

Correlação entre citometria de fluxo e anatomia patológica: experiência de dez anos na investigação de doenças linfoproliferativas

Correlation between flow cytometry and histologic findings: ten year experience in the investigation of lymphoproliferative diseases

Alanna Mara Pinheiro Sobreira Bezerra¹, Denise da Cunha Pasqualin¹, João Carlos de Campos Guerra², Marjorie Paris Colombini³, Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso², Paulo Augusto Achucarro Silveira², Cristovão Luis Pitangueira Manguera¹, Ruth Hissae Kanayama³, Sonia Tsukasa Nozawa³, Rodolfo Correia³, Ana Carolina Apelle¹, Welbert de Oliveira Pereira³, Rodrigo Gobbo Garcia⁴, Nydia Strachman Bacal⁵

RESUMO

Objetivo: Evidenciar as vantagens da correlação entre imunofenotipagem por citometria de fluxo e exame anatomopatológico/imunoistoquímico de adenomegalias e/ou nódulos no diagnóstico de doenças linfoproliferativas. **Métodos:** Estudo retrospectivo no qual foram avaliadas 157 amostras de biópsias ou punções aspirativas de gânglios ou nódulos de 142 pacientes, durante o período de 1999 a 2009. As amostras tinham sido encaminhadas simultaneamente para os Serviços de Citometria de Fluxo e Anatomia Patológica do Hospital Israelita Albert Einstein, em São Paulo. Para a análise na anatomia patológica, as amostras foram preparadas em lâminas e coradas com hematoxilina-eosina, Giemsa, ou marcadas com anticorpos monoclonais para detecção de antígenos específicos. Para a análise por imunofenotipagem por citometria de fluxo, as amostras foram hemolisadas e marcadas com diferentes painéis de anticorpos monoclonais para detecção dos diferentes antígenos. **Resultados:** Foram concordantes os diagnósticos entre a anatomopatológico e imunofenotipagem por citometria de fluxo em 115 (81%) pacientes, o que correspondeu a 127 amostras distribuídas da seguinte forma, conforme o diagnóstico anatomopatológico: 63 pacientes com linfoma não Hodgkin de células B; 26 pacientes com hiperplasia linfoide reacional; 5 pacientes com linfoma não Hodgkin de células T; 4 pacientes com proliferação linfoide atípica; 5 pacientes com processo inflamatório crônico granulomatoso; 5 pacientes com diagnósticos não hematológicos; 2 pacientes com sarcoma granulocítico; 2

pacientes com timoma; 1 paciente com leucemia bifenotípica; 1 paciente com plasmocitoma Kappa; e 1 paciente com linfoma de Hodgkin. A correlação entre os resultados das duas técnicas permitiu a classificação dos subtipos de linfomas da seguinte forma: 19 pacientes com linfoma folicular; 15 pacientes com linfoma difuso de grandes células B; 7 pacientes com linfoma linfocítico de pequenas células B/leucemia linfocítica crônica; 3 pacientes com linfoma de células do manto; 1 paciente com linfoma de Burkitt; 1 paciente com linfoma do tipo MALT (tecido linfoide associado à mucosa); 1 paciente com doença linfoproliferativa pós-transplante; 2 pacientes com linfoma não Hodgkin de células B de alto grau; 1 paciente com linfoma não Hodgkin de células B de baixo grau; 1 paciente linfoma de Hodgkin; e 12 pacientes com linfoma não Hodgkin de células B, sem outra especificação. **Conclusão:** A imunofenotipagem por citometria de fluxo complementa os achados do estudo anatomopatológico/imunoistoquímico, permitindo um diagnóstico hematopatológico rápido e preciso das doenças linfoproliferativas.

Descritores: Linfoma; Transtornos linfoproliferativos/diagnóstico; Imunofenotipagem; Citometria de fluxo; Imunoistoquímica

ABSTRACT

Objective: To demonstrate the advantages of correlating flow cytometry immunophenotyping with the pathology/

Trabalho realizado no Hospital Israelita Albert Einstein - HIAE - São Paulo (SP), Brasil.

¹ Anatomia Patológica, Departamento de Patologia Clínica, Hospital Israelita Albert Einstein - HIAE - São Paulo (SP), Brasil.

² Hematologia, Departamento de Patologia Clínica, Hospital Israelita Albert Einstein - HIAE - São Paulo (SP), Brasil.

³ Departamento de Patologia Clínica, Hospital Israelita Albert Einstein - HIAE - São Paulo (SP), Brasil.

⁴ Departamento de Imagem, Hospital Israelita Albert Einstein - HIAE - São Paulo (SP), Brasil.

⁵ Setor de Citometria de Fluxo, Departamento de Patologia Clínica, Hospital Israelita Albert Einstein - HIAE - São Paulo (SP), Brasil.

Autor correspondente: Nydia Strachman Bacal - Setor de Citometria de Fluxo, Departamento de Patologia Clínica, Hospital Israelita Albert Einstein - HIAE - Avenida Albert Einstein, 627/701 - Morumbi - CEP 05651-901 - São Paulo (SP), Brasil - e-mail: nsbacal@einstein.br

Data de submissão: 29/3/2011 - Data de aceite: 20/5/2011

Conflito de interesse: nenhum

immunohistochemistry of lymph nodes or nodules in the diagnosis of lymphoproliferative diseases. **Methods:** A retrospective study was carried out of 157 biopsy or fine-needle aspiration lymph nodes/nodule specimens taken from 142 patients, from 1999 and 2009. The specimens were simultaneously studied with flow cytometry and pathology at the Israelita Albert Einstein Hospital. The specimens were prepared in hematoxylin/eosin, Giemsa, or monoclonal antibody stained slides for detecting specific antibodies for the purposes of pathology/immunohistochemical analysis. The samples were hemolyzed and marked with different monoclonal antibody panels for different antigens in flow cytometry immunophenotyping.

Results: The diagnostic results of pathology/immunohistochemical studies and flow cytometry immunophenotyping agreed in 115 patients (81%), corresponding to 127 specimens, as follows according to the pathologic diagnosis: 63 patients with non-Hodgkin’s B-cell lymphoma; 26 patients with reactive lymphoid hyperplasia; 5 patients with non-Hodgkin’s T-cell lymphoma; 4 patients with atypical lymphoid proliferation; 5 patients with a chronic granulomatous inflammatory process; 5 patients with a non-hematologic diagnosis; 2 patients with granulocytic sarcoma; 2 patients with thymoma; 1 patient with biphenotypic leukemia; 1 patient with kappa plasmacytoma; 1 patient with Hodgkin’s lymphoma. Subtypes of lymphomas could be classified by associating the two techniques: 19 patients with follicular lymphoma; 15 patients with diffuse large B-cell lymphoma; 7 patients with small lymphocytic B-cell lymphoma/chronic lymphocytic leukemia; 3 patients with mantle cell lymphoma; 1 patient with Burkitt’s lymphoma; 1 patient with MALT type lymphoma; 1 patient with post-transplant lymphoproliferative disease; 2 patients with high grade non-Hodgkin’s B-cell lymphoma; 1 patient with low grade non-Hodgkin’s B-cell lymphoma not otherwise specified; 1 patient with Hodgkin’s lymphoma; and 12 patients with B-cell non-Hodgkin’s lymphoma not otherwise specified. **Conclusion:** Flow cytometry adds to the results of morphologic and immunohistochemical studies, facilitating a rapid and accurate diagnosis of lymphoproliferative diseases.

Keywords: Lymphoma; Lymphoproliferative disorders/diagnosis; Immunophenotyping; Flow cytometry; Immunohistochemistry

INTRODUÇÃO

As neoplasias linfoides afetam frequentemente linfonodos, baço, tecido linfóide associado a mucosas, pele ou órgãos sólidos não linfóides resultando em massas e organomegalias. O diagnóstico das doenças linfoproliferativas (DLP) baseia-se no estudo anatomopatológico (AP) e imunoistoquímico dos linfonodos (LN), que é considerado o método gold standart, pois, entre outras vantagens podem ser realizadas a análise da arquitetura do tecido e a classificação definitiva do tipo de linfoma. Apesar disso, seu procedimento é demorado, além de invasivo e, por vezes, de acesso limitado em alguns tecidos.

A punção aspirativa por agulha fina (PAAF) é, muitas vezes, a primeira linha de investigação (teste de screening) utilizada em casos de adenomegalias para o diagnóstico diferencial entre processos benignos/re-

acionais e neoplasias malignas. Trata-se de uma técnica rápida, simples, segura e pouco invasiva para a obtenção de células com boa preservação para vários estudos. Além do exame AP por biópsia de tecido, a PAAF também pode ser utilizada como técnica de coleta de material para vários estudos, incluindo a imunofenotipagem por citometria de fluxo (ICF)^(1,2) e apresenta um valor preditivo positivo (VPP) alto. Muitos estudos têm sido propostos para estabelecer a boa confiabilidade da PAAF no diagnóstico das DLP⁽³⁻⁹⁾ (Quadro 1).

Quadro 1. Vantagens e desvantagens das técnicas de punção aspirativa por agulha fina e exame anatomopatológico por biópsia de linfonodos na abordagem diagnóstica das doenças linfoproliferativas

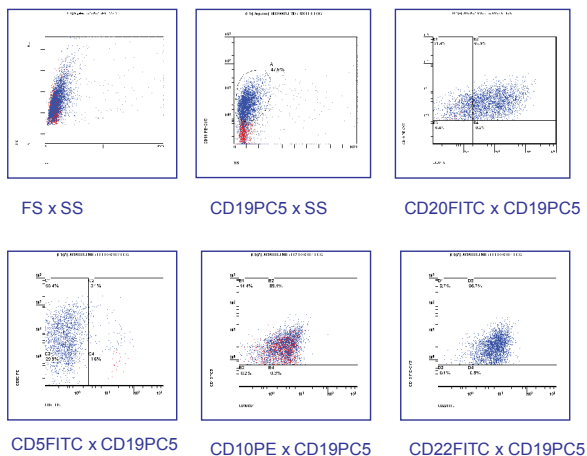
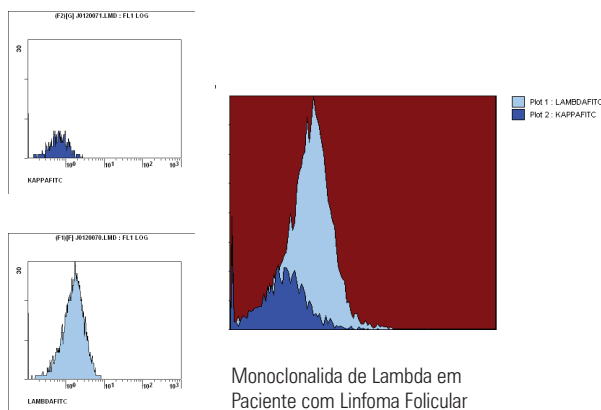
	Vantagens	Desvantagens
Biópsia	Estudo adequado da arquitetura histológica	Procedimento traumático
		Alto custo relativo
		Limites de acesso em alguns tecidos
		Tempo de liberação (entre 10 e 15 dias)
PAAF	Trauma mínimo	Perda da observação do padrão arquitetural
	Baixo custo	
	Tempo rápido de diagnóstico	

PAAF: punção aspirativa por agulha fina.

Nas últimas duas décadas, a análise de marcadores imunológicos dos linfócitos pela ICF evoluiu rapidamente de uma utilização restrita às áreas de pesquisas para a introdução nas rotinas de diagnóstico laboratorial. Essa expansão é justificada principalmente pela ampla disponibilidade dos citômetros de fluxo e de grande quantidade de anticorpos monoclonais, que rapidamente detectam tanto antígenos de membrana como intracelulares em diferentes suspensões celulares^(10,11).

O estudo imunofenotípico nos processos linfoproliferativos é útil na distinção entre alterações reacionais benignas e malignas, por meio da identificação de monoclonalidade, principalmente nas neoplasias de células B, nas quais se verifica restrição de uma das cadeias leves de imunoglobulina (Figura 1). Além da aplicação no diagnóstico, a ICF também é de fundamental importância na classificação dos diferentes tipos e subtipos das DLP⁽¹²⁻¹⁴⁾.

A atual classificação das DLP segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS)⁽¹⁴⁾, além de enfatizar o aspecto histológico, considera os dados clínicos, citológicos, imunofenotípicos e genotípicos para a caracterização diagnóstica e prognóstica dos diferentes tipos de DLP. Assim, novos marcadores altamente específicos são continuamente descritos para aprimorar o diagnóstico e oferecer informações sobre o prognóstico dessas doenças, podendo os painéis de anticorpos monoclonais incorporá-los, de acordo com a investigação clínica necessária⁽¹⁵⁻¹⁷⁾.



Fonte: Laboratório de Técnicas Especiais do Setor de Citometria de Fluxo, Hospital Israelita Albert Einstein.

Figura 1. Análise por citometria de fluxo de adenomegalia axilar de paciente com linfoma folicular

A confecção de esfregaços de boa qualidade técnica mostra-se útil, uma vez que o diagnóstico diferencial pode ser dado com base na composição celular (monomórfica; polimórfica; de pequeno, médio ou grande tamanho). Atenção deve ser tomada em materiais com importante componente hemodilucional, podendo-se diagnosticar erroneamente como reacional um caso proliferativo.

A avaliação morfológica imediata da amostra obtida após a punção permite indicar, se necessária, uma nova coleta ou até mesmo uma biópsia ganglionar, obtendo uma amostra com celularidade mais adequada^(1,6,16,18,19).

Em LN normais, as células B constituem cerca de 40% dos linfócitos, e as células T, aproximadamente 55%. Entre as células CD3+, predomina o subtipo CD4 e a relação CD4/CD8 é acima de 4. A frequência das células natural killer no LN normal é muito baixa (aproximadamente 1%). Contrariamente, os órgãos linfoides com predomínio de células B (CD19+) são as tonsilas, sendo que as demais células são CD3+ com predomínio do subtipo CD4, como nos LN^(20,21).

Os linfomas de células B são a maioria entre os linfomas não Hodgkin e, nesses casos, estabelecer a clonalidade celular, por meio da restrição de uma das cadeias leves κ (kappa) ou λ (lambda), geralmente é a chave para definir o diagnóstico. A proporção de κ/λ abaixo de 0,5 ou acima de 3,0 indica a presença de população de célula B clonais em amostras de sangue periférico, medula óssea, LN, baço e outros tecidos que contêm aumento de linfócitos B maduros⁽¹⁸⁾.

OBJETIVO

Evidenciar as vantagens da correlação entre imunofenotipagem por citometria de fluxo e exame anatomopatológico/imunoistoquímico de adenomegalia/ou nódulos no diagnóstico de doenças linfoproliferativas.

MÉTODOS

Foram estudadas retrospectivamente 157 amostras de biópsias ou punções aspirativas de gânglios/linfonodos LN ou nódulos em 142 pacientes durante o período de 1999 a 2009, que tinham amostras enviadas simultaneamente aos Setores de Citometria de Fluxo e de Anatomia Patológica do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), São Paulo (SP).

Estudo anatomopatológico/imunoistoquímico e citológico

Em todos os pacientes foram realizadas biópsias ou PAAF's de LN/massas para diagnóstico histológico e imunoistoquímico. Para isso, não houve modificação ou interferência em qualquer rotina da prática clínica hematológica e laboratorial.

Em nosso hospital, os médicos patologistas dispõem geralmente de três momentos para avaliar as amostras de tecido a fresco, sendo estes durante os exames de ultrassonografia nos quais são realizadas as PAAF's, na tomografia computadorizada quando são feitos os procedimentos de biópsias guiadas por agulha e os exames intraoperatórios por congelamento, realizados dentro do centro cirúrgico.

Nos casos de PAAF's, o material de aspirado de LN/massas foi examinado imediatamente pelos médicos patologistas quanto à representatividade celular e, antes de colocá-lo no fixador tecidual (álcool 95%), foi transferido para um tubo de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) contendo 2 mL de meio de cultura RPMI (RPMI 1640, meio desenvolvido no Roswell Park Memorial Institute). O processamento da ICF ocorreu em até 6 horas da coleta, não necessitando de fixação.

Nos casos de biópsia, os patologistas selecionaram uma parte representativa da amostra a fresco, antes de colocá-la no fixador tecidual (formaldeído 10%). A seguir, essa amostra foi transferida para o tubo de EDTA e

o processamento da ICF ocorreu da mesma maneira que os casos de PAAF.

No laboratório de anatomia patológica, os esfregaços e os citocentrifugados resultantes das PAAFs foram preparados de acordo com a rotina citológica, sendo fixados pela técnica de Papanicolaou e Giemsa. As biópsias seguiram a rotina de processamento histológico sendo confeccionadas lâminas coradas pela hematoxilina-eosina.

Para o exame imunoistoquímico, os cortes histológicos foram dispostos em lâminas de vidro previamente tratadas com o adesivo poli-D-lisina (Sigma, St. Louis, EUA, Cód. P7886) e mantidos em estufa a 60º por 4 horas. A seguir, foi realizada a desparafinação, com banhos sucessivos pelo xilol, passagem em álcool etílico absoluto e lavagem com solução salina tamponada, phosphate buffer solution (PBS), com bloqueio da atividade endógena com solução de H₂O₂ a 3%. A recuperação antigênica foi realizada pelo calor ou pelo método enzimático. Após a recuperação dos epítomos, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários em períodos de 12 a 18 horas a 4º, na diluição apropriada para cada anticorpo. Após nova lavagem em PBS, foram, então, incubadas por 60 minutos, com os respectivos anticorpos secundários. Seguiram-se, então, aos sistemas de detecção por meio de polímero. A revelação foi feita com tratamento com 3,3' diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, EUA, cód. D5637), acrescida de H₂O₂ (concentração final de 0,2%), contracoloração com hematoxilina de Mayer e montagem com resina histológica. Todos os ensaios foram analisados por médicos patologistas por meio de microscopia óptica comum, sendo positivos os controles das reações imunoistoquímicas.

Foi utilizado um painel inicial com os seguintes anticorpos primários: CD20 (clone L26), CD3 (policlonal), CD10 (clone 56C6), Bcl-2 (clone Bcl-2-100), Bcl-6 (clone LN22), CD5 (clone RTB-CD5), CD23 (clone 1B12), ciclina D1 (clone SP4), Ki-67 (clone SP6), CD30 (clone Ber-H2), Epstein Barr vírus (EBV – clone CS.1-4) e CD15 (clone BY87). Esse painel foi ampliado conforme a necessidade, acrescentando-se os anticorpos CD138 (clone MI15), Kappa (policlonal), Lambda (policlonal), CD4 (clone 1F6), CD8 (clone C8/144B), CD43 (clone DF-T1), CD56 (clone 123C3), mieloperoxidase (policlonal), granzima B (policlonal), TIA-1 (clone C-20), multiple myeloma-1/interferon regulatory factor-4 (MUM1/IRF4 – clone MUM 1P) e terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT – policlonal), citoceratinas (clone AE1/AE3), Melan A (clone M27C10), proteína S-100 (policlonal) e HMB45 (clone HMB45).

Os médicos patologistas fizeram a avaliação histológica final por meio da leitura de lâminas ao microscópio óptico comum, utilizando critérios da Classificação de Tumores da OMS de 2001 e de 2008 recomendados pela literatura⁽¹⁴⁾.

Imunofenotipagem por citometria de fluxo

As PAAFs foram colocadas em meio de coleta (Vitrocell) e as amostras de LN/massas embebidas em solução fisiológica ou em meio para coleta – RPMI (Vitrocell). Inicialmente, realizou-se contagem de células em câmara de Neubauer, as lâminas foram confeccionadas em Cytospin e coloridas com corante Rosenfeld para análise citomorfológica. Para o teste de viabilidade celular, utilizou-se 7-AAD. Após análise morfológica, as amostras foram pipetadas em tubos 12 x 75 mm dependendo do volume da amostra e do número de células. As amostras foram, então, lavadas com PBS (tampão fosfato) antes de se iniciar a marcação com anticorpos monoclonais, os quais foram obtidos de diversos fabricantes, como Beckman Coulter (BC), Becton Dickinson (BD), IQ Products (IQP), Immunotech (IM).

Para a triagem básica do perfil fenotípico do material foi aplicado o painel composto pelos anticorpos anti-CD2(BC), anti-CD3(BC), anti-CD4(BC), anti-CD8(BC), anti-CD14(BC), anti-CD15(IM), anti-CD19(BC), anti-CD30(IM), anti-CD34(IM), anti-CD45(IM), anti-Kappa (Dako) e anti-Lambda (Dako)⁽²²⁾.

Quando caracterizada a presença de clonalidade, aplicou-se o painel completo de anticorpos, incluindo o painel para doença linfoproliferativa de células B: CD2(BC), CD3(BC), CD5(IM), CD7(BC), CD10(IM), CD11c(IM), CD20(IM), CD22(IM), CD23(Dako), CD25(BC), CD38(IM), CD79b(IM), CD103(IQP), FMC-7(IM), HLA-DR(IM), IgM(Dako), IgD(Dako) e IgG(Dako). Outros painéis foram utilizados, como:

- painel para doença linfoproliferativa de células T: CD1a(IM), CD2(BC), CD3(BC), CD5(IM), CD7(BC), CD10(IM), CD20(IM), CD38(IM), CD56((IM), TCR Alfa/Beta(IM), TCR Gamma/Delta(IM);
- painel para mieloma múltiplo e doenças associadas: CD19(PC5), CD20(CD5), CD33(IM), CD38(IM), CD45(IM), CD56(IM), CD117(IM), HLA-DR(IM) e marcações intracitoplasmáticas para Kappa, Lambda, IgM, IgG, IgD e IgA.

Após marcação com anticorpos monoclonais, as células foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente e sob proteção da luz. Para a lise de hemácias, utilizou-se tampão hemolítico - cloreto de amônia por 15 minutos à temperatura ambiente.

Para a marcação de superfície em imunoglobulinas de cadeias leve e pesada, as amostras foram lavadas três vezes em PBS com soro fetal bovino e incubadas por uma hora em banho-maria a 37°C. Para a marcação intracitoplasmática foi utilizado o kit IntraPrep da Beckman Coulter. Por fim, a coleta e a análise dos dados foram realizadas no citômetro de fluxo EPICS XL-MCL e FC-

500 (Beckman Coulter). As análises foram interpretadas pelos histogramas obtidos em conjunto com a citomorfologia do material, de acordo com a Classificação de Tumores da OMS 2001 e 2008 ou anteriormente recomendados pela literatura⁽¹⁴⁾.

Os resultados da análise conjunta da citologia por meio da PAAF e dos exames AP/imunoistoquímicos das biópsias de LN foram comparados com os resultados de ICF. Foram utilizados a sensibilidade e a especificidade como parâmetros para análise do desempenho da ICF em relação à AP (gold standard).

A sensibilidade foi calculada para avaliar a proporção de indivíduos doentes que tem teste positivo, e a especificidade foi calculada para avaliar a proporção de indivíduos sem a doença que tem teste negativo. O VPP foi calculado para avaliar a probabilidade de o indivíduo ter a doença se o teste for positivo, e o valor preditivo negativo (VPN) para avaliar a probabilidade de o indivíduo não ter doença quando o teste for negativo.

RESULTADOS

Foram estudadas 157 amostras em 142 pacientes durante o período de 1999 a 2009, sendo 75 homens e 67 mulheres, com média de 55 anos (sendo a menor idade 4 anos e a maior idade 92 anos).

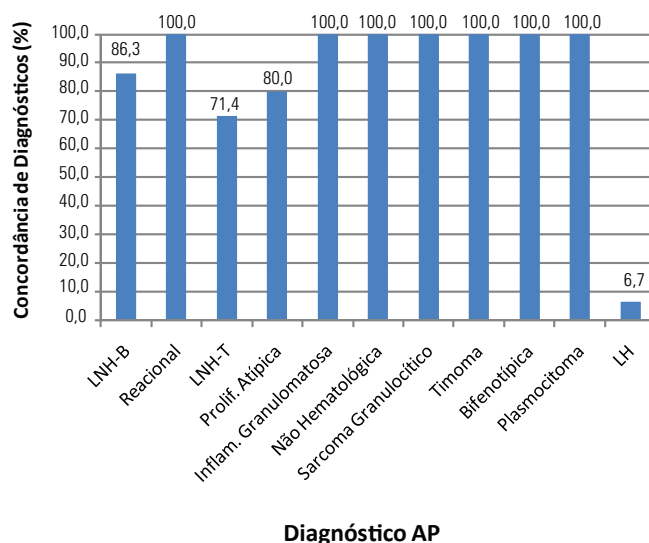
Em relação ao tipo de procedimento utilizado para obtenção do material para as análises, 119 pacientes realizaram biópsias, 16 pacientes realizaram somente PAAF e 7 pacientes realizaram PAAF seguidas de biópsia.

As topografias encontradas foram distribuídas em 145 amostras de LN (cervical, inguinal, axilar, mediastinal, peripancreático, para-aórtico e justa-carotídeo) e 12 amostras de massas tumorais localizadas no baço, rim, intestino delgado, pulmão, osso ísquio, parótida, couro cabeludo e naso/rinofaringe. Em 12 pacientes havia mais de uma amostra devido a procedimentos diferentes (por exemplo, amostras de PAAF seguida de amostra de bi-

ópsia), topografias diferentes colhidas ao mesmo tempo, anos de coleta diferentes em um único paciente, ou até mesmo duplicidade de amostras. (Tabela 1).

No intuito de investigar a eficiência da associação da ICF com AP para determinar diagnósticos precisos, avaliamos o percentual de concordância entre as duas técnicas para cada grupo de doença estudado (Figura 2).

Os 142 pacientes do estudo foram classificados de acordo com o diagnóstico do AP, como descrito na tabela 1. As barras mostram a percentagem de concordância no diagnóstico pelas duas técnicas (Figura 2).



LNH-B: linfoma não Hodgkin B (n = 73); reacional: hiperplasia linfóide reacional (n = 26); LNH-T: linfoma não Hodgkin T (n = 7); Prolif. Atípica: proliferação linfóide atípica (n = 5); Inflam. Granulomatosa: inflamações crônicas granulomatosas (n = 5); Não Hematológica: inclui carcinomas, adenocarcinomas e melanoma (n = 5); Bifenotípica: leucemia bifenotípica (n=1); LH: linfoma de Hodgkin (n = 15). Sarcoma Granulocítico (n = 2); Timoma (n = 2); Plasmocitoma (n = 1).

Figura 2. Percentagem de diagnósticos concordantes entre anatomopatológico e imunofenotipagem por citometria de fluxo por grupo estudado

De maneira interessante, dos 11 grupos de doenças estudadas houve concordância superior a 80% em 9 deles, e superior a 70% em 1 grupo. Apenas os diagnósticos de linfoma de Hodgkin (LH) foram discordantes em sua maioria, fato este previsto em literatura discutido mais a frente.

Tabela 1. Relação dos pacientes segundo o diagnóstico anatomopatológico e os tipos de coleta do material

Diagnóstico AP	Número de pacientes	Pacientes %	Número de PAAF	Número de PAAF + biópsia	Número de biópsias
LNH-B	73	51,41	5	4	64
Reacional	26	18,31	4	0	22
LNH-T	7	4,93	0	0	7
Prolif. atípica	5	3,52	3	0	2
Inflam. granulomatosa	5	3,52	4	0	1
Não hematológica	5	3,52	0	0	5
Sarcoma granulocítico	2	1,41	0	0	2
Timoma	2	1,41	0	0	2
Bifenotípica	1	0,70	0	0	1
Plasmocitoma	1	0,70	0	0	1
LH	15	10,56	0	3	12
Total	142	100	16	7	119

AP: anatomopatológico; PAAF: punção aspirativa por agulha fina; LNH-B: linfoma não Hodgkin B; LNH-T: linfoma não Hodgkin T; Prolif. Atípica: proliferação linfóide atípica; Inflam. Granulomatosa: inflamações crônicas granulomatosas; LH: linfoma de Hodgkin.

Dentre os 73 pacientes diagnosticados com linfoma não Hodgkin de células B pela AP (o que corresponde a 51,4% dos pacientes incluídos no estudo), houve uma concordância de 86,3% com o diagnóstico da ICF. Para os sete pacientes com linfoma não Hodgkin de células T (que correspondem a 4,9% do total de pacientes do estudo) foi observada falta de concordância entre os dois diagnósticos. Para os cinco pacientes diagnosticados com proliferação linfóide atípica houve 80% de concordância entre AP e ICF. A utilização da ICF para o diagnóstico de hiperplasias reacionais, inflamações granulomatosas, cânceres não hematológicos, sarcomas granulocíticos, timomas, e casos individuais de leucemia bifenotípica e plasmocitoma, foi absolutamente eficiente e eficaz, tendo havido 100% de concordância com o diagnóstico da AP.

Na figura 3 observamos os diagnósticos dos pacientes distribuídos de acordo com as análises anatomopatológicas.

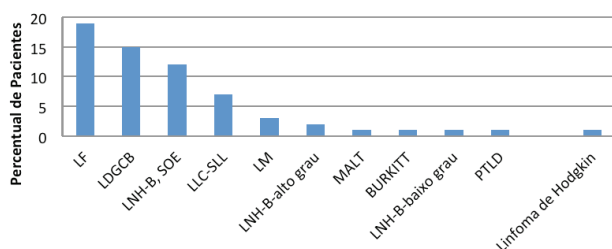
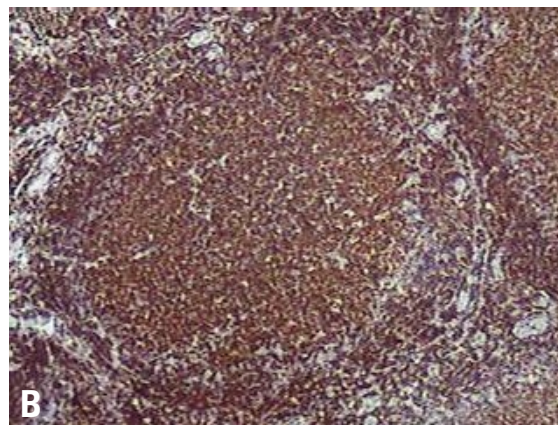
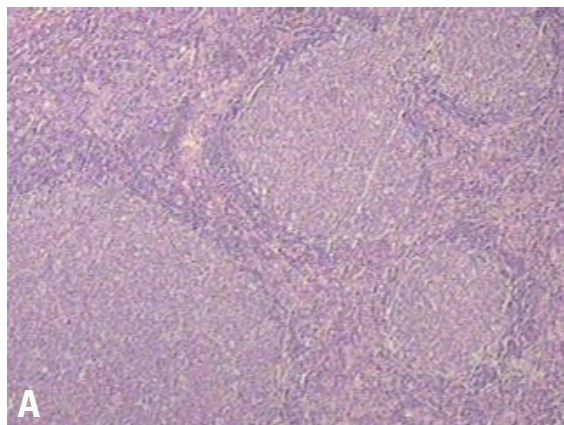


Figura 3. Distribuição dos diagnósticos concordantes em percentual de pacientes de acordo com os subtipos de linfoma

Nos 63 casos de linfoma não Hodgkin B concordantes nas técnicas estudadas, a distribuição conforme o subtipo foi:

- linfoma folicular (LF): 19 pacientes (Figura 4A e 4B);



Fonte: Departamento de Anatomia Patológica do Hospital Israelita Albert Einstein.

Figura 4. Painel imunistoquímico diagnóstico de linfoma folicular. (A) Padrão histológico do linfoma folicular com identificação da arquitetura dos folículos neoplásicos (200x, hematoxilina-eosina); (B) positividade para Bcl-2 no exame imunistoquímico em um folículo neoplásico (400X)

- linfomas difuso de grandes células B: 15 pacientes;
- linfomas linfocítico/leucemia linfocítica crônica (LLC/LL): 7 pacientes;
- linfomas de célula do manto: 3 pacientes;
- linfoma de Burkitt: 1 pacientes;
- linfoma do tipo MALT (tecido linfóide associado a mucosa): 1 paciente;
- doença linfoproliferativa pós-transplante (PTLD): 1 paciente;
- linfoma não Hodgkin de células B de alto grau: 2 pacientes;
- linfoma não Hodgkin de células B de baixo grau: 1 paciente;
- linfoma não Hodgkin de células B, sem outra especificação: 12 pacientes;
- LH: 1 paciente (Figura 5A e 5B).

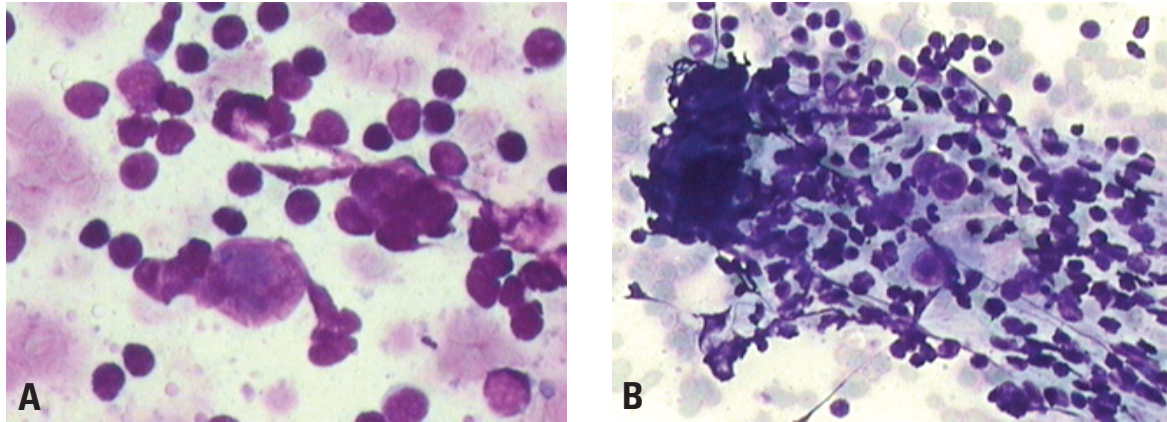
Os diagnósticos discordantes entre a anatomia patológica e a ICF foram de 27 pacientes (19,0%) em 30 amostras (19,1%), distribuídos conforme demonstrado na tabela 2.

Tabela 2. Distribuição geral dos diagnósticos não concordantes de acordo com o tipo de diagnóstico anatomopatológico definitivo

Diagnósticos por anatomia patológica	Pacientes (%)	Amostras (%)
Linfoma de Hodgkin	14 (51,85)	17 (56,7)
Linfoma não Hodgkin-B	10 (37)	10 (33,3)
Linfoma não Hodgkin-T	02 (7,4)	2 (6,7)
Hiperplasia linfóide reacional	01 (3,7)	01 (3,3)

Nos diagnósticos discordantes entre ICF e AP de linfoma não Hodgkin B obtivemos os seguintes subtipos:

- linfoma de células B rico em células T e histiócitos: 2 pacientes;



Fonte: Departamento de Anatomia Patológica do Hospital Israelita Albert Einstein.

Figura 5. Exame de punção aspirativa por agulha fina mostrando, na citologia, as células de núcleos volumosos e nucléolos evidentes (A), por vezes multinucleadas (B) diagnósticas de linfoma de Hodgkin (400x e 200x, respectivamente, hematoxilina-eosina)

- linfoma difuso de grandes células B: 6 pacientes;
- linfoma linfoblástico/leucemia linfoblástica de células B precursoras: 1 paciente;
- linfoma não Hodgkin de células B da zona marginal (MALT) com comprometimento focal do gânglio: 1 paciente

O cálculo do teste de sensibilidade da ICF em relação ao estudo AP (*gold standard*) é de 0,77 e o cálculo do teste de especificidade é de 0,97. O VPP é de 0,77 e VPN de 1,00.

DISCUSSÃO

A técnica de escolha para diagnóstico das afecções dos LN é tradicionalmente o estudo histopatológico do tecido em parafina. Em biópsias de LN e outros tecidos, a imunohistoquímica é uma ferramenta importante, pois, preservando a morfologia celular e padrão de arquitetura do tecido, permite a análise imunofenotípica em cortes histológicos^(23,24). A detecção de antígenos específicos nas células linfoides é fundamental na classificação de tumores, avaliação de prognóstico e identificação de terapia alvo-específica^(13,14). Contudo, a análise pelo patologista dos resultados do estudo imunohistoquímico na rotina laboratorial tem limitações: subjetividade da análise, reprodutibilidade limitada e tempo despendido. A variabilidade inter e intraobservador é alta pelo elevado número de fatores que podem interferir no processamento da amostra e nas interpretações dos resultados. Assim, a perda do consenso na quantificação da expressão dos antígenos e na definição de resultados positivos e negativos é uma das causas que levam à não reprodutibilidade. O exame citomorfológico e a

ICF resolvem alguns desses obstáculos como a maior rapidez diagnóstica, possibilitando a análise qualitativa e quantitativa de antígenos celulares, além da análise multiparamétrica^(2,7,17,18). Contudo, a citometria de fluxo também tem suas limitações: variabilidade na expressão da assinatura antigênica e a perda celular durante o processamento pré-analítico, entre outros fatores, como o preparo da amostra, trabalhar com material fresco e ter número suficiente de células neoplásicas. Os linfomas de grandes células podem ter suas células perdidas no processo de preparo por sua fragilidade celular. Conforme dados da literatura, um resultado negativo não exclui automaticamente a malignidade^(11,18,19,23).

A PAAF é um procedimento minimamente invasivo no qual a combinação da análise citomorfológica com a imunofenotipagem por CF mostra-se importante ferramenta, capaz de rapidamente diferenciar DLP de hiperplasias linfoides reacionais na maioria dos casos de linfadenopatias^(20,23,25).

Em nosso estudo, houve discordância de diagnóstico entre a ICF e AP em 27 casos, sendo o mais frequente desses o diagnóstico de LH em 14 pacientes do total de 15 com esse diagnóstico por AP (51,85% do total dos casos discordantes) em 17 amostras (56,7%).

Embora a citometria de fluxo seja útil no diagnóstico de muitas neoplasias hematopoiéticas e poder, com frequência, detectar pequenas populações (< 0,01% de leucócitos), nesses casos apresenta-se como técnica limitada na contribuição ao diagnóstico do LH que envolve LN. Muitos estudos de ICF em LH evidenciam as mudanças na composição de linfócitos reacionais, como a relação CD4/CD8 em células T, mas as células de Reed Sternberg têm ausência em sua detecção por essa técnica, principalmente por seu grande volume⁽²⁶⁾.

Em 2009, Wood descreveu uma técnica de alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico de LH clássico por citometria de fluxo utilizando 9 cores em equipamento com 3 lasers⁽²⁷⁾.

Nos nossos casos, em dez pacientes não foi detectado linfoma não Hodgkin-B (LNH-B) pela técnica de citometria de fluxo. Nestes, a distribuição das células anômalas no tecido linfóide foi parcial em dois pacientes, comprometendo a representação celular neoplásica. Em dois casos, o diagnóstico final foi de linfoma difuso de grandes células B, rico em células T/histiócitos, nos quais as poucas células neoplásicas detectadas estão distribuídas em um fundo rico em linfócitos T e histiócitos, além de exibirem grande tamanho, revelando-se mais frágeis se comparadas aos demais linfócitos. Como consequência, não são bem representadas, o que pode mascarar a análise por CF. Esse fato foi também observado por Meda et al.⁽²⁸⁾ e Verstovsek et al.⁽¹⁾. Frequentemente pode ser caracterizada como uma população equivocadamente policlonal devido à considerável contaminação com células normais residuais. Assim, um resultado sem evidências de malignidade pela ICF não excluiu um processo neoplásico, reforçando que, nessas situações, um minucioso exame citomorfológico deve ser realizado, como demonstrado na literatura^(9,29).

Segundo estudos de Meda et al.⁽²⁸⁾ e de Zardawi et al.⁽¹⁸⁾, na ausência da restrição de cadeias leves κ e λ , outras evidências de proliferação clonal podem ser exploradas, como a proliferação de antígenos (CD19, CD20) em grandes proporções em determinados tecidos (superior a 85%), CD10 \geq 18% ou CD20+CD5 \geq 35%.

Entre outros trabalhos, destaca-se o de Martins et al.⁽⁷⁾, que, em estudo retrospectivo de 627 materiais de LN obtidos por PAAF, também ressaltaram a importância da análise citomorfológica para o estabelecimento de diagnóstico de LNH de grandes células.

Ainda no nosso trabalho, em três pacientes, as amostras eram constituídas por material necrótico, frível ou escasso para análise em ICF, sendo que o material escasso foi obtido de biópsia de osso com pouca representatividade do tecido neoplásico. A representatividade da malignidade estava prejudicada em três pacientes não sendo possível seu diagnóstico por ICF (em um deles apesar de ter sido o estudo complementado pela técnica de PCR para clonalidade B), e também não foi encontrada banda distinta representativa dos rearranjos monoclonais dos loci IgH, mostrando a pequena quantidade de células na amostra. A presença de necrose, de crescimento neoplásico acelerado e amostra óssea dificultam o processamento pré-analítico interferindo na viabilidade das células para análise pelo citômetro, como observado também na literatura^(19,23).

Nos linfomas de células T, a clonalidade dessas células somente pode ser caracterizada se ocorrer ausência de expressão antigênica de algum marcador da linhagem T, pois a demonstração da clonalidade T só pode ser realizada por PCR, técnica de Southern Blot por biologia molecular ou demonstração da clonalidade por citometria de fluxo, por meio da detecção clonal na família V β com mais de 20 anticorpos monoclonais analisados simultaneamente – técnica não disponível no Brasil.

Assim, em nosso trabalho, a citometria de fluxo mostrou-se mais específica do que sensível na concordância diagnóstica, o que é decorrente da falta de concordância encontrada nos pacientes com LH^(14,15), e nos dez pacientes de linfoma difusos de grandes células descritos anteriormente⁽¹⁰⁾. Esses fatores também influíram no cálculo do VPP global.

Em biópsias de LN e outros tecidos, a imunoistoquímica é uma ferramenta muito importante, pois permite a análise imunofenotípica em cortes histológicos nos quais ainda se identifica a arquitetura do tecido⁽³⁰⁾. Por exemplo, a expressão do antígeno CD5 presente em alguns linfomas, entre eles o linfocítico de pequenas células/leucemia linfocítica crônica (LL/LLC) e o linfoma de células do manto (LM), que são dois tipos de DLP de diferentes prognósticos, sendo necessária a correta distinção entre eles. Nesses casos, é fundamental a pesquisa e caracterização do marcador ciclina D1, presente em 70 a 80% dos casos de LM⁽¹⁵⁾, a qual é realizada com sucesso apenas pela técnica de imunoistoquímica. Além disso, é possível também a detecção da t(11;14) característica do LM por citogenética clássica, hibridação in situ por fluorescência (FISH), reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR).

Nos linfomas de células B maduros, o diagnóstico diferencial principal dos que apresentam positividade para o marcador CD10 deve ser feito entre linfoma folicular (LF), linfoma difuso de grandes células (LDGCB) e linfoma de Burkitt. A demonstração do marcador Bcl-2 em histologia auxilia a identificação dos folículos neoplásicos no LF, diferenciando-os de folículos reacionais em processos de hiperplasias linfóides de padrão folicular. A citometria de fluxo, por sua vez, apesar de dificuldade técnica em demonstrar a presença de Bcl-2, pode diferenciar LF de hiperplasias linfóides por meio da pesquisa de clonalidade pela relação κ e λ ^(16,21,31).

Atualmente, os centros de diagnósticos que oferecem essas tecnologias como ferramentas diagnósticas complementares diminuem as limitações de cada método, oferecendo rapidez, melhores opções para estadiamento e conduta terapêutica mais adequada.

CONCLUSÕES

Como pudemos demonstrar em muitas situações, para muitas doenças hematológicas o uso da citometria de fluxo associada à citomorfologia e o estudo imunistoquímico conseguiu diagnosticar e diferenciar os processos reacionais dos neoplásicos, além de subclassificar as doenças linfoproliferativas.

Em nossa experiência, os dados da citometria de fluxo complementaram os achados da citomorfologia e da imunistoquímica nas PAAF's e biópsias de amostras suspeitas de doenças linfoproliferativas, na maioria dos casos.

REFERÊNCIAS

- Verstovsek G, Chakraborty S, Ramzy I, Jorgensen JL. Large B-cell lymphomas: fine-needle aspiration plays an important role in initial diagnosis of cases which are falsely negative by flow cytometry. *Diagn Cytopathol.* 2002;27(5):282-5.
- Dong HY, Harris NL, Preffer FI, Pitman MB. Fine-needle aspiration biopsy in the diagnosis and classification of primary and recurrent lymphoma: a retrospective analysis of the utility of cytomorphology and flow cytometry. *Mod Pathol.* 2001;14(5):472-81.
- Nicol TL, Silberman M, Rosenthal DL, Borowitz MJ. The accuracy of combined cytopathologic and flow cytometric analysis of fine-needle aspirates of lymph nodes. *Am J Clin Pathol.* 2000;114(1):18-28.
- Caraway NP. Strategies to diagnose lymphoproliferative disease disorders by fine-needle aspiration by using ancillary studies. *Cancer.* 2005;105(6):432-42
- Sigstad E, Dong HP, Davidson B, Berner A, Tierens A, Risberg B. The role of flow cytometric immunophenotyping in improving the diagnostic accuracy in referred fine-needle aspiration specimens. *Diagn Cytopathol.* 2004;31(3):159-63.
- Costa FPS, Pereira FG, Vassallo J, Freitas LLL, Lorand-Metze I. A utilidade da citologia por punção com agulha fina aliada à imunofenotipagem no diagnóstico dos linfomas não-Hodgkin. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2005;27(1):16-20.
- Martins MR, Santos GC. Fine-needle aspiration cytology in the diagnosis of superficial lymphadenopathy: a 5-year Brazilian experience. *Diagn Cytopathol.* 2006;34(2):130-4.
- Gupta R, Naseem S, Kashyap R, Paul L. Role of fine-needle aspirate immunophenotyping by flow cytometry in rapid diagnosis of lymphoproliferative disorders. *Diagn Cytopathol.* 2007;35(7):381-5
- Jorgensen, JL. State of the Art Symposium: flow cytometry in the diagnosis of lymphoproliferative disorders by fine-needle aspiration. *Cancer.* 2005;105(6):443-51.
- Szczepa ski T, van der Velden VH, van Dongen JJ. Flow cytometric immunophenotyping of normal and malignant lymphocytes. *Clin Chem Lab Med.* 2006;44(7):775-96.
- Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood.* 1997;90(8):2863-92.
- Wood BL, Arroz M, Barnett D, DiGiuseppe J, Greig B, Kussick SJ, et al. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007;72 Suppl 1:S14-22.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting. *J Clin Oncol.* 1999;17(12):3835-49.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2008.
- Elneaei MO, Jadayel DM, Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, S et al. Cyclin D1 by flow cytometry as a useful tool in the diagnosis of B-cell malignancies. *Leuk Res.* 2001;25(2):115-23.
- Cornfield DB, Mitchell DM, Almasri NM, Anderson JB, Ahrens KP, Dooley EO, et al. Follicular lymphoma can be distinguished from benign follicular hyperplasia by flow cytometry using simultaneous staining of cytoplasmatic Bcl-2 and cell surface CD20. *Am J Clin Pathol.* 2000;114(2):258-63
- Colorado M, Cuadrado MA, Insunza A, Mazonza F, Acinas O, Iriondo A. Simultaneous cytomorphologic and multiparametric flow cytometry analysis on lymph node sample is faster than as valid as histopathologic study to diagnose most non-Hodgkin lymphomas. *Am J Clin Pathol.* 2010;133(1):83-91.
- Zardawi IM, Jain S, Bennett G. Flow-cytometric algorithm on fine-needle aspirates for the clinical workup of patients with lymphadenopathy. *Diagn Cytopathol.* 1998;19(4):274-8.
- Gong JZ, Williams DC Jr, Liu K, Jones C. Fine-needle aspiration in non-Hodgkin lymphoma: evaluation of cell size by cytomorphology and flow cytometry. *Am J Clin Pathol.* 2002;117(6):880-8.
- Küppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(4):251-62.
- Wood BL, Borowitz MJ. The flow cytometric evaluation of hematopoietic neoplasia. In: McPherson RA, Pincus MR, editors. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods.* 21st ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2007. p. 599-616.
- Martínez A, Aymerich M, Castillo M, Colomer D, Bellosillo B, Campo E, et al. Routine use of immunophenotype by flow cytometry in tissues with suspected hematological malignancies. *Cytometry B Clin Cytom.* 2003;56(1):8-15.
- Mayall F, Dray M, Stanley D, Harrison B, Allen R. Immunoflow cytometry and cell block immunohistochemistry in the FNA diagnosis of lymphoma: a review of 73 consecutive cases. *J Clin Pathol.* 2000;53(6):451-7.
- Chan JK. Advances in immunohistochemistry: impact on surgical pathology practice. *Semin Diagn Pathol.* 2000;17(3):170-7.
- Orfao A, Alameida J, Sanches ML, San Miguel JF. Immunophenotypic diagnosis of leukemic b-cell chronic lymphoproliferative disorders other than chronic lymphocytic leukemia. *contemporary hematology. chronic lymphocitic leukemia: molecular, genetics, biology, diagnosis, and management.* Totowa, NJ: G.B. Faguet. Human Press; 2004. p. 173-92.
- Poppema S, Potters M, Emmens R, Visser L, van den Berg A. Immune reactions in classical Hodgkin's lymphoma. *Semin Hematol.* 1999;36(3):253-9.
- Fromm JR, Thomas A, Wood BL. Flow cytometry can diagnose classical hodgkin lymphoma in lymph nodes with high sensitivity and specificity. *Am J Clin Pathol.* 2009;131(3):322-32.
- Meda BA, Buss DH, Woodruff RD, Cappellari JO, Rainer RO, Powell BL, et al. Diagnosis and subclassification of primary and recurrent lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 2000;113(5):688-99.
- Sneige N, Dekmezian RH, Katz RL, Fanning TV, Lukeman JL, Ordoñez NF et al. Morphologic and immunocytochemical evaluation of 220 fine needle aspirates of malignant lymphoma and lymphoid hyperplasia. *Acta Cytol.* 1990;34(3): 311-22.
- Chan JK. Advances in immunohistochemistry: impact on surgical pathology practice. *Semin Diagn Pathol.* 2000;17(3):170-7.
- Laane E, Tani E, Björklund E, Elmberger G, Everaus H, Skoog L et al. Flow cytometric immunophenotyping including Bcl-2 detection on fine needle aspirates in the diagnosis of reactive lymphadenopathy and non-Hodgkins lymphoma. *Cytometry B Clin Cytom.* 2005;64(1):34-42.