015 p. 447-460.

HANSON, C.A.; MORICE, W. G. The clinical and laboratory approach to the CD5/CD10 negative B-cell chronic lymphoproliferative leukemias. **Am J Hematol.**, v. 83, n. 5, p: 347-348, 2008.

HE, C.; LIU, Z.; JI, J.; ZHU, H. Prognostic value of survivin in patients with non-Hodgkin's lymphoma: a meta-analysis. **Int J Clin Exp Med.**, v. 8, n. 4, p. 5847-54, 2015.

HODGKIN. On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. **Med Chir Trans**, v. 17, p. 68-114, 1832.

HOFFBRAND, A. V.; et al. **Fundamentos em Hematologia**. 4th. Porto Alegre: Artmed 2004. 358.

HUSSAINI, M.O.; KREISEL, F.H.; HASSAN, A. et al. CD4-positive diffuse large b-cell lymphoma: a variant with aggressive clinical potential. **World J Methodol.**, v. 26, n. 6, p. 181-6, 2016.

HUSSEIN, S; GILL, K. Z.; SIRECI, A. N. et al. Aberrant T-cell antigen expression in B lymphoblastic leukaemia. **British Journal of Haematology**, v.155, n. 4, p. 449-456, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva,

Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância.- Rio de Janeiro: Inca, 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>>. Acesso em: 02 fev 2016.

JAFFE, E. S.; PITTALUGA, S. Aggressive B-Cell Lymphomas: A Review of New and Old Entities in the WHO Classification. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**. v. 2011, p. 506-514, 2011.

JAIN, P.; GIUSTOLISI, G. M.; ATKINSON, S. et al. Detection of cyclin D1 in B cell lymphoproliferative disorders by flow cytometry. **J Clin Pathol.**, v. 55, n. 12, p. 940-945, 2002.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M. et al. Global Cancer Statistics, **CA Cancer J Clin**, v. 61, p. 69–90, 2011.

JEONG, T.D.; PARK, C. J.; SHIM, H. et al. Simplified flow cytometric immunophenotyping panel for multiple myeloma, CD56/CD19/CD138(CD38)/CD45, to differentiate neoplastic myeloma cells from reactive plasma cells. **Korean J Hematol.**, v. 47, n. 4, p. 260–266, 2012.

KALINA, T.; FLORES-MONTERO, J.; VAN DER VELDEN, V. H. J. et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. **Leukemia**, v. 26, p. 1986–2010, 2012.

KAPOOR, P.; PALUDO, J; VALLUMSETLA, N. et al. Waldenström macroglobulinemia: What a hematologist needs to know. **Blood Reviews**, v. 29, n. 5, p. 301–319, 2015.

KONOPLEV, S.; MEDEIROS, L.; BUESO-RAMOS, C.E. et al. Immunophenotypic profile of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macroglobulinemia, **Am J Clin Pathol.**, v. 124, n. 3, p. 414-20, 2005.

KÜPPERS, R.; ENGERT, A.; HANSMANN, M.L. Hodgkin lymphoma. **J Clin Invest**, v. 122, n. 10, p. 3439-47, 2012.

LESLIE, E. M.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 204, n. 3, p. 216-37, 2005.

LIN, P.; MOLINA, T. J.; COOK, J. R. et al. Lymphoplasmacytic Lymphoma and Other Non-Marginal Zone Lymphomas With Plasmacytic differentiation. **Am J ClinPathol**, v. 136, n. 2, p. 195-210, 2011.

LLINÀS, L.; LÁZARO, A.; DE SALORT, J. et al. Expression profiles of novel cell surface molecules on B-cell subsets and plasma cells as analyzed by flow cytometry. **Immunol. Lett.**, v. 134, n. 2, p. 113-21, 2011.

LORAND-METZE, I. LLC: critérios diagnósticos, imunofenotipagem e diagnóstico diferencial. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 27, n.4, p. 233-235, 2005.

MACEY, M. G. Principles of Flow Cytometry In: MACEY, M. G. **Flow Cytometry: Principles and Applications**. Totowa: Humana Press Inc., 2007.

MARKOVIC, O.; MARISAVLJEVIC, D.; CEMERIKIC-MARTINOVIC, V. et al. Survivin expression in patients with newly diagnosed nodal diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). **Med Oncol.**, v. 29, n. 5, p. 3515-3521, 2012.

MARZOLINI, C.; PAUS, E.; BUCLIN, T. et al. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. **ClinPharmacolTher**, v. 75, n. 1, p. 13-33, 2004.

MASON, E. F.; POZDNYAKOVA, O.; LI, B. et al. Flow Cytometric Patterns of CD200 and CD1d Expression Distinguish CD10 negativoNegative, CD10 negativoNegative Mature B-Cell Lymphoproliferative Disorders. **Am J Clin Pathol.**, v. 148, n. 1, p. 33-41, 2017.

MATESANZ-ISABEL, J.; SINTES, J.; LLINÀS, L. et al. New B-cell CD molecules. **Immunol Lett**, v. 134, n. 2, p. 104-12, 2011.

MATUTES, E.; PARRY-JONES, N.; BRITO-BABAPULLE, V. et al. The leukemic presentation of mantle-cell lymphoma: disease features and prognostic factors in 58 patients. **Leuk Lymphoma**. v. 45, n. 10, p.2007-2015, 2004.

MATUTES, E.; MARTÍNEZ-TRILLOS, A.; CAMPO, E. Hairy cell leukaemia-variant: Disease features and treatment. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 28, n. 4, p. 253-263, 2015.

MAZUR, G.; HALÓN, A.; WRÓBEL, T. et al. Survivin expression in lymph nodes, affected by lymphoma and reactive hyperplasia. **RoczAkad Med Bialymst.**,v. 49, Suppl. 1, p. 76-78, 2004.

MERCHIONNE, F.; PROCACCIO, P.; DAMMACCO, F. Waldenström's macroglobulinemia. An overview of its clinical, biochemical, immunological and therapeutic features and our series of 121 patients collected in a single center. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 80, n. 1, p. 87–99, 2011.

MESQUITA JUNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; CRUVINEL, W. M.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P. Immune system - part II: basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 5, p. 552-580, 2010.

MILLER, T.P.; GROGAN, T. M.; DALTON, W. S. P-glycoprotein expression in malignant lymphoma and reversal of clinical drug resistance with chemotherapy plus high-dose verapamil. **J Clin Oncol.**, v. 9, n. 1, p. 17-24, 1991.

MIR, M. A. Chapter 5- Costimulation in Lymphomas and Cancers, **Developing Costimulatory Molecules for Immunotherapy of Diseases**, p. 185–254, 2015.

MORAES, A. C. R. **Estudo da Associação de Genes e Proteínas de Resistência a Múltiplos Fármacos (*abcb1/ABCB1*, *abcc1/ABCC1* e *lrp/LRP*) com Marcadores Moleculares em Pacientes Portadores de Leucemias Agudas**. 2013. 218 f. Tese (Doutorado em Farmácia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

MORAES, A. C.; MARANHO, C. K.; RAUBER, G. S.; SANTOS-SILVA, M. C. Importance of detecting multidrug resistance proteins in acute leukemia prognosis and therapy. **J Clin Lab Anal.** v. 27, n. 1, p. 62-71, 2013

MORAES, A. C.; LICÍNIO, M. A.; ZAMPIROLO, J. A. EVALUATION of multidrug resistance in 46 newly diagnosed patients with acute leukemia. **Hematology.**, v. 17, n. 2, p. 59-65, 2012.

MOREAU, E.J.; MATUTES, E.; A'HERN, R.P. et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). **Am J ClinPathol.**v.108, p.378–382, 1997.

MORI, A; WADA, H.; NISHIMURA, Y; OKAMOTO, T; TAKEMOTO, Y; KAKISHITA, E. Expression of the antiapoptosis gene survivin in human leukemia. **Int J Hematol.**, v. 75, n. 2, p. 161-165, 2002.

MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. **Immunol Rev.**, v. 226, p. 205-218, 2008.

NABHAN, C.; ROSEN, S. T. Chronic Lymphocytic Leukemia A Clinical Review. **JAMA**, v. 312, n. 21, p. 2265-2276, 2014.

NADERI, N.; YANG, D. T. Lymphoplasmacytic lymphoma and Waldenström macroglobulinemia. **Arch Pathol Lab Med.**, v. 137, n. 4, p. 580-585, 2013.

NCCLS. **Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Lymphocytes; Approved Guideline.** NCCLS document H42-A (ISBN 1-56238-364-7). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087 USA, 1998.

NGUYEN, T. T.; SCHWART, E. J.; WEST, R. B. et al. Expression of CD163 (hemoglobin scavenger receptor) in normal tissues, lymphomas, carcinomas, and sarcomas is largely restricted to the monocyte/macrophage lineage. **Am J SurgPathol.**, v. 29, n. 5, p. 617-624, 2005.

NOGAI, H; DÖRKEN, B.; LENZ, G. Pathogenesis of Non-Hodgkin's Lymphoma. **Journal of Clinical Oncology**. v. 29, n. 14, p. 1803-1811, 2011.

NORGAARD, J. M.; OLESEN, L. H.; HOKLAND, P. Changing picture of cellular drug resistance in human leukemia. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 50, n. 1, p. 39-49, 2004.

NOWELL, P.C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. **Cancer Res.**, v. 20, p. 462-466, 1960.

ONOFRE, G.; KOLÁČKOVÁ, M.; JANKOVICOVÁ, K.; KREJSEK, J. Scavenger receptor CD163 and its biological functions. **Acta Medica**, v. 52, n. 2, p. 57-61, 2009.

OWEN, R.G.; BARRANS, S.L.; RICHARDS, S.J. et al. Waldenström macroglobulinemia: development of diagnostic criteria and identification of prognostic factors. **Am J Clin Pathol.**, v. 116, p. 420-428, 2001.

PAIVA, B.; ALMEIDA, J.; PÉREZ-ANDRÉS, M. et al. Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. **Cytometry B Clin Cytom.**, v. 78, n. 4, p. 239-52, 2010.

PAN, G.; BAUER, J. H.; HARIDAS, V. et al. Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. **FEBS Lett.** v. 431, n. 3, p. 351-6, 1998.

PEREZ-ANDRES, M.; PAIVA, B.; NIETO, W.G.; et al. Human peripheral blood B-cell compartments: A crossroad in B-cell traffic. **Cytometry Part B**, v. 78B, p. S47–S60, 2010.

PERFETTO, S.P.; CHATTOPADHYAY, P. K.; ROEDERER, M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. **Nat Rev Immunol.**, v. 4, n. 8, p. 648-55, 2004.

POPE, B.; BROWN, R.D.; GIBSON, J. et al. B7-2-positive myeloma: incidence, clinical characteristics, prognostic significance, and implications for tumor immunotherapy. **Blood**, v. 15, n. 96, p. 1274-1279, 2000.

QUEST, G. R.; JOHNSTON, J. B. Clinical features and diagnosis of hairy cell leukemia. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 28, n. 4, p. 180-192, 2015.

RAJAB, A.; AXLER, O.; LEUNG, J.; WOZNIAK, M.; PORWIT, A. Ten-color 15-antibody flow cytometry panel for immunophenotyping of lymphocyte population. **Int J Lab Hematol.**, v. 39, Suppl 1, p. 76-8, 2017.

RAMOS-MEDINA, R.; MONTES-MORENO, S.; MAESTRE, L.; et al. Immunohistochemical analysis of HLDA9 Workshop antibodies against cell-surface molecules in reactive and neoplastic lymphoid tissues. **Immunol Lett.**, v. 134, n. 2, p. 150-156, 2011.

RANHEIM, E. A.; KIPPS, T. J. Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. **J Exp Med.**, v. 177, n. 4, p. 925-35, 1993.

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

REID, R.; FRIEDBERG, J. W. Management of Marginal Zone Lymphoma. **Oncology Journal**. v. 15, 2013.

RÖLLIG, C.; KNOP, S.; BORNHÄUSER, M. Multiple myeloma. **Lancet**, v. 30, n. 385(9983), p. 2197-2208, 2015

ROMAN, E.; SMITH, A.G. Epidemiology of lymphomas. **Histopathology**, v. 58, p. 4-14, 2011.

SALES, M.M.; FERREIRA, S. I. A. C. P.; IKOMA, M.R. et al. Diagnosis of chronic lymphoproliferative disorders by flow cytometry using four-color combinations for immunophenotyping: A proposal of the brazilian group of flow cytometry (GBCFLUX). **Cytometry B Clin Cytom.**, v. 92, n. 5, p. 398-410, 2017.

SANDES, A.F.; CHAUFFAILLE, M.L.; OLIVEIRA, C. R.; MAEKAWA, Y.; TAMASHIRO, N.; TAKAO, T. T.; RITTER, E. C.; RIZZATTI, E. G. CD200 has an important role in the differential diagnosis of mature B-cell neoplasms by multiparameter flow cytometry. **Cytometry Part B (Clinical Cytometry)**, v. 86B, p. 98–105, 2014.

SASAROLI, D.; GIMOTTY, P. A.; PATHAK, H.B. et al. Novel surface targets and serum biomarkers from the ovarian cancer vasculature. **Cancer Biol Ther.** v. 12, n. 3, p. 169-180, 2011.

SEEGMILLER, A. C.; KROFT, S. H.; KARANDIKAR, N. J.; MCKENNA, R. W. Characterization of Immunophenotypic Aberrancies in 200 Cases of B Acute Lymphoblastic Leukemia. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 132, n. 6, p. 940–949, 2009.

SHAJI-KUMAR, M. D.; KIMLINGER, T. B. A.; MORICE, W. Immunophenotyping in multiple myeloma and related plasma cell disorders, **Best Pract Res Clin Haematol.** Sep; v. 23, n. 3, p. 433–451, 2010.

SHANKLAND, K. R.; ARMITAGE, J. O.; HANCOCK, B. W. Non-Hodgkin lymphoma. **Lancet**, v. 380, p. 848- 857, 2012.

SHARPE, A.H.; ABBAS, A.K. T-cell costimulation—biology, therapeutic potential, and challenges, **N Engl J Med.**, v. 355, n. 10, p. 973-975, 2006.

STAUD, F.; CECKOVA, M.; MICUDA, S.; et al. Expression and Function of P-Glycoprotein in Normal Tissues: Effect on Pharmacokinetics. **Methods Mol Biol.**, v. 596, p. 199-222, 2010.

STEIN, H. Hodgkin Lymphoma. In: PRESS, I. (Ed.). **Who classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. 4th Edition. Lyon: IARC Press, 2008. cap. 12, p.321 - 334.

SUGAWARA, I.; AKIYAMA, S.; SCHEPER, R. J.; et al. Lung resistance protein (LRP) expression in human normal tissues in comparison with that of MDR1 and MRP. **Cancer Lett.** v. 112, n. 1, p. 23-31, 1997.

SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L.; et al: **WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues.** International Agency for research on Cancer (IARC): Lyon, 2008. 4th., 158p.

SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L.; et al: **WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues.** International Agency for research on Cancer (IARC): Lyon, 2017. 4th revised.

SWERDLOW, S.H.; CAMPO, E.; PILERI, S.A.; et al. The 2016 revision of the World Health Organization (WHO) classification of lymphoid neoplasms. **Blood**. 2016. No prelo.

SZLISZKA, E.; MAZUR, B.; ZYDOWICZ, G.; CZUBA, Z.P.; KRÓL, W. TRAIL-induced apoptosis and expression of death receptor TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in bladder cancer cells. **Folia Histochem Cytobiol.**, v. 47, n. 4, p. 579-85, 2009.

TADMOR, T.; POLLIACK, A. Epidemiology and environmental risk in hairy cell leukemia. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 28, n. 4, 175-179, 2015.

TAYLOR, P.A.; LEES, C.J.; FOURNIER, S.; ALLISON, J.P.; SHARPE, A.H.; BLAZAR, B.R. B7 expression on T cells down-regulates immune responses through CTLA-4 ligation via T-T interactions [corrections]. **J Immunol**. v. 172, n. 1, p. 34-9, 2004.

TUNG, J. W.; HEYDARI, K.; TIROUVANZIAM, R.; et al. Modern Flow Cytometry: A Practical Approach. **Clin Lab Med.**, v. 27, n. 3, p. 453–468, 2007.

TUTE, R. D. A Review of Flow Cytometry and its Use in the Diagnosis and Management of Mature Lymphoid Malignancies, **Histopathology.**, v. 58, p. 90, 201.

VAN DEN HEUVEL M. M. et al. Regulation of CD 163 on human macrophages: crosslinking of CD163 induces signaling and activation. **J. Leukoc. Biol.**, v. 66, n. 5, p. 858-866, 1999.

VAN DER DEEN, M.; DE VRIES, E. G.; TIMENS, W.; et al. ATP-binding cassette (ABC) transporters in normal and pathological lung. **Respir Res**, v. 6, p. 59, 2005.

VAN DONGEN, J. J. M.; ORFAO, A. EuroFlow: Resetting leukemia and lymphoma immunophenotyping. Basis for companion diagnostics and personalized medicine. **Leukemia**, v. 26, n 9, p. 1899–1907, 2012A.

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

VAN LOCHEM, E. G.; VAN DER VELDEN, V.H.J.; WIND, J.G. H.K. et al. Immunophenotypic Differentiation Patterns of Normal Hematopoiesis in Human Bone Marrow: Reference Patterns for Age-Related Changes and Disease-Induced Shifts. **Cytometry Part B (Clinical Cytometry)**, v. 60B, p.1–13, 2004.

VITOLO, U.; FERRERI, A. J. M.; MONTOTO, S. Lymphoplasmacytic lymphoma–Waldenstrom’s macroglobulinemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 67, n. 2, p. 172–185, 2008.

VASILEVKO, V.; GHOCHIKYAN, A.; HOLTERMAN, M. J.; et al. CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) are Functionally Equivalent in the Initiation and Maintenance of CD41 T-Cell Proliferation after Activation with Suboptimal Doses of PHA. **DNA and cell biology**, v. 21, n. 3, 2002.

VOSE, J. M. Mantle cell lymphoma: 2015 update on diagnosis, risk-stratification, and clinical management. **American Journal of Hematology**, v. 90, n. 8, 2015.

WANG, M.; ZHANG, S.; CHUANG, SS. et al. Angioimmunoblastic T cell lymphoma: novel molecular insights by mutation profiling. **Oncotarget**, v. 8, n. 11, p. 17763–17770, 2017.

WOTHERSPOON, A.; ATTYGALLE, A.; MENDES, L. S. T. Bone marrow and splenic histology in hairy cell leukaemia. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 28, n. 4, p. 200–207, 2015

YANG, K.; MOONEY, C.; SPAHLINGER, G.; SCHUETZE, S.; ARIAS-PULIDO, H.; VERSCHRAEGEN, C.; GIMOTTY, P.; BUCKANOVICH, R. J. DR6 as a Diagnostic and Predictive Biomarker in Adult Sarcoma, **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e36525, 2012.

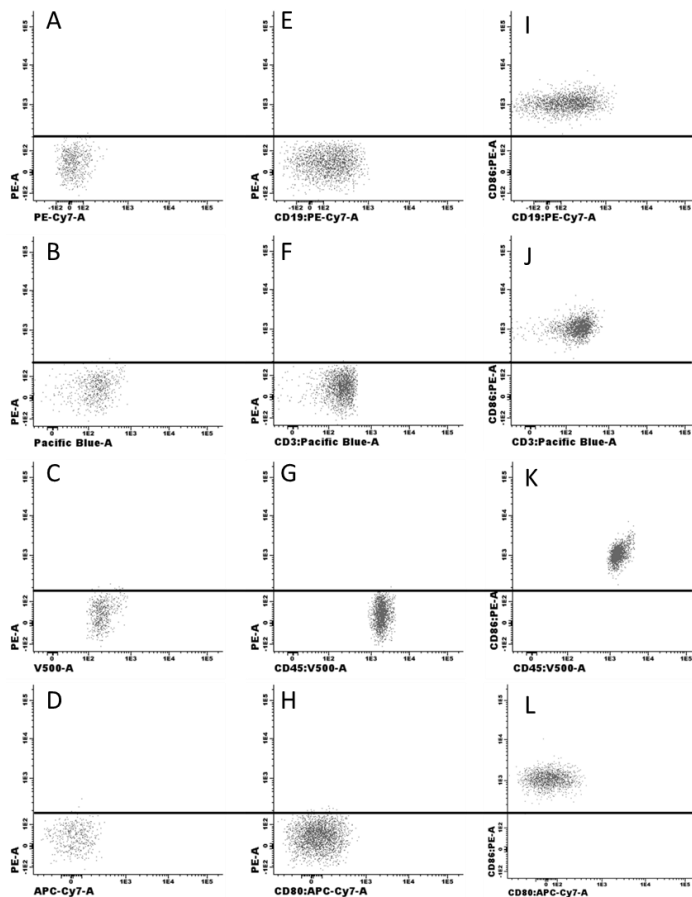
ZENG, L. LI, T. XU, D. C. et al. Death receptor 6 induces apoptosis not through type I or type II pathways, but via a unique mitochondria-dependent pathway by interacting with Bax protein, **J. Biol. Chem.**, v. 287, p. 29125- 29133, 2012.

ZENG, H.; WEI, Y.; XIE, M. et al. CD163 positivo Tumor Associated Macrophages Predict Inferior Outcome in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated with R-CHOP, **Blood**, v. 126, p. 5023, 2015.

ZERBINI, M. C. N.; SOARES, F. A.; MORAIS, J. C.; et al. Classificação dos tumores hematopoéticos e linfoides de acordo com a OMS: padronização da nomenclatura em língua portuguesa, 4^a edição. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 6, p. 643-648, 2011.

ZU, Y.; SHAHJAHAN, M.; CHANG, CC. Basic Principles of Flow Cytometry, In: Cagle, P. T.; Allen, T. C. **Basic Concepts of Molecular Pathology**, Springer Science: 2009.

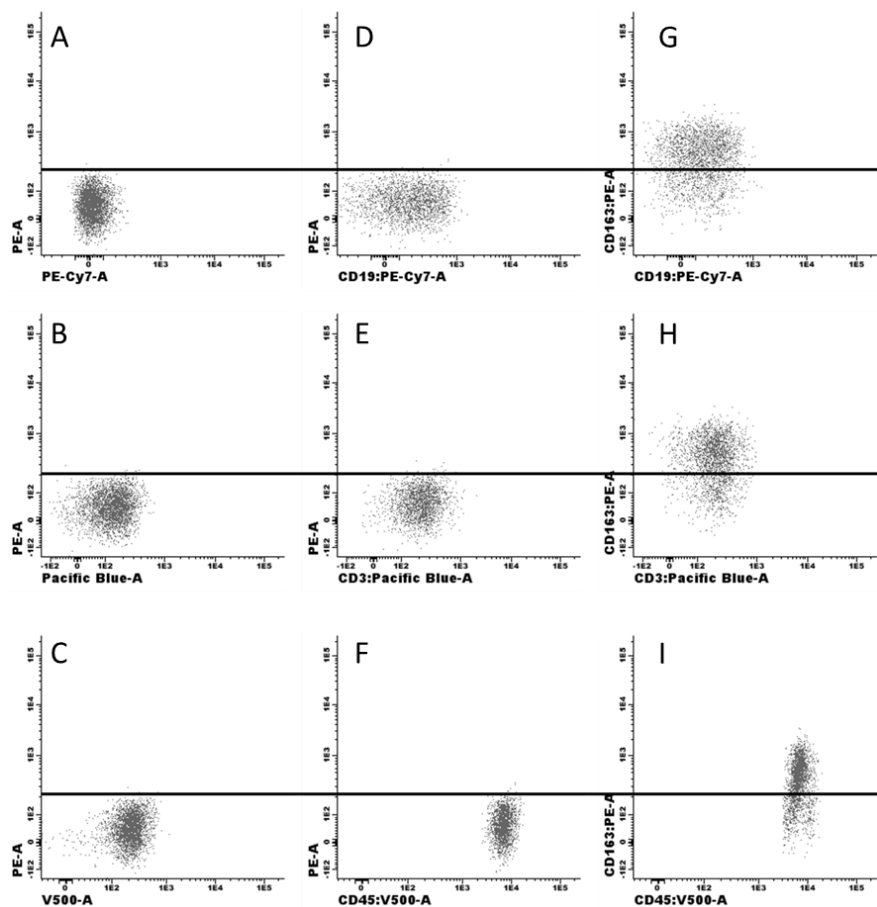
APÊNDICE A - CONTROLE FMO PARA O CD86



Fonte: A autora, 2016.

Nota: Paineis A, B, C e D: células não marcadas; Paineis E: células marcadas com CD19 Pe-Cy7; Paineis F: células marcadas com CD3 PB; Paineis G: células marcadas com CD45 V500; Paineis H: células marcadas com CD80 APC-Cy7; Paineis I: células marcadas com CD86 Pe e CD19 Pe-Cy7; Paineis J: células marcadas com CD86 Pe e CD3 PB; Paineis K: células marcadas com CD86 Pe e CD45 V500; Paineis L: células marcadas com CD86 Pe e CD80 APC-Cy7.

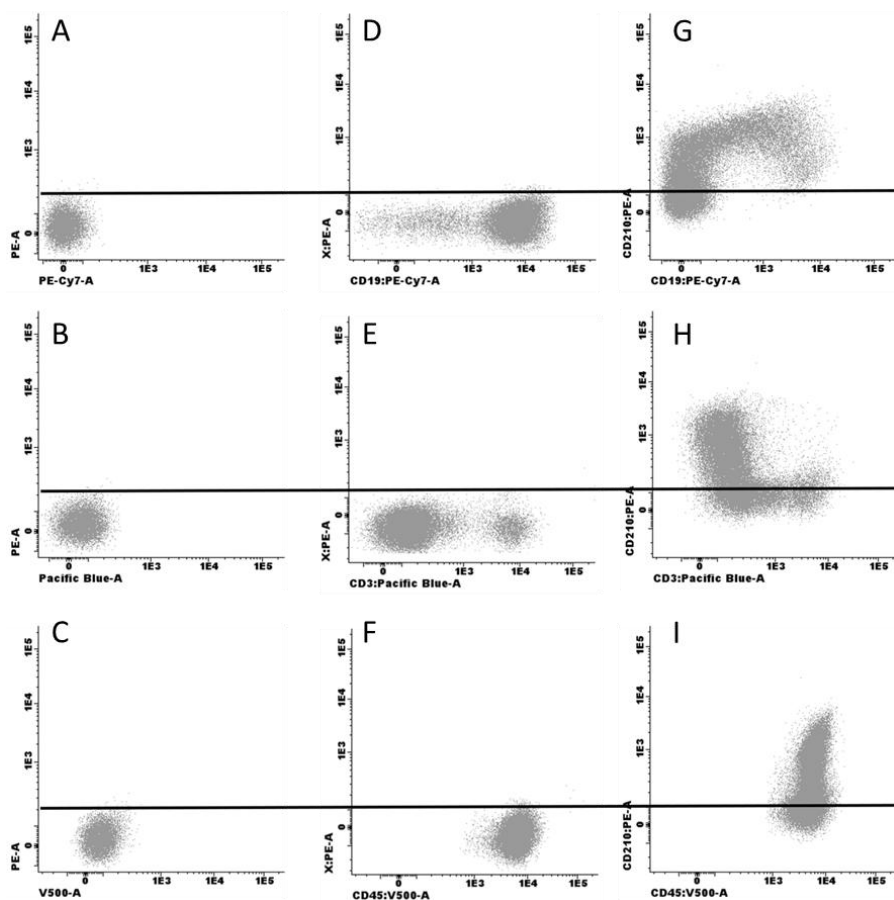
APÊNDICE B - CONTROLE FMO PARA O CD163



Fonte: A autora, 2016.

Nota: Painel A, B e C: células não marcadas; Painel D: células marcadas com CD19 Pe-Cy7; Painel E: Células marcadas com CD3 PB; Painel F: células marcadas com CD45 V500; Painel G: células marcadas com CD163 Pe e CD19 Pe-Cy7; Painel H: células marcadas com CD163 Pe e CD3 PB; Painel I: células marcadas com CD163 Pe e CD45 V500.

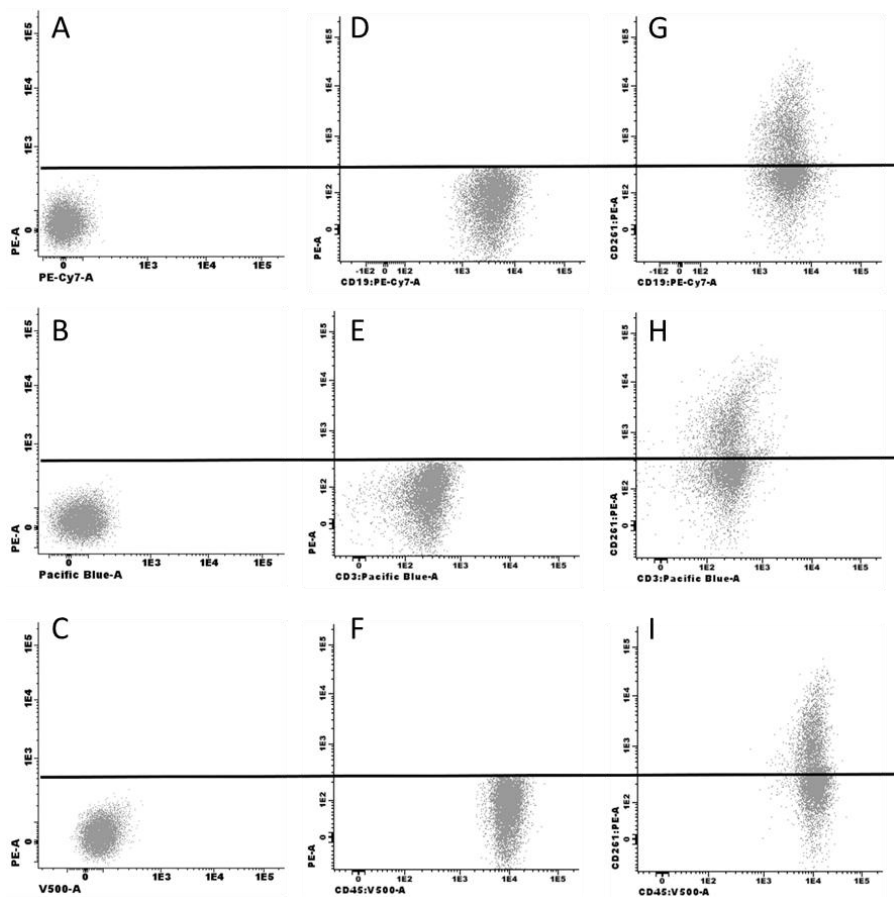
APÊNDICE C - CONTROLE FMO PARA O CD210A



Fonte: A autora, 2016.

Nota: Painel A, B e C: células não marcadas; Painel D: células marcadas com CD19 Pe-Cy7; Painel E: Células marcadas com CD3 PB; Painel F: células marcadas com CD45 V500; Painel G: células marcadas com CD210a Pe e CD19 Pe-Cy7; Painel H: células marcadas com CD210a Pe e CD3 PB; Painel I: células marcadas com CD210a Pe e CD45 V500.

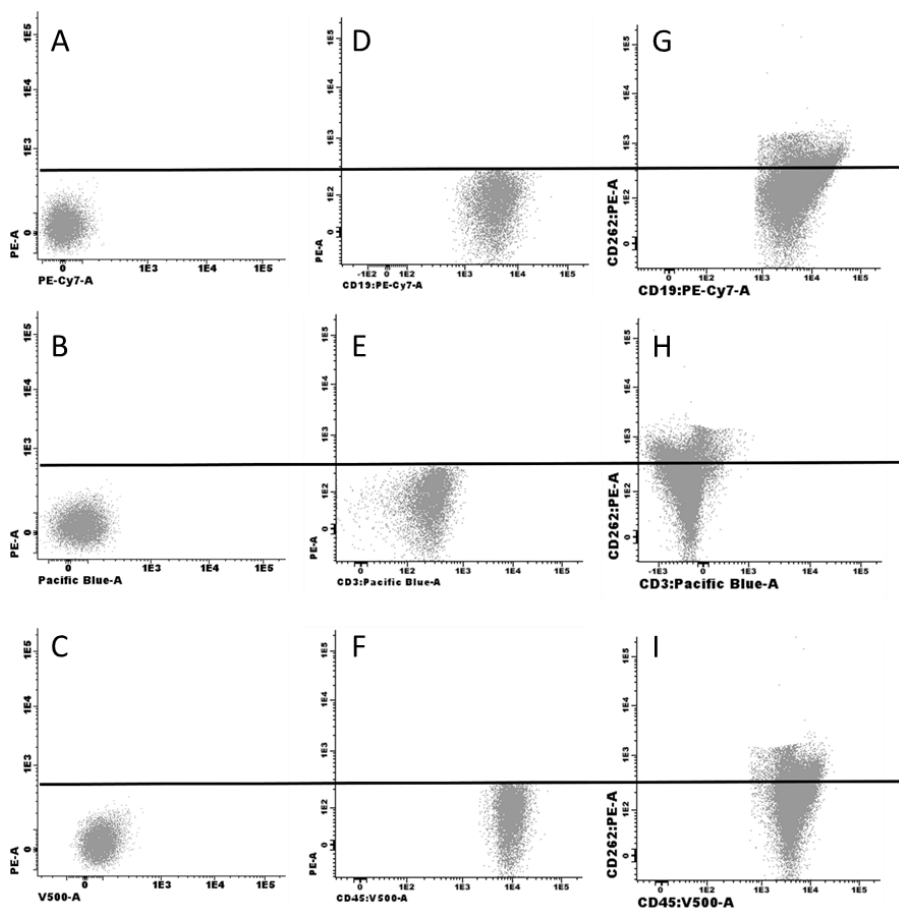
APÊNDICE D - CONTROLE FMO PARA O CD261



Fonte: A autora, 2016.

Nota: Paineis A, B e C: células não marcadas; Paineis D: células marcadas com CD19 Pe-Cy7; Paineis E: Células marcadas com CD3 PB; Paineis F: células marcadas com CD45 V500; Paineis G: células marcadas com CD261 Pe e CD19 Pe-Cy7; Paineis H: células marcadas com CD261 Pe e CD3 PB; Paineis I: células marcadas com CD261 Pe e CD45 V500.

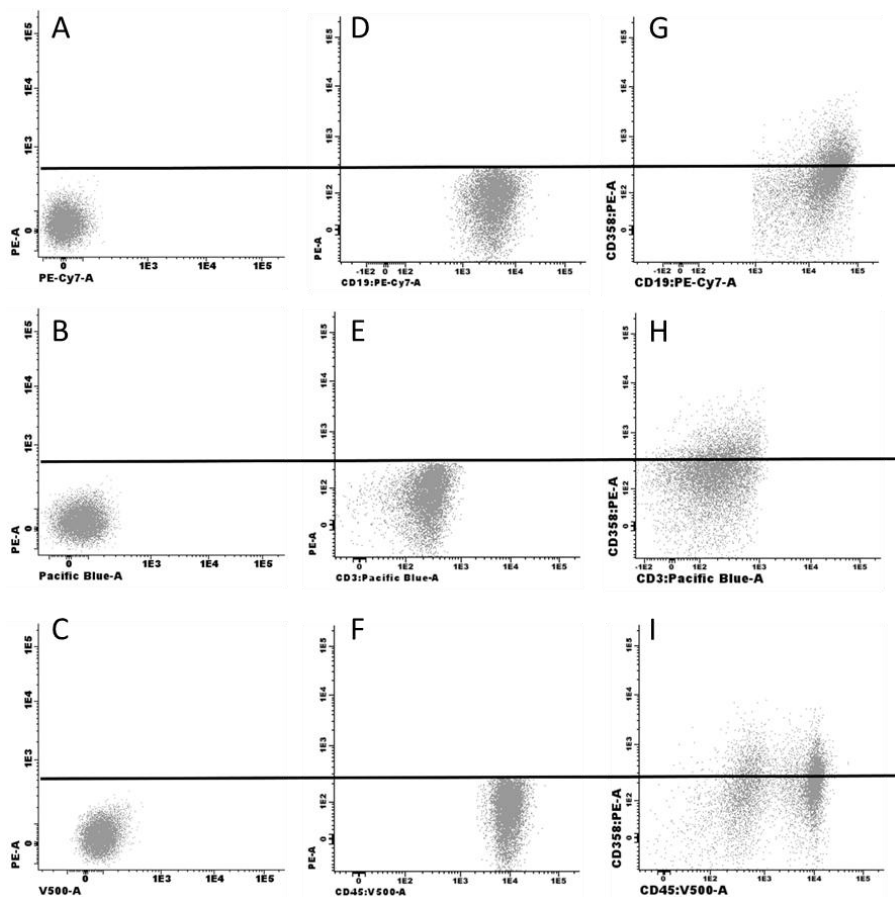
APÊNDICE E - CONTROLE FMO PARA O CD262



Fonte: A autora, 2016.

Nota: Paineis A, B e C: células não marcadas; Painel D: células marcadas com CD19 Pe-Cy7; Painel E: Células marcadas com CD3 PB; Painel F: células marcadas com CD45 V500; Painel G: células marcadas com CD262 Pe e CD19 Pe-Cy7; Painel H: células marcadas com CD262 Pe e CD3 PB; Painel I: células marcadas com CD262 Pe e CD45 V500.

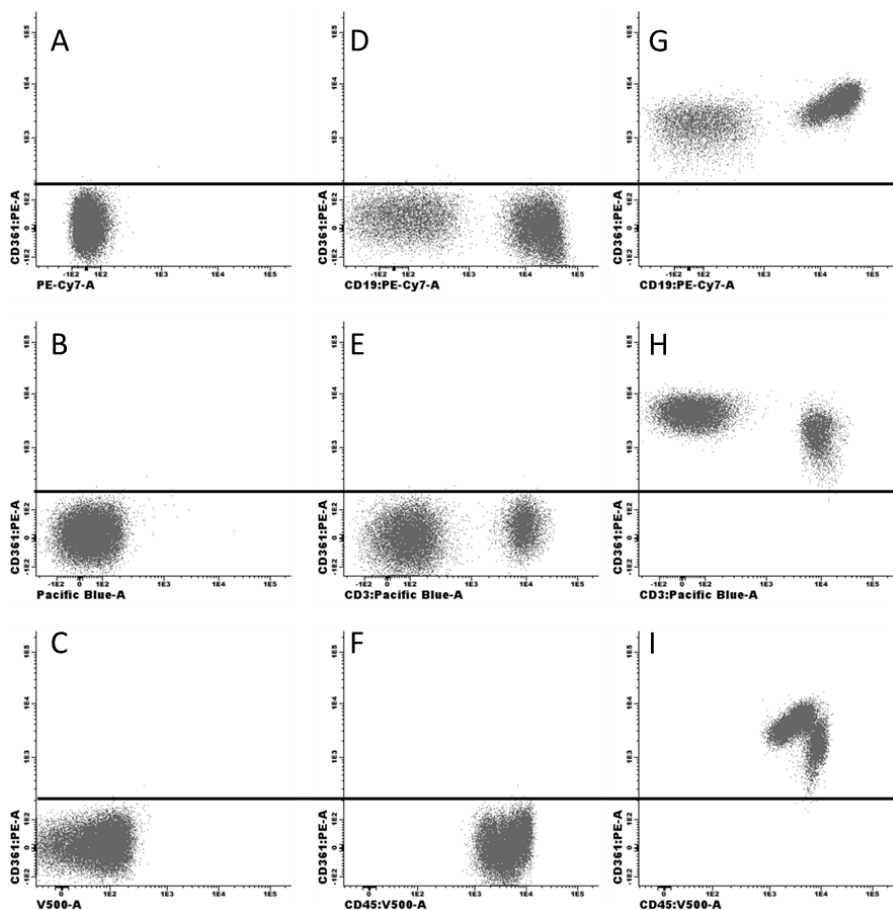
APÊNDICE F - CONTROLE FMO PARA O CD358



Fonte: A autora, 2016.

Nota: Paineis A, B e C: células não marcadas; Paineis D: células marcadas com CD19 Pe-Cy7; Paineis E: Células marcadas com CD3 PB; Paineis F: células marcadas com CD45 V500; Paineis G: células marcadas com CD358 Pe e CD19 Pe-Cy7; Paineis H: células marcadas com CD358 Pe e CD3 PB; Paineis I: células marcadas com CD358 Pe e CD45 V500.

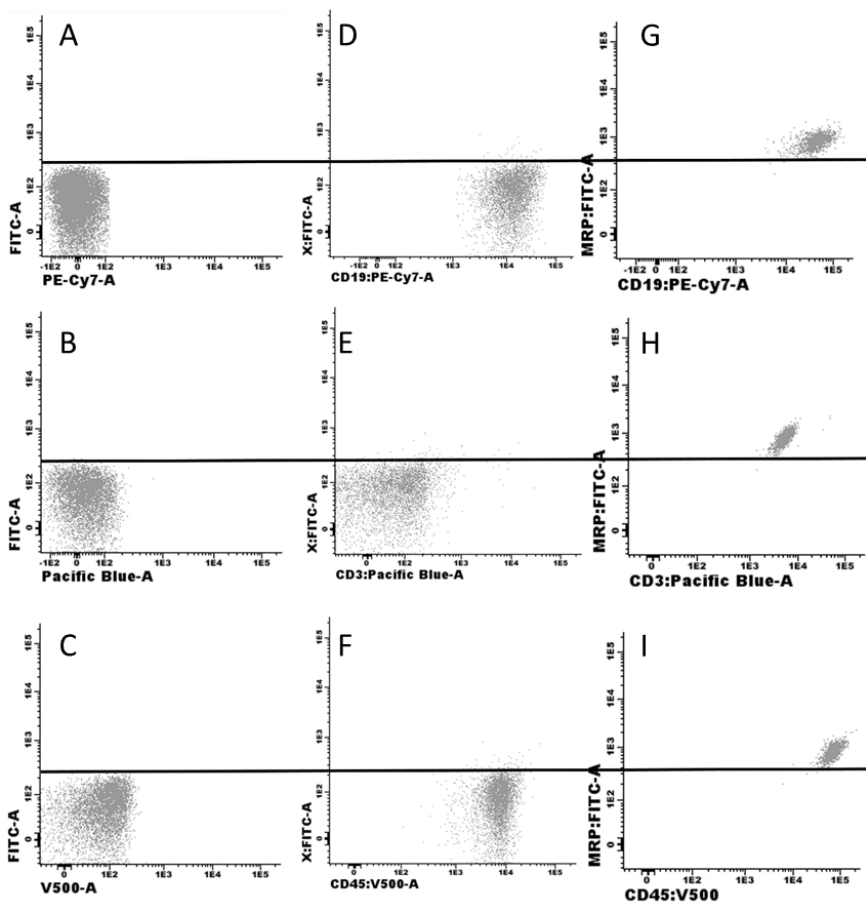
APÊNDICE G - CONTROLE FMO PARA O CD361



Fonte: A autora, 2016.

Nota: Painel A, B e C: células não marcadas; Painel D: células marcadas com CD19 Pe-Cy7; Painel E: Células marcadas com CD3 PB; Painel F: células marcadas com CD45 V500; Painel G: células marcadas com CD361 Pe e CD19 Pe-Cy7; Painel H: células marcadas com CD361 Pe e CD3 PB; Painel I: células marcadas com CD361 Pe e CD45 V500.

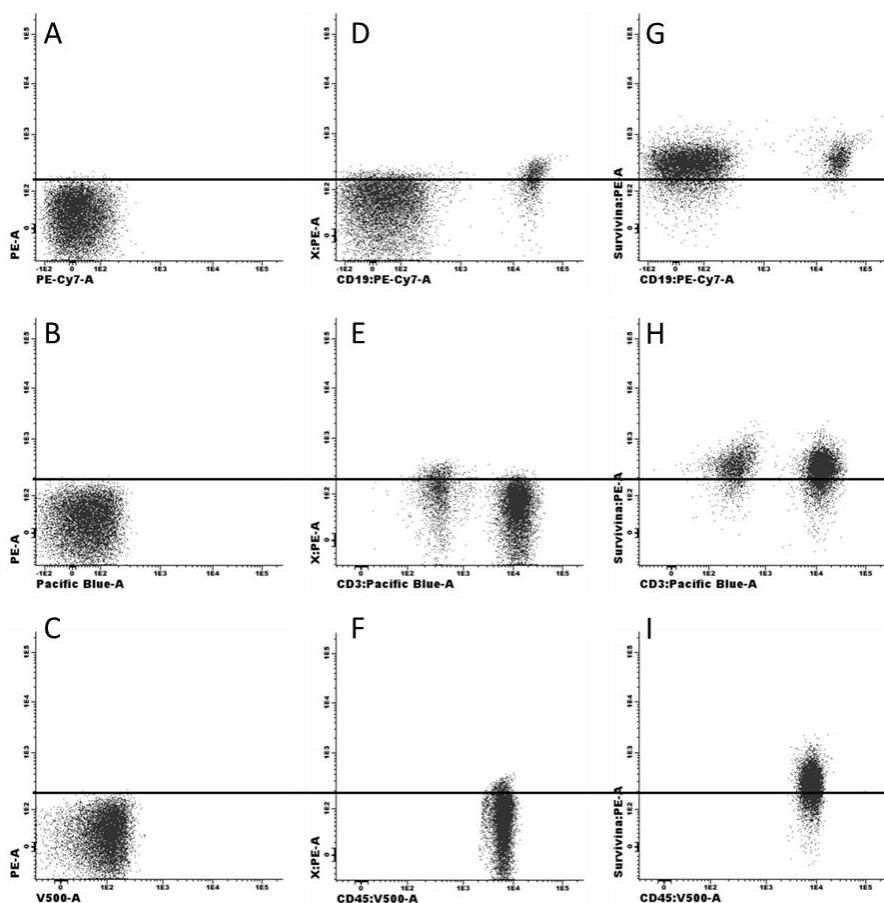
APÊNDICE H - CONTROLE FMO PARA A ABCC1/MRP



Fonte: A autora, 2016.

Nota: Paineis A, B e C: células não marcadas; Paineis D: células marcadas com CD19 Pe-Cy7; Paineis E: Células marcadas com CD3 PB; Paineis F: células marcadas com CD45 V500; Paineis G: células marcadas com ABCC1/MRP FITC e CD19 Pe-Cy7; Paineis H: células marcadas com ABCC1/MRP FITC e CD3 PB; Paineis I: células marcadas com ABCC1/MRP FITC e CD45 V500.

APÊNDICE I - CONTROLE FMO PARA A SURVIVINA



Fonte: A autora, 2016.

Nota: Paineis A, B e C: células não marcadas; Paineis D: células marcadas com CD19 Pe-Cy7; Paineis E: células marcadas com CD3 PB; Paineis F: células marcadas com CD45 V500; Paineis G: células marcadas com Survivina Pe e CD19 Pe-Cy7; Paineis H: células marcadas com Survivina Pe e CD3 PB; Paineis I: células marcadas com Survivina Pe e CD45 V500.

