

**Marianne de Castro Gonçalves**

A biópsia por agulha grossa no diagnóstico em hematopatologia:  
um estudo sobre a capacidade diagnóstica e o papel da abordagem  
multidisciplinar e dos exames complementares na otimização dos  
resultados

**A biópsia por agulha grossa no diagnóstico em Hematopatologia: um  
estudo sobre a capacidade diagnóstica e o papel da abordagem  
multidisciplinar e dos exames complementares na otimização dos  
resultados**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade  
de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Programa de Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cláudia Nogueira Zerbini

**São Paulo**

**2022**

**Marianne de Castro Gonçalves**

A biópsia por agulha grossa no diagnóstico em hematopatologia:  
um estudo sobre a capacidade diagnóstica e o papel da abordagem  
multidisciplinar e dos exames complementares na otimização dos  
resultados

**A biópsia por agulha grossa no diagnóstico em Hematopatologia: um  
estudo sobre a capacidade diagnóstica e o papel da abordagem  
multidisciplinar e dos exames complementares na otimização dos  
resultados**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade  
de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Programa de Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cláudia Nogueira Zerbini

**São Paulo**

**2022**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gonçalves, Marianne de Castro

A biópsia por agulha grossa no diagnóstico em hematopatologia : um estudo sobre a capacidade diagnóstica e o papel da abordagem multidisciplinar e dos exames complementares na otimização dos resultados / Marianne de Castro Gonçalves. -- São Paulo, 2022.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Patologia.

Orientadora: Maria Cláudia Nogueira Zerbini.

Descritores: 1.Biópsia por agulha grossa  
2.Linfoma 3.Hematopatologia 4.Diagnóstico  
5.Abordagem multidisciplinar 6.Imunofenotipagem

USP/FM/DBD-232/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## DEDICATÓRIA

Aos meus amados filhos, Bruno e Pedro, cuja presença transformadora enche a minha vida de significado e de alegria. Por vocês e com vocês eu sou mais forte todos os dias.

Ao meu amado esposo e parceiro de todas as horas, Ricardo, por sua compreensão, sua presença que não falha e seu incentivo constante para que me torne uma pessoa a cada dia melhor.

Aos meus amados pais, Roberto e Esther, pela base que me deram para tudo na vida, pelo amor, pelo apoio e por serem tantas vezes meu porto seguro.

Aos meus irmãos Tata e Beto, guardiões das minhas memórias de infância e cujo exemplo de conduta eu sigo todos os dias.

Aos pacientes, que são a razão final de todo o esforço e trabalho: aqueles que dão significado a minha profissão e às minhas atividades de todos os dias.

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Maria Cláudia Nogueira Zerbini, minha orientadora, em cuja figura eu sempre me inspirei, por ter estado ao meu lado nessa jornada, com todos os seus ensinamentos e disponibilidade.

À Dra. Claudia Regina Gomes Cardim de Oliveira, pela parceria desde muito cedo na minha vida profissional, por todos os ensinamentos, carinho, amizade, incentivo e participação ativa na realização deste trabalho.

Às Dras. Vera Lúcia Aldred e Sheila Aparecida Coelho Siqueira, por terem despertado em mim o interesse pela Hematopatologia, por guiarem meus primeiros passos como patologista e pelo carinho que sempre me dispensaram.

À equipe do laboratório de patologia do Hospital Sírio-Libanês pela excelência e colaboração na execução de todos os serviços e aos meus colegas patologistas, pela compreensão, incentivo e apoio para a realização deste sonho.

À equipe da Hematologia do Hospital Sírio-Libanês, pela parceria destes anos e contribuição com os informes clínicos e resolução de dúvidas.

À equipe da imunofenotipagem por citometria de fluxo do laboratório Fleury, cuja contribuição com os dados foi essencial, além do trabalho em equipe, apoio constante e disponibilidade.

À banca do exame de qualificação composta pelos professores Luiz Fernando Ferraz da Silva, Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso e Celso Arrais Rodrigues da Silva, pelos preciosos apontamentos e observações que serviram para enriquecer este texto e ampliar minha visão.

Ao Instituto de Ensino e Pesquisa (IEP) do Hospital Sírio-Libanês pelo apoio na realização deste trabalho.

*“The first step in wisdom is to know the things themselves; this notion consists in having a true idea of the objects; objects are distinguished and known by classifying them methodically and giving them appropriate names. Therefore, classification and name-giving will be the foundation of our science.”*

*Carolus Linnaeus*

## NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

# SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE IMAGENS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO .....	1
<b>1.1</b>	<b>Aspectos gerais.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Os exames complementares em hematopatologia.....</b>	<b>2</b>
1.2.1	A técnica de imuno-histoquímica (IHQ).....	4
1.2.2	A técnica de hibridização <i>in situ</i> (HIS) para detecção do vírus <i>Epstein-Barr</i> (EBV) 7	
1.2.3	A técnica de imunofenotipagem por citometria de fluxo (IFT CMF) .....	7
1.2.4	A técnica de pesquisa de clonalidade dos genes da imunoglobulina (IG) e do gene do receptor de células T ( <i>TCR</i> ) por reação em cadeia de polimerase (PCR) 10	
1.2.5	A técnica de hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	11
1.2.6	A análise mutacional, o sequenciamento de nova geração (NGS) e o perfil de expressão gênica .....	12
<b>1.3</b>	<b>Técnicas de obtenção de material para diagnóstico patológico em onco-hematologia .....</b>	<b>14</b>
1.3.1	A biópsia cirúrgica (BC).....	14

1.3.2	As técnicas percutâneas menos invasivas.....	14
<b>1.4</b>	<b>Escolha da modalidade de exame de imagem para guiar a biópsia por agulha grossa e a escolha do sítio a ser abordado .....</b>	<b>16</b>
<b>1.5</b>	<b>Perspectiva atual dos estudos sobre a aplicação clínica da biópsia por agulha grossa (BA).....</b>	<b>17</b>
<b>1.6</b>	<b>Rotina de manejo do material do paciente em investigação de doença linfoproliferativa no Hospital Sírio-Libanês .....</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivos principais: .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos secundários:.....</b>	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>CASUÍSTICA E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1</b>	<b>Casuística.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2</b>	<b>Registro de dados de revisão patológica e de prontuário .....</b>	<b>27</b>
<b>3.3</b>	<b>Análise dos resultados .....</b>	<b>30</b>
3.3.1	De acordo com os objetivos principais:.....	30
3.3.2	De acordo com os objetivos secundários:.....	32
<b>3.4</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>Resultados descritivos .....</b>	<b>37</b>
4.1.1	Descrição dos aspectos clínicos gerais.....	37
4.1.2	Descrição dos aspectos anatomopatológicos .....	38
<b>4.2</b>	<b>Resultados analíticos.....</b>	<b>43</b>
4.2.1	De acordo com os objetivos principais .....	43

4.2.2	De acordo com os objetivos secundários.....	48
5	DISCUSSÃO .....	81
5.1	<b>Geral .....</b>	<b>81</b>
5.2	<b>De acordo com os objetivos.....</b>	<b>84</b>
5.2.1	De acordo com os objetivos principais .....	84
5.2.2	De acordo com os objetivos secundários.....	85
5.3	<b>Considerações finais .....</b>	<b>102</b>
6	CONCLUSÕES .....	104
6.1	<b>De acordo com os objetivos principais: .....</b>	<b>104</b>
6.2	<b>De acordo com os objetivos secundários: .....</b>	<b>104</b>
7	ANEXOS.....	106
7.1	<b>Anexo 1.....</b>	<b>106</b>
7.1.1	Metodologia empregada na imuno-histoquímica (IHQ) e hibridização <i>in situ</i> (HIS) no Hospital Sírio-Libanês .....	106
7.1.2	Seleção de painéis, lista de anticorpos e clones utilizados.....	107
7.2	<b>Anexo 2.....</b>	<b>111</b>
7.2.1	Metodologia empregada na hibridização <i>in situ</i> fluorescente no Hospital Sírio-Libanês .....	111
7.2.2	Indicações de realização do exame de FISH e sondas disponíveis ....	111
7.3	<b>Anexo 3.....</b>	<b>114</b>
7.3.1	Metodologia empregada para a pesquisa de clonalidade de linfócitos B e T por PCR no Hospital Sírio-Libanês .....	114
7.3.2	Indicações de realização da pesquisa de clonalidade B e T por PCR.	115

<b>7.4</b>	<b>Anexo 4.....</b>	<b>116</b>
7.4.1	Metodologia empregada para a realização de IFT CMF multiparamétrica (realizada no laboratório <i>Fleury</i> ) .....	116
<b>7.5</b>	<b>Anexo 5 - Tabelas .....</b>	<b>119</b>
8	REFERÊNCIAS .....	125
APÊNDICE		

## LISTA DE SIGLAS

ACM	Anticorpos monoclonais
ATLL	Linfoma/ leucemia de células T do adulto
BA	Biópsia por agulha grossa
BC	Biópsia cirúrgica
CD	Capacidade diagnóstica
CEP	Comitê de ética em pesquisa
DD	Desempenho diagnóstico
DLPT	Doença linfoproliferativa pós-transplante
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EBER	Transcritos de RNA do vírus <i>Epstein-Barr</i>
EBV	Vírus <i>Epstein-Barr</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ESMO	Sociedade Europeia de Oncologia Médica
EUA	Estados Unidos da América
FFPE	Espécime fixado em formol e incluído em parafina
FISH	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
H&E	Hematoxilina e eosina
HIS EBV	Hibridização <i>in situ</i> para vírus <i>Epstein-Barr</i> Vírus linfotrópico de células T humanas

HTLV	
IFT CMF	Imunofenotipagem por citometria de fluxo
IG	Imunoglobulina
IHQ	Imuno-histoquímica
LB	Linfoma de Burkitt
LBAG	Linfoma B de alto grau
LBI LDGCBxLH	Linfoma de células B inclassificável, com características intermediárias entre o Linfoma difuso de grandes células B e o Linfoma de Hodgkin
LCM	Linfoma de células do manto
LDGCB CG	Linfoma difuso de grandes células B, centro germinativo
LDGCB EBV +	Linfoma difuso de grandes células B <i>Epstein-Barr</i> vírus positivo
LDGCB não CG	Linfoma difuso de grandes células B, não centro germinativo
LDGCB PM	Linfoma difuso de grandes células B, primário do mediastino
LF + LDGCB	Linfoma folicular + linfoma difuso de grandes células B
LF 1/2	Linfoma folicular grau 1/2
LF 3	Linfoma folicular grau 3

LGCA ALK -	Linfoma de grandes células anaplásicas ALK negativo
LGCA ALK +	Linfoma de grandes células anaplásicas ALK positivo
LGCBTH	Linfoma de grandes células B, rico em células T e histiócitos
LGL	Leucemia de células granulares grandes
LH PLN	Linfoma de Hodgkin, predominância linfocítica nodular
LHc	Linfoma de Hodgkin clássico
LLA B	Linfoma linfoblástico de imunofenótipo B
LLA T	Linfoma linfoblástico de imunofenótipo T
LLC	Linfoma linfocítico
LPL	Linfoma linfoplasmocítico
LTAI	Linfoma de células T angioimunoblástico
LTP SOE	Linfoma de células T periféricas SOE
LZM	Linfoma da zona marginal
LZM + LDGCB	Linfoma da zona marginal + linfoma difuso de grandes células B
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NGS	Sequenciamento de nova geração
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PET CT	Tomografia por emissão de pósitrons

REAL	Revised European/ American Lymphoma Classification
RNA	Ácido ribonucléico
RPMI	Solução de <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SUV	Valor de absorção padrão
TC	Tomografia computadorizada
TCR	Gene do receptor de células T
US	Ultrassom

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo dos principais trabalhos realizados e publicados após a primeira edição da classificação da OMS. ....	20
Tabela 2 - Relação de códigos e respectivas categorias morfológicas*.....	27
Tabela 3 - Relação de códigos e respectivos subgrupos de entidades*.....	28
Tabela 4 - Relação de códigos e respectivos resultados de exames de IFT CMF. .....	29
Tabela 5 - Relação de classificação, códigos e respectivo desempenho diagnóstico. ....	30
Tabela 6 - Relação de códigos e respectiva contribuição relativa da clínica e demais exames para o diagnóstico final. ....	32
Tabela 7 - Características clínicas gerais dos pacientes dos grupos de BA e BC. .....	37
Tabela 8 - Características relacionadas ao procedimento e à amostra coletada nos pacientes submetidos a BA. ....	38
Tabela 9 - Comparação da distribuição dos casos de BA e BC entre amostras originais e de revisão e comparação do desempenho diagnóstico entre amostras originais e de revisão. ....	40
Tabela 10 - Exames complementares realizados nas amostras obtidas por BA e BC. ....	41
Tabela 11 - Sumário da distribuição dos diagnósticos finais por frequência na casuística estudada.....	42

Tabela 12 – Sumário simplificado da distribuição dos diagnósticos finais agrupados em categorias por frequência na casuística estudada.....	43
Tabela 13 - Distribuição do número de casos diagnosticados em BA em cada subgrupo de entidades.....	44
Tabela 14 - Distribuição dos casos de BA e BC de acordo com o desempenho diagnóstico.....	44
Tabela 15 - Comparação dos casos em que foi possível estabelecer subclassificação completa (DD=4) e aqueles em que não foi (DD≠4) entre materiais originais e de revisão em BAs e BCs.....	45
Tabela 16 - Características clínicas e diagnóstico dos 10 pacientes do grupo de BA que obtiveram desempenho diagnóstico = 3.....	46
Tabela 17 - Características clínicas e diagnóstico dos 9 pacientes do grupo de BA que obtiveram amostras consideradas não satisfatórias (desempenho diagnóstico = 0, 1 e 2).....	47
Tabela 18 - Características clínicas e diagnóstico dos 4 pacientes do grupo de BC que obtiveram desempenho diagnóstico = 3.....	47
Tabela 19 - Características clínicas e diagnóstico dos 3 pacientes do grupo de BC que obtiveram amostras consideradas não satisfatórias (desempenho diagnóstico = 0, 1 e 2).....	48
Tabela 20 - distribuição geral das contribuições relativas da clínica/ radiologia e dos demais exames nas amostras de BA e BC:.....	48
Tabela 21 - Número de casos e porcentagem distribuída nas categorias morfológicas e subgrupos de entidades em BAs e BCs.....	60
Tabela 22 - Distribuição do número de casos com DD diferente de 4 em categorias morfológicas em materiais de BA e BC.....	61

Tabela 23 - Distribuição do número de casos não satisfatórios em categorias morfológicas em BAs e BCs.....	62
Tabela 24 - Número de casos com desempenho diagnóstico diferente de 4 em relação aos subgrupos de entidades em materiais de BA e BC. ....	63
Tabela 25 - Distribuição do número de biópsias não satisfatórias (BA) que foram repetidas em nosso serviço em relação ao total de casos em cada subgrupo de entidades.....	65
Tabela 26 - Número de biópsias com IFT CMF inconclusiva entre o total de casos com IFT CMF distribuídos por subgrupos de entidades. ....	65
Tabela 27 - Distribuição dos casos com IFT CMF discordante de acordo com o total de casos com IFT CMF entre os subgrupos de entidades.....	67
Tabela 28 - Resumo dos dados clínicos dos pacientes com apresentação discordante no grupo de benignos.....	71
Tabela 29 - Resumo dos dados dos pacientes com peculiaridades clínicas no grupo do LHc.....	72
Tabela 30 - Resumo dos dados dos pacientes com peculiaridades clínicas no grupo dos linfomas B de pequenas células.....	73

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Comparação entre os diferentes métodos de imunofenotipagem – vantagens e desvantagens. Cortesia de Zerbini MCN.**Erro! Indicador não definido.**

Figura 2 - Divisão dos pacientes do estudo de acordo com o tipo de biópsia realizada e o desempenho diagnóstico (permite subclassificação completa x não permite subclassificação completa). BA = biópsia por agulha grossa, BC = biópsia cirúrgica, DD = desempenho diagnóstico. .... 31

Figura 3 - Divisão dos pacientes do estudo de acordo com o tipo de biópsia realizada e o desempenho diagnóstico (satisfatório x não satisfatório). BA = biópsia por agulha grossa, BC = biópsia cirúrgica, DD = desempenho diagnóstico. .... 32

Figura 4 - Distribuição do total e por tipo de biópsia dos casos internos ao longo dos anos, bem como o número de casos com desempenho diagnóstico diferente de 4. BA = biópsia por agulha grossa, BC = biópsia cirúrgica, DD dif 4 = desempenho diagnóstico diferente de 4. .... 39

Figura 5 - Distribuição dos pacientes com mais de uma biópsia em relação ao motivo que justificou sua indicação..... 41

Figura 6 - Distribuição dos subgrupos de entidades que se enquadraram na categoria morfológica 1..... 55

Figura 7 - Distribuição dos subgrupos de entidades que se enquadraram na categoria morfológica 2..... 56

Figura 8 - Distribuição dos subgrupos de entidades que se enquadraram na categoria morfológica 3..... 57

Figura 9 - Distribuição dos subgrupos de entidades que se enquadraram na categoria morfológica 4.....	58
Figura 10 - Distribuição dos subgrupos de entidades que se enquadraram na categoria morfológica 5. Linfoma de Hodgkin, PLN = Linfoma de Hodgkin, predominância linfocítica nodular.....	59
Figura 11 - Porcentagem de casos com desempenho diagnóstico diferente de 4 em relação às categorias morfológicas em materiais de BA e BC. BA = biópsia por agulha grossa, BC = biópsia cirúrgica. ....	61
Figura 12 - Distribuição da porcentagem de casos não satisfatórios em categorias morfológicas em BAs e BCs. BA = biópsia por agulha grossa, BC = biópsia cirúrgica. ....	62
Figura 13 - Porcentagem de casos com desempenho diagnóstico diferente de 4 em relação aos subgrupos de entidades em materiais de BA e BC. BA = biópsia por agulha grossa, BC = biópsia cirúrgica. ....	63
Figura 14 - Distribuição da porcentagem de biópsias não satisfatórias (BA) que foram repetidas em nosso serviço em relação ao total de casos em cada subgrupo de entidades. BA = biópsia por agulha grossa.....	65
Figura 15 - Distribuição das biópsias com IFT CMF inconclusiva entre os subgrupos de entidades. IFT CMF = imunofenotipagem por citometria de fluxo. ....	66
Figura 16 - Porcentagem de casos com IFT CMF discordante distribuídos entre os diferentes subgrupos de entidades em materiais de BA e BC. BA = biópsia por agulha grossa, BC = biópsia cirúrgica, Linfoma de Hodgkin, PLN = Linfoma de Hodgkin, predominância linfocítica nodular.....	67

Figura 17 - Distribuição do número de casos com desempenho diagnóstico (DD) igual a 4 e desempenho diagnóstico (DD) diferente de 4 entre os diferentes calibres de agulha grossa utilizados. DD = desempenho diagnóstico. ....	70
Figura 18 - Algoritmo geral de abordagem diagnóstica e de manejo da amostra do paciente com suspeita de doença linfoproliferativa.....	80

## LISTA DE IMAGENS

Imagem 1 - Duas células com padrão de sinais normal (A) e anormal (B) para o oncogene <i>cMYC</i> utilizando-se sonda do tipo <i>break apart</i> . A. Padrão normal, sendo observado um núcleo com dois pares de sinais vermelho e verde juntos. B. Padrão anormal, sendo observado um núcleo com um par de sinais verde e vermelho juntos, mostrando o alelo normal e um par de sinais verde e vermelho separados no alelo anormal, indicando o rearranjo do oncogene <i>cMYC</i> .....	12
Imagem 2 – Caso 161 – Linfonodo retroperitoneal. Exemplo de doença linfoproliferativa polimórfica semelhante à DLPT em paciente HIV positivo. A) H&E mostrando população celular polimórfica. B) HIS EBV mostrando positividade para EBV em subpopulação de células. ....	49
Imagem 3 – Caso 371 – Linfonodo cervical. Exemplo de proliferação linfoide com numerosos plasmócitos, compatível com linfadenopatia auto-imune. A) H&E mostrando alguns folículos linfoides. B) CD138 ressaltando o componente de plasmócitos. ....	50
Imagem 4 – Caso 41 – Partes moles (glúteo). Exemplo de linfoma linfoblástico T, TDT negativo. A) H&E. B) CD3, C) TDT e D) KI67.....	52
Imagem 5 – Caso 52 – Linfonodo retroperitoneal. Linfonodo apresentando infiltração parcial por neoplasia de células B pequenas e maduras. A) H&E demonstra preservação arquitetural relativa, porém com infiltração de cápsula e tecido adiposo adjacente. B) CD21 mostrando arquitetura folicular preservada. C) CD20 mostrando a distribuição dos linfócitos B e D) CD3 mostrando a distribuição dos linfócitos T. ....	53

Imagem 6 – Caso 470 – Linfonodo cervical. Exemplo de linfoma difuso de grandes células B, EBV positivo. A) H&E mostrando predomínio de células grandes em meio a fundo polimórfico, fibrose e áreas de necrose. B) Positividade para EBV na maior parte das células pelo método de HIS. .... 54

Imagem 7 – Caso 135 – Linfonodo cervical. Exemplo de Linfoma B de alto grau com rearranjo do MYC e do BCL2. A) H&E mostrando neoplasia composta por células intermediárias a grandes. B) Núcleo em intérfase apresentando rearranjo IGH/BCL2 demonstrado por meio de sonda do tipo dual fusion para os dois genes, na qual o sinal vermelho corresponde ao gene BCL2 e o sinal verde corresponde ao gene IGH. Os sinais verde e vermelho separados indicam os alelos normais, enquanto o par de sinais verde e vermelho juntos indicam os alelos rearranjados. C) Núcleo em intérfase apresentando rearranjo do gene cMYC por meio de sonda break apart, na qual um sinal de fusão representa o alelo normal e os sinais verde e vermelho separados representam o alelo rearranjado. .... 54

Imagem 8 – Caso 468 – Linfonodo cervical. Exemplo de BA inconclusiva, suspeita para linfoma de Hodgkin clássico. A) H&E em menor aumento mostrando fragmentos de linfonodo com densa fibrose, por vezes delimitando nódulos. B) H&E maior aumento mostrando fibrose e fundo inflamatório misto, rico em eosinófilos. .... 64

Imagem 9 – Caso 459 – Linfonodo inguinal. Linfoma/ leucemia de células T do adulto (ATLL) + linfoma linfocítico/ LLC. A) H&E mostrando o componente agressivo (ATLL). B) H&E mostrando componente de baixo grau (LLC) à esquerda e componente agressivo (ATLL) à direita. C) CD3, D) CD25, E) FOXP3

positivos no componente de ATLL. F) CD20, G) CD23 e H) CD5 positivos no componente de LLC.....	69
Imagem 10 – Caso 167 – Linfonodo retroperitoneal - Linfoma linfocítico/ LLC acelerada. A) H&E mostrando proliferação linfoide com aumento do contingente de células grandes. B) CD20, C) CD23, D) CD5 positivos nas células neoplásicas. E.1) KI67 em menor aumento mostrando a distribuição e expansão dos centros de proliferação. E.2) KI67 em maior aumento em um centro de proliferação.....	74
Imagem 11 – Caso 46 – Linfonodo abdominal. Linfoma linfocítico com extensa reação granulomatosa associada. A) H&E mostrando reação granulomatosa mascarando proliferação de pequenos linfócitos. B) CD20 positivo nos linfócitos pequenos, assim como o CD23 (C) e o CD5 (D).....	74
Imagem 12 – Caso 322 – Linfonodo inguinal. Linfoma difuso de grandes células B, subgrupo imuno-histoquímico não centro germinativo com baixa captação no PET-CT. A) H&E mostrando proliferação de células grandes. B) CD20, C) KI67 – alto e D) MUM1 positivos. ....	76
Imagem 13 – Caso 482 – Linfonodo inguinal - Linfoma de células T periféricas SOE. A) H&E. Expressão de B) CD3 e D) CD4. Perda de expressão de C) CD7. ....	77
Imagem 14 – Caso 112 – Linfonodo cervical - Linfoma folicular grau 1 com captação ao PET CT mais alta do que o esperado (SUV = 10,1). A) H&E menor aumento, mostrando a arquitetura nodular. B) H&E maior aumento, destacando nódulo composto predominantemente por linfócitos pequenos. ....	78
Imagem 15 – Caso 405 – Linfonodo cervical. Linfoma folicular grau 3A com baixa captação ao PET CT (SUV = 2,7). A) H&E menor aumento mostrando arquitetura	

nodular. B) H&E maior aumento destacando nódulo com numerosas células grandes. .... 79

## RESUMO

Gonçalves MC. *A biópsia por agulha grossa no diagnóstico em hematopatologia: um estudo sobre a capacidade diagnóstica e o papel da abordagem multidisciplinar e dos exames complementares na otimização dos resultados* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

**INTRODUÇÃO:** A biópsia cirúrgica (BC) é considerada o método ideal para obtenção de material para o diagnóstico de linfomas, no entanto, técnicas percutâneas menos invasivas têm ganhado espaço, destacando-se a biópsia por agulha grossa (BA). O objetivo do presente estudo foi comparar a capacidade diagnóstica de BCs e BAs, bem como avaliar a aplicabilidade dos critérios da OMS 2017 no diagnóstico de proliferações linfoides benignas e malignas em BAs. **CASUÍSTICA E MÉTODOS:** Foram selecionados casos de proliferações linfoides, com material de biópsia disponível no Laboratório de Patologia do Hospital Sírio-Libanês no período de outubro de 2013 a agosto de 2017. Os casos foram divididos em grupos de BC e BA e a capacidade diagnóstica dos dois métodos foi medida, levando-se em consideração o percentual de diagnósticos definitivos obtidos. Foi analisado o impacto de fatores como características inerentes a diferentes subgrupos de doenças, obtenção de dados clínicos, avaliação da adequabilidade da amostra por patologista durante o procedimento, número e tamanho de fragmentos, calibre da agulha, bem como realização de imuno-histoquímica (IHQ), imunofenotipagem por citometria de fluxo (IFT CMF) e demais exames complementares. **RESULTADOS:** Amostras de 476 pacientes foram analisadas, sendo 218 BAs e 258 BCs. A capacidade diagnóstica das BCs foi de 97,3% e das BAs, 91,3% ( $P=0,010$ ). Em relação à contribuição relativa dos outros fatores analisados, informações clínicas foram imprescindíveis para o diagnóstico em 20,6% das BAs, em comparação com 7,4% das BCs ( $P>0,001$ ), IHQ em 96,3% das BAs em comparação com 91,5% das BCs ( $P=0,020$ ), IFT CMF em 12% das BAs em comparação com 6,8% das BCs ( $P=0,165$ ) e demais exames em 8,9% das BAs em comparação com 17,3% das BCs ( $P=0,140$ ). Maior porcentagem de BAs não satisfatórias foi observada

em casos de linfoma de células T (10%), seguido pelo linfoma de Hodgkin clássico (9,4%). Maior discordância com dados clínicos foi observada na gradação dos linfomas foliculares em amostras de BA (23,1%). Maior porcentagem de amostras insatisfatórias e de resultados discordantes na IFT CMF foi encontrada no Linfoma de Hodgkin clássico (48,5% de discordância) e predominância linfocítica nodular (100% de discordância). Fatores que não influenciaram diretamente no desempenho diagnóstico neste estudo foram a avaliação do material por patologista durante o procedimento, número e tamanho dos fragmentos e calibre da agulha. **CONCLUSÃO:** A BA demonstrou ser útil no diagnóstico de proliferações linfoides nesta instituição, sendo possível aplicar os critérios da OMS 2017. O seu desempenho dependeu de maior integração entre dados clínicos e exames complementares. Em especial, a IFT CMF mostrou-se útil neste contexto. A principal limitação da BA esteve relacionada ao diagnóstico de algumas entidades como os linfomas de células T e os linfomas de Hodgkin clássico.

**Descritores:** Biópsia por agulha grossa; Linfoma; Hematopatologia; Diagnóstico; Abordagem multidisciplinar; Imunofenotipagem.

## ABSTRACT

Gonçalves MC. *Core needle biopsy in hematopathology diagnosis: a study on the diagnostic capacity and the role of the multidisciplinary approach and complementary exams in the optimization of results* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

**INTRODUCTION:** Surgical biopsy (SEB) is considered to be the ideal method to obtain material for lymphoma diagnosis, however, less invasive percutaneous techniques have been gaining space, especially core needle biopsy (CNB). The aim of the present study was to compare the diagnostic yield of SEB and CNB, as well as to assess the applicability of the 2017 WHO criteria in the diagnosis of benign and malignant lymphoid proliferations in CNB. **CASUISTRY AND METHODS:** Cases of lymphoid proliferation with available material at the Pathology Laboratory of Hospital Sírio-Libanês were selected from October 2013 to August 2017. The cases were divided into SEB and CNB groups and the diagnostic yield of the two methods was measured, taking into account the percentage of definitive diagnoses obtained. We analyzed the impact of factors such as inherent characteristics of different subgroups of diseases, obtainment of clinical data, evaluation of the suitability of the sample by a pathologist during the procedure, number and size of fragments, needle gauge, as well as performing immunohistochemistry (IHC), flow cytometry immunophenotyping (FC) and other complementary tests. **RESULTS:** Samples from 476 patients were analyzed, 218 CNB and 258 SEB. The diagnostic yield of SEB was 97,3% and of CNB, 91,3% ( $P=0,010$ ). Regarding the relative contribution of the other factors analyzed, clinical information was essential for diagnosis in 20,6% of CNB, compared to 7,4% of SEB ( $P<0,001$ ), IHC in 96,3% of CNB compared to 91,5% of SEB ( $P=0,020$ ), FC in 12% of CNB compared to 6,8% of SEB ( $P=0,165$ ) and other exams in 8,9% of CNB compared with 17,3% of SEB ( $P=0,140$ ). A higher percentage of non-diagnostic CNB was observed in cases of T-cell lymphoma (10%), followed by classical Hodgkin's lymphoma (9,4%). Greater disagreement with clinical data was observed in the grading of follicular lymphomas in CNB (23,1%). A higher percentage of unsatisfactory samples and

discordant results in FC was found in classical Hodgkin's Lymphoma (48,5% disagreement) and nodular lymphocytic predominance Hodgkin's Lymphoma (100% disagreement). Factors that did not directly influence the diagnostic performance in this study were the assessment of the material by a pathologist during the procedure, number and size of fragments and needle gauge.

**CONCLUSION:** CNB proved to be useful in the diagnosis of lymphoid proliferations in this institution and it was possible to apply the WHO 2017 criteria. Its performance depended on greater integration between clinical data and complementary exams. In particular, FC proved to be useful in this context. The main limitation of CNB was related to the diagnosis of some entities such as T-cell lymphomas and classical Hodgkin's lymphomas.

**Descriptors:** Core needle biopsy; Lymphoma; Hematopathology; Diagnosis; Multidisciplinary approach; Immunophenotyping.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos gerais

Muitas mudanças aconteceram nos últimos anos no que diz respeito ao diagnóstico anatomopatológico das neoplasias hematológicas. A grande revolução neste campo ocorreu após as décadas de 1950 e 1960, com o maior entendimento sobre os componentes normais do sistema imunológico e seu funcionamento. Em 1974, a classificação de Lukes/ Collins<sup>(1)</sup> e a classificação de Kiel<sup>(2)</sup>, de Lennert e colaboradores foram publicadas e surgiu pela primeira vez o conceito de se entender os linfomas com base nas células normais do sistema imunológico a que eles se assemelham. Em 1982, após a publicação da *Working Formulation*<sup>(3)</sup> pelo *National Cancer Institute*, nos Estados Unidos, retrocesso foi feito neste sentido, sendo adotada por grande parte dos patologistas uma classificação puramente morfológica. Finalmente, em 1994, o consenso estabelecido entre as comunidades científicas da Europa, Estados Unidos da América (EUA) e Ásia criou uma classificação unificada para essas neoplasias. Neste momento, a classificação REAL (Revised European/ American Lymphoma Classification)<sup>(4)</sup> estabeleceu linguagem única e universal, que serviu de alicerce para classificações posteriores, como a Classificação dos tumores dos tecidos hematopoiéticos e linfoides pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2001<sup>(5)</sup> e 2008<sup>(6)</sup>, esta última tendo sido recentemente revista e atualizada em 2017<sup>(7)</sup>. Nesta revisão, algumas doenças tiveram seus critérios diagnósticos refinados, foram criadas entidades provisórias, foram estabelecidos com maior clareza os critérios diagnósticos e o papel das lesões iniciais no processo de linfomagenese, bem como foi realizado maior detalhamento do painel genético/

molecular de numerosos linfomas com vistas a terapia-alvo<sup>(7, 8)</sup>. O sistema de classificação da OMS é robusto, baseado em entidades clínico-patológicas definidas, no qual o diagnóstico das neoplasias se dá por meio da integração de aspectos clínicos, morfológicos, imunofenotípicos e moleculares<sup>(9)</sup>.

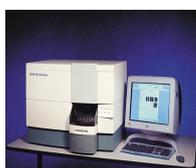
Outros fatores que contribuíram de maneira decisiva para os avanços diagnósticos na área foram: 1) o constante aperfeiçoamento dos métodos de imunomarcagem como a imuno-histoquímica (IHQ) e a imunofenotipagem por citometria de fluxo (IFT CMF), o que levou a identificação confiável de linhagens celulares específicas; 2) o desenvolvimento de ferramentas moleculares para diagnóstico, como a reação em cadeia de polimerase (PCR) para identificação de clonalidade, a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) para identificação de anormalidades cromossômicas específicas, a análise mutacional por técnicas de amplificação e sequenciamento, além do perfil de expressão gênica; 3) a avaliação dos espécimes hematológicos por especialistas dedicados a área de hematopatologia; 4) reuniões multidisciplinares levando a maior interação clínico-patológica; 5) uso da tomografia computadorizada com emissão de pósitrons (PET CT), permitindo identificação de lesões com maior metabolismo glicolítico e realização de estadiamento adequado<sup>(10-12)</sup>.

## **1.2 Os exames complementares em hematopatologia**

Os exames complementares mais amplamente utilizados na prática diagnóstica em hematopatologia são a imuno-histoquímica (IHQ) e a imunofenotipagem por citometria de fluxo (IFT CMF). Classicamente, a IHQ tem sido realizada em fragmentos de tecido e a IFT CMF em amostras de fluidos. São utilizadas com o mesmo objetivo comum: a caracterização imunofenotípica de populações hematolinfoides, porém, diferenças importantes existem entre

essas duas metodologias. A IFT CMF tem as vantagens de 1) poder ser utilizada em situações nas quais tecido sólido não está disponível (amostras de sangue, aspirados de medula óssea e fluidos); 2) permitir avaliação da coexpressão de múltiplos marcadores em uma única célula; 3) apresentar elevada sensibilidade (0,01% de sensibilidade de detecção); 4) detectar pequenas populações anormais em fundo de células normais e 5) permitir análise quantitativa. As principais desvantagens quando comparada à IHQ são 1) impossibilidade de se avaliar a arquitetura do tecido; 2) impossibilidade de se correlacionar diretamente a morfologia com o imunofenótipo; 3) indisponibilidade de marcadores, como para alguns agentes infecciosos - Citomegalovírus, Toxoplasma, vírus *Epstein-Barr* (EBV), e etc. e para ciclina-D1 e KI-67 e 4) perda potencial de células tumorais e antígenos com o passar do tempo, por degradação do material. A escolha da técnica de caracterização imunofenotípica a ser realizada depende de muitos fatores, entre eles o tipo de doença do paciente, a finalidade do exame e o tipo de amostra. No entanto, estes exames podem ser utilizados de forma complementar em um mesmo paciente e em uma mesma amostra<sup>(13)</sup>. A figura 1 ilustra as principais vantagens e desvantagens da IFT CMF e da IHQ.

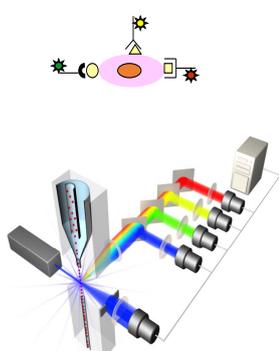
### Citometria de fluxo



#### Células em suspensão

Sangue  
Líquidos cavitários  
Aspirados celulares

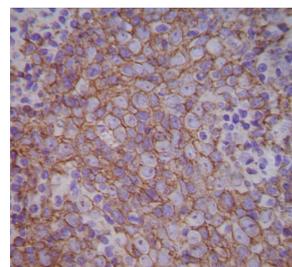
Permite a análise **simultânea**  
de Ags diferentes



### Imuno-histoquímica

Fragmentos de tecidos  
(biópsias)

Correlação morfológica



CD20

Figura 1 – Comparação entre os diferentes métodos de imunofenotipagem – vantagens e desvantagens. Cortesia de Zerbini MCN.

Além dos métodos de imunofenotipagem, métodos moleculares têm sido empregados com frequência crescente no diagnóstico e avaliação de prognóstico de neoplasias hematológicas e compreendem a pesquisa de clonalidade de linfócitos B e T por PCR, a pesquisa de anormalidades cromossômicas e citogenéticas específicas por FISH, a análise mutacional de genes específicos, por meio de técnicas de amplificação e sequenciamento e a avaliação do perfil de expressão gênica.

### 1.2.1 A técnica de imuno-histoquímica (IHQ)

A IHQ tem papel fundamental no diagnóstico e definição de subtipos de entidades em hematopatologia, possibilitando a identificação objetiva de características fenotípicas específicas associadas a diferentes proliferações linfoides (permite identificar a célula de origem do linfoma, a produção de proteínas oncogênicas e as características proliferativas da doença)<sup>(14)</sup>.

Em teoria, a IHQ é uma técnica simples, que requer três elementos básicos: um antígeno celular de interesse, um anticorpo primário contra o antígeno e um sistema de amplificação envolvendo um anticorpo secundário/ detecção para visualizar a localização do complexo antígeno-anticorpo. Na prática, porém, existem questões técnicas mais complexas, que dependem das condições do tecido onde se encontra o antígeno, o tipo, especificidade e afinidade do anticorpo primário e o sistema de detecção utilizado. A interpretação da reação imuno-histoquímica requer conhecimento e controle sobre estes elementos, assim como patologista experiente para interpretar os resultados<sup>(14)</sup>.

Para que a reação antígeno-anticorpo ocorra de forma adequada, é crucial que os epítomos antigênicos mantenham sua conformação reativa original e, para isso, é necessário a rápida fixação do tecido, normalmente em formalina

tamponada a 10%. A fixação é essencial para a preservação da antigenicidade, no entanto, o processo de fixação por si só pode causar modificação química destes epítomos. Para que os antígenos sejam corretamente identificados após a fixação, é necessária etapa subsequente de recuperação antigênica, na qual as ligações e modificações estruturais promovidas pela formalina são revertidas. Esta recuperação é feita submetendo-se os tecidos fixados ao calor úmido, aproximadamente 100°C<sup>(15)</sup>.

Existem duas categorias principais de anticorpos utilizados em patologia diagnóstica: monoclonais e policlonais. Anticorpos policlonais são obtidos injetando-se preparações antigênicas de interesse em animais (coelhos e cabras) e coletando-se o soro destes animais após a resposta imunológica. O soro é purificado para eliminar reações não desejadas, porém sempre compreende espectro de moléculas de anticorpo originadas de múltiplos plasmócitos diferentes (por isso o termo policlonal). A especificidade de uma preparação policlonal de anticorpos é dependente da pureza do preparado antigênico original e da extensão de sua absorção. A obtenção de preparações muito específicas é problemática e sua completa padronização geralmente não é possível. Anticorpos monoclonais, em contraste, são produtos de um único plasmócito imortalizado, o que evita a maior parte dos problemas relacionados a especificidade e heterogeneidade inerentes a uma preparação policlonal. A tecnologia do hibridoma, desenvolvida na década de 1970 permite a imortalização de um plasmócito produtor de anticorpos fundindo-se este plasmócito a uma célula da linhagem de plasmocitoma. Células híbridas individuais podem sofrer expansão clonal em tecidos de cultura ou em ratos e coelhos, como tumores, fornecendo desta forma uma fonte contínua de

anticorpos de composição e reatividade conhecidas, com alta qualidade e especificidade<sup>(14, 15)</sup>.

A vantagem da especificidade, no entanto, pode também ser desvantagem quando aplicada a proteínas desnaturadas em cortes histológicos. Como um preparado policlonal geralmente contém mistura de anticorpos que reagem a múltiplos epítomos, não há grande impacto se um dos epítomos se torna inativo pelo processo de fixação. Por outro lado, se um único epítopo reconhecido por um anticorpo monoclonal é afetado pelo processo de fixação, o anticorpo não pode ser utilizado para IHQ<sup>(16)</sup>.

Independente do tipo de anticorpo escolhido, controle cuidadoso de sua produção e funcionamento deve ser mantido ao longo do tempo e sua afinidade e especificidade pode ser testada por meio de controles positivos e negativos.

Os sistemas de detecção compreendem uma enzima, um substrato cromogênico e um reagente-ponte que liga a enzima ao anticorpo. Quando um anticorpo marcado com uma enzima reconhece o antígeno de interesse na célula do tecido, ele se liga ao seu antígeno. O tecido então é lavado, para a remoção do excesso de anticorpos não ligados. Após este processo, aplica-se o substrato da enzima ligada ao anticorpo no tecido. A reação da enzima com o seu substrato produz substância cromogênica que pode ser detectada à inspeção microscópica.

Por meio da imuno-histoquímica, é possível observar a arquitetura, verificando-se o padrão de marcação no seu sítio específico tecidual. É possível identificar qual tipo de célula está se ligando ao anticorpo, bem como o compartimento celular marcado (núcleo, citoplasma, membrana). O sistema de detecção mais amplamente utilizado atualmente é o baseado no complexo

imunoperoxidase avidina-biotina. Outros métodos de detecção como o baseado em polímeros de nova geração ou em amplificação de sinal mediada por tiramina também foram desenvolvidos<sup>(14)</sup>.

### 1.2.2 A técnica de hibridização *in situ* (HIS) para detecção do vírus *Epstein-Barr* (EBV)

A infecção por EBV está associada a uma variedade de condições patológicas. O vírus foi demonstrado na mononucleose infecciosa, linfoma de Burkitt, no linfoma de Hodgkin clássico, no linfoma difuso de grandes células B, no linfoma de células T/NK extranodal do tipo nasal, nos linfomas de células T (especialmente no linfoma de células T angioimunoblástico), entre outros. Em pacientes com quadros de imunossupressão congênita ou adquirida, o vírus também foi demonstrado em diversos tipos de doenças linfoproliferativas e linfomas<sup>(7)</sup>. Os *kits* utilizados para a realização deste exame em FFPE consistem em um coquetel de sondas de oligonucleotídeos marcados com cromógenos e projetados para demonstrar células latentemente infectadas com o EBV. A sonda hibridiza com transcritos de RNA codificados pelo vírus EBV (EBER) expressos abundantemente e que estão concentrados nos núcleos de células infectadas de forma latente<sup>(17)</sup>.

### 1.2.3 A técnica de imunofenotipagem por citometria de fluxo (IFT CMF)

A IFT CMF tem habilidade peculiar em analisar de forma rápida e simultânea múltiplos antígenos em células hematopoiéticas, o que permite discriminar padrões normais e anormais de expressão antigênica, sendo, portanto, muito útil no diagnóstico de neoplasia. É possível obter informações

para o diagnóstico, classificação e prognóstico de grande número de desordens hematológicas. As aplicações da IFT CMF incluem diagnóstico de leucemias agudas, caracterização de linfomas, avaliação de marcadores prognósticos, avaliação complementar de neoplasias mielodisplásicas e mieloproliferativas e pesquisa de doença residual mínima<sup>(18)</sup>.

Para que seja feito o exame, o espécime deve ser coletado e enviado prontamente ao laboratório nos seguintes meios de transporte, preferencialmente: 1) sangue periférico – ácido etilenodiaminotetracético (EDTA); 2) aspirados de medula óssea - heparina sódica; 3) espécimes de tecidos sólidos (punção aspirativa por agulha fina, biópsia por agulha grossa, biópsia cirúrgica) – meio de *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI). As amostras devem ser encaminhadas evitando-se exposição a extremos de temperatura. Estes cuidados são particularmente importantes em casos de tumores com altas taxas proliferativas e susceptibilidade a morte celular rápida, o que pode ocasionar perda da qualidade do espécime<sup>(19)</sup>.

O exame de citometria de fluxo tem como base a análise celular realizada quando as células passam através de um sistema fluido. A técnica aplicada a hematopatologia consiste em marcar com fluorocromos anticorpos que reconhecem vários antígenos de interesse na superfície, no citoplasma ou no núcleo das células. Este composto fluorescente (fluorocromo) absorve a luz de um determinado comprimento de onda e depois emite luz diferente, com maior comprimento de onda. A possibilidade de se utilizar simultaneamente múltiplos anticorpos contra diferentes antígenos em um mesmo tubo requer que diferentes fluorocromos emitam luz em comprimentos de onda suficientemente distintos

uns dos outros. Para isso, um sistema de um ou mais *lasers* é utilizado para emitir luz em diversos comprimentos de onda<sup>(13)</sup>.

As células em suspensão são incubadas com anticorpos acoplados a fluorocromos e atravessam o *laser* em fila única. O ponto onde a luz emitida pelo *laser* e a célula a ser analisada se encontram é chamado de ponto de interrogação ou ponto de análise. Se o sistema possui múltiplos *lasers*, há múltiplos pontos de análise. A fluorescência de cada célula que passa na frente do *laser* é coletada por tubos fotomultiplicadores (detectores), sendo um detector para cada fluorocromo. Através de uma série de filtros e espelhos, a luz que alcança cada detector é restrita a uma banda de um comprimento de onda específico. A intensidade de fluorescência para cada fluorocromo é proporcional a quantidade de anticorpos que se ligam à célula<sup>(13)</sup>.

Informações adicionais a respeito das características físicas das células podem ser obtidas com base na dispersão de luz frontal e na dispersão de luz ortogonal. O ângulo de desvio da luz resultante da dispersão frontal é proporcional ao tamanho celular e a dispersão ortogonal é proporcional a complexidade celular (granularidade citoplasmática). Estes parâmetros são registrados em escala linear. Ao término da aquisição de uma amostra, cada célula que passou pelo citômetro vai ter suas características registradas e armazenadas (dispersão frontal, dispersão lateral, sinais de fluorescência). Após toda a informação ser adquirida, um programa de computador analisa os dados com a finalidade de identificar, caracterizar e quantificar as populações celulares normais e anormais, apresentando os resultados em diferentes tipos de gráficos<sup>(19-21)</sup>. As etapas do exame de IFT CMF estão ilustradas na figura 1.

#### 1.2.4 A técnica de pesquisa de clonalidade dos genes da imunoglobulina (*IG*) e do gene do receptor de células T (*TCR*) por reação em cadeia de polimerase (PCR)

A reação em cadeia de polimerase (PCR) é uma técnica baseada em amplificação de sequências de ácido desoxirribonucléico (DNA), na qual *primers* oligonucleotídicos apropriados são sintetizados a partir do conhecimento das sequências de nucleotídeos que flanqueiam o *locus* ou *loci* de interesse. Por meio de repetidos ciclos de desnaturação, ligação de *primers* e extensão com uma polimerase termoestável (como a *Taq* polimerase), amplificação exponencial da sequência-alvo compreendida entre os *primers* é atingida. Após a amplificação, numerosas estratégias de detecção podem ser empregadas para detectar os produtos, incluindo eletroforese em gel (menos utilizada) ou eletroforese capilar (mais utilizada), com a utilização de *primers* fluorescentes<sup>(22)</sup>.

A PCR é a técnica mais utilizada para a detecção dos rearranjos clonais dos genes da imunoglobulina (*IG*) e dos genes do receptor de células T (*TCR*). A análise dos rearranjos destes genes por vezes é importante no contexto de uma proliferação linfóide atípica, para distinguir linfoproliferações reativas de neoplásicas (clonais)<sup>(13)</sup>.

A configuração dos vários genes da *IG* e do *TCR* é similar e geralmente contém múltiplas regiões de variedade (V), diversidade (D) e ligação (J). Quando uma célula linfóide sofre rearranjo, uma região V, uma D (quando presente) e uma J se aproximam e se ligam de forma randômica, formando uma infinidade de possíveis combinações VDJ ou VJ. Este mecanismo é determinante da diversidade imunológica, sendo que diversidade adicional é gerada por meio da adição e deleção randômica de N-nucleotídeos e P-nucleotídeos pela enzima

TDT.

Como todos os linfócitos sofrem um rearranjo relativamente único do seu receptor, cada um vai ter uma configuração gênica diferente. Desta forma, muitos rearranjos de tamanhos diferentes são observados em amostras policlonais, enquanto um tamanho uniforme de rearranjo predomina em amostras clonais<sup>(23)</sup>.

Para a realização do exame, geralmente um par de *primers* específico para a família da *IG* ou do *TCR* é utilizado. Estes se ligam às porções V ou J dos receptores rearranjados. Devido ao fato de rearranjos policlonais resultarem em produtos de diferentes tamanhos, uma variedade de picos diferentes é observada na eletroforese capilar de amostras policlonais, enquanto observa-se apenas um pico dominante em amostras monoclonais<sup>(22, 23)</sup>.

#### 1.2.5 A técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

Apesar de a análise citogenética convencional ainda ser o padrão-ouro para a detecção de anormalidades cromossômicas, a indisponibilidade de material fresco, baixo índice mitótico, baixa porcentagem de células neoplásicas, a complexidade citogenética e o tempo necessário para a realização da técnica impõe restrições ao seu uso rotineiro. Neste cenário, o exame de FISH consiste em importante adjunto à análise citogenética convencional e aos estudos moleculares na avaliação das neoplasias hematológicas. Pode ser realizado em diferentes tipos de amostras, como preparados de metáfases de células em cultura, núcleos em intérfase de material fresco e núcleos em intérfase de espécime fixado em formol e incluído em parafina (FFPE).

O principal uso do exame de FISH de intérfase em FFPE é na identificação de translocações e ampliações envolvendo genes específicos. Recentemente,

a avaliação de translocações envolvendo os genes *cMYC*, *BCL6* e *BCL2* tornou-se crucial para a subclassificação dos linfomas B de alto grau, de acordo com a revisão da classificação da OMS<sup>(7, 24)</sup>.

A metodologia do exame de FISH envolve a ligação de fragmentos de fita única de DNA a suas sequências-alvo genômicas complementares em um preparado celular ou tecido. Estas sondas conhecidas de DNA são marcadas de forma direta ou indireta a um fluorocromo, gerando sinal fluorescente no núcleo da célula quando se hibridizam com a sequência genômica de interesse. Este sinal pode ser observado em microscópio de fluorescência<sup>(25, 26)</sup>. A imagem 1 ilustra exemplos imagens de exame de FISH utilizando-se a sonda do tipo *break-apart* para o oncogene *cMYC*.

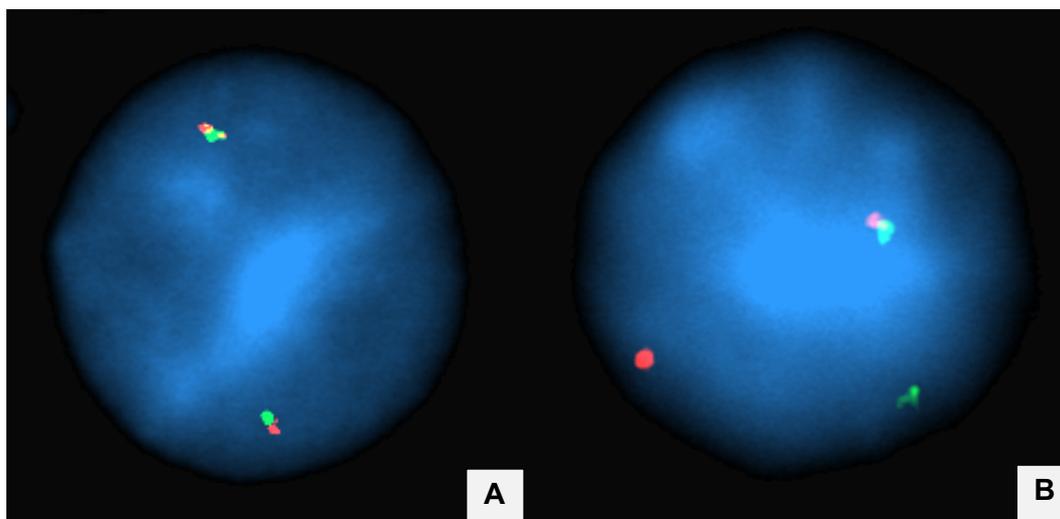


Imagem 1 - Duas células com padrão de sinais normal (A) e anormal (B) para o oncogene *cMYC* utilizando-se sonda do tipo *break apart*. A. Padrão normal, sendo observado um núcleo com dois pares de sinais vermelho e verde juntos. B. Padrão anormal, sendo observado um núcleo com um par de sinais verde e vermelho juntos, mostrando o alelo normal e um par de sinais verde e vermelho separados no alelo anormal, indicando o rearranjo do oncogene *cMYC*.

#### 1.2.6 A análise mutacional, o sequenciamento de nova geração (NGS) e o perfil de expressão gênica

A análise mutacional de vários genes tem significado clínico, diagnóstico e

prognóstico. Em geral, eram utilizadas técnicas de amplificação nas quais segmentos do gene que possuem a maior concentração de mutações eram amplificados por PCR e variações de sua conformação e tamanho eram pesquisadas em comparação com as observadas no gene selvagem<sup>(27)</sup>.

Estas técnicas de amplificação aos poucos deram lugar a técnicas mais modernas, como o sequenciamento de nova geração (NGS). O termo NGS é utilizado para abranger várias plataformas tecnológicas diferentes. Possui numerosas vantagens em comparação com métodos tradicionais de sequenciamento por sua habilidade em rapidamente sequenciar muitos genes na mesma reação, podendo detectar mutações, deleções, inserções, alterações numéricas e até mesmo translocações<sup>(28)</sup>. Esta técnica permitiu a descoberta de vasto número de novas mutações em neoplasias hematológicas. Algumas mutações têm significado clínico e painéis de alvos genéticos específicos estão sendo desenvolvidos para aperfeiçoar a caracterização das diferentes neoplasias<sup>(29)</sup>. Embora atualmente seu custo ainda seja elevado, no futuro será mais acessível e assumirá papel central nos diferentes laboratórios, suplantando muitas das outras tecnologias mencionadas anteriormente<sup>(30)</sup>.

O perfil de expressão gênica das neoplasias pode ser obtido por meio de técnica de *microarray* genético a partir da extração de RNA mensageiro das células em tecido. Esta técnica está sendo aplicada na descoberta de perfis característicos de expressão gênica em tumores, com utilidade prognóstica e tem sido amplamente explorada nos linfomas B e T, porém não está sendo aplicada para uso rotineiro até o momento, estando ainda limitada ao contexto de pesquisa<sup>(31-33)</sup>.

### **1.3 Técnicas de obtenção de material para diagnóstico patológico em onco-hematologia**

#### **1.3.1 A biópsia cirúrgica (BC)**

Para se estabelecer o diagnóstico de linfoma, o exame histológico é essencial. A obtenção de material por meio de biópsia cirúrgica (BC) é considerada o ideal devido a grande quantidade de tecido obtida desta maneira, permitindo avaliação da arquitetura, realização de IHQ, realização de exames moleculares complementares, além do armazenamento de tecido que pode ser utilizado posteriormente para fins de pesquisa<sup>(12, 34)</sup>. Desvantagens que são citadas para este método são o custo, o tempo de espera para a realização do procedimento, o tempo de permanência no hospital e a morbidade relacionada a sangramento, infecção, dor local, linfedema, linforrêia, além de cicatrizes não estéticas<sup>(35)</sup>.

#### **1.3.2 As técnicas percutâneas menos invasivas**

O conceito moderno de medicina personalizada preconiza que o tratamento mínimo eficaz é melhor do que o máximo tolerado. Seguindo essa linha, no que diz respeito a procedimento diagnóstico, este deve ser bem tolerado, relacionado a baixa morbidade, além de sensível, reprodutível, custo-efetivo e com boa acurácia<sup>(36, 37)</sup>. Pensando nestes quesitos, técnicas percutâneas menos invasivas, mais rápidas<sup>(38)</sup>, associadas a menor morbidade<sup>(39)</sup> e menor custo<sup>(40)</sup> quando comparadas com a biópsia cirúrgica tem ganhado espaço como alternativa viável.

##### *A punção aspirativa por agulha fina (PAAF)*

A punção aspirativa por agulha fina (PAAF) foi a primeira técnica

percutânea utilizada com esta finalidade. Seu uso não é recomendado para o diagnóstico inicial de linfomas e não deve ser realizada com este propósito, pois apenas espécimes citológicos são obtidos, sem informações sobre o padrão arquitetural. Em decorrência disso, se torna impossível o diagnóstico de várias entidades por este método<sup>(41, 42)</sup>. Porém, apesar das limitações, a PAAF ainda pode ser realizada como técnica adicional ambulatorial em casos em que se deseja excluir outros processos patológicos diferentes dos linfomas ou naqueles pacientes em que há necessidade de início imediato emergencial de corticosteroides, quando a biópsia foi realizada mas ainda aguarda processamento histológico<sup>(43, 44)</sup>.

#### *A biópsia por agulha grossa (BA)*

Devido às limitações da PAAF, a biópsia por agulha grossa (BA) tem sido a mais amplamente utilizada das técnicas percutâneas na prática diagnóstica. Ao contrário do que acontece com o material obtido por PAAF, no material obtido em BA é possível avaliar os três elementos-chave requeridos para o diagnóstico de linfomas: identificação celular, padrão arquitetural e imuno-histoquímica. O material obtido também tem sido utilizado com sucesso para testes moleculares adicionais<sup>(45-47)</sup>. Estes parâmetros analisados em conjunto permitem não só o diagnóstico de linfoma, como também a subclassificação em entidades<sup>(48, 49)</sup>, com alta reprodutibilidade, conforme reportado por estudo de Hu et al<sup>(50)</sup>, que mostrou concordância de 92% a 95% entre os patologistas.

As desvantagens citadas para a BA dão sempre como referência a menor quantidade de tecido obtida quando comparada a BC, com menos material disponível para exames complementares e pesquisas futuras. Pode haver prejuízo da visualização de maior detalhamento arquitetural, fato por vezes

decisivo para o diagnóstico de malignidade, além de limitação em casos de acometimento parcial do linfonodo pela neoplasia, devido a possível não representação da área de interesse. Desta forma, a apreciação do completo espectro morfológico em doenças polimórficas e heterogêneas ficaria limitada, por questões de amostragem, conforme relatado em casos de linfoma folicular, linfomas de células T, linfoma da zona marginal e no linfoma de Hodgkin<sup>(50-54)</sup>. Em relação às complicações, as mais descritas incluem hemorragia, pneumotórax e lesão de nervos<sup>(55)</sup>. No entanto, quando comparadas BA e BC, complicações graves são relatadas com frequência muito maior em associação a BC do que a BA<sup>(39)</sup>.

#### **1.4 Escolha da modalidade de exame de imagem para guiar a biópsia por agulha grossa e a escolha do sítio a ser abordado**

A BA normalmente é realizada guiada por imagem, por meio de ultrassom (US) ou tomografia computadorizada (TC). A escolha da técnica de imagem adequada depende da experiência do radiologista e da localização dos alvos em potencial. Como regra, em lesões periféricas são feitas biópsias guiadas por US e em lesões profundas é utilizada a TC<sup>(56)</sup>.

Procedimentos guiados por US são mais baratos, livres de radiação, mais rápidos e não há necessidade de o paciente permanecer internado. Esta técnica é particularmente útil para massas cervicais, supraclaviculares, axilares, inguinais e até mesmo para nódulos em fígado ou baço. Sondas de ultrassom de alta frequência permitem visualização clara dos sítios anatômicos e da agulha e o *Doppler* colorido é útil na identificação de estruturas vasculares. Além disso, compressão manual com a sonda do equipamento pode prevenir hematomas<sup>(57)</sup>.

Biópsias de linfonodos ou órgãos profundos são obtidas guiadas por TC, com necessidade de o paciente permanecer em observação por algumas horas. As vantagens da TC incluem visualização clara de todos os detalhes anatômicos e a possibilidade de se acessar praticamente qualquer área do corpo. No entanto, é método mais caro, envolve radiação e é mais demorado quando comparado ao US<sup>(58)</sup>.

Em relação à escolha do sítio a ser submetido a biópsia, como regra, quando o paciente tem linfonomegalias superficiais e profundas, é preferível acessar as superficiais, por ser mais rápido e mais seguro, pelo procedimento poder ser guiado por US e pela possibilidade de se obter amostras com agulhas mais calibrosas, resultando em maior quantidade de tecido<sup>(55)</sup>.

Entretanto, outros fatores também devem ser avaliados na decisão do sítio de biópsia, como: 1) o tamanho da lesão e o curso clínico, já que lesões maiores e de crescimento mais rápido tendem a representar clone tumoral mais agressivo; 2) as características de imagem, evitando-se áreas que possam corresponder a necrose; 3) os achados metabólicos, quando avaliação prévia por PET CT estiver disponível, devendo-se tentar acessar a lesão mais metabolicamente ativa; 4) os órgãos envolvidos, devendo-se dar preferência a sítios nodais em casos de doença com disseminação extensa nodal e extranodal<sup>(56-59)</sup>.

### **1.5 Perspectiva atual dos estudos sobre a aplicação clínica da biópsia por agulha grossa (BA)**

Várias publicações têm sido feitas em diversas regiões do mundo nas três últimas décadas com o objetivo de avaliar a eficácia da BA no diagnóstico de

neoplasias hematolinfoides. Em geral os estudos apontam capacidade diagnóstica bastante variável, em torno de 81,0% a 98,8%<sup>(12, 46, 60)</sup>, com taxas de subclassificação adequada de acordo com as entidades em torno de 72,3% a 96,8%<sup>(49, 51)</sup>. A capacidade diagnóstica geral da BA nos estudos realizados tem se mostrado semelhante à da BC, que gira em torno de 80% a 100%<sup>(40, 46)</sup>. A tabela 1 mostra resumo dos dados obtidos nos principais trabalhos publicados no tema. Os dados obtidos neste estudo foram incorporados a última linha desta tabela.

Entre os grandes trabalhos de revisão sistemática e metanálises disponíveis sobre o tema, encontram-se os seguintes estudos:

1) Revisão sistemática realizada por Frederiksen et al.<sup>(51)</sup> em 2015 analisando 42 estudos publicados entre 1989 e 2012 encontrou capacidade diagnóstica média de 74%, com subclassificação completa de linfomas. Este trabalho, no entanto, analisou em conjunto resultados tanto de estudos feitos com material obtido por PAAF quanto daqueles feitos com material obtido por BA, não sendo realizada análise separada de acordo com o método.

2) Metanálise publicada em 2020 por Warshavsky A et al.<sup>(61)</sup> compreendendo 22 estudos realizados entre 1996 e 2019 em amostras obtidas apenas de linfonodomegalias cervicais encontrou capacidade diagnóstica geral de 82,5%. O critério levado em consideração foi a possibilidade de se obter um diagnóstico que permite início de tratamento, independente de se ter conseguido ou não subclassificação final em entidades. O fato de terem sido incluídos estudos pertencentes a intervalo de tempo muito abrangente, com grande heterogeneidade de classificações e procedimentos utilizados pode ter interferido como viés na avaliação dos resultados obtidos.

3) Revisão de literatura publicada em 2021 de Seviar et al. <sup>(62)</sup> abrangendo 13 estudos compreendidos entre 2015 e 2020 encontrou capacidade diagnóstica com subclassificação final em entidades de 87% a 93% para BA, com média de 91,7%, comparada com 93,5% a 100% para BC, com média de 97,5%.

Tabela 1 - Resumo dos principais trabalhos realizados e publicados, avaliando acurácia de BAs após a primeira edição da classificação da OMS.

Autor (et al)	Ano	Local	Desenho do estudo	No de casos (BA)	Topografia	Método imagem para guiar BX	Calibre da agulha (gauge)	Fragmentos (N)	Comparação com BC do mesmo serviço (N)	DX geral	DX específicos	Métodos complementares	Avaliação por HMP <sup>1</sup>	Englobou outras doenças
Lachar W <sup>(40)</sup>	2007	EUA	retrospectivo	101	várias	US e TC	18	2 a 4	não	92,1%	87,1%	IHQ + CMF + TM	ND	não
de Kerviler <sup>(63)</sup>	2007	França	retrospectivo	180	superficial	US e TC	14 a 18	3 a 6	não	96,0%	ND	IHQ + TM	sim	sim
de Larrinoa A <sup>(60)</sup>	2007	Espanha	prospectivo	102	várias	US	18	4 a 5	sim (47)	88,2%	ND	IHQ + TM	ND	não
Yuan J <sup>(64)</sup>	2010	China	retrospectivo	1119	várias	US	18	2 a 3	não	73,0%	ND	IHQ	ND	sim
Burke C <sup>(54)</sup>	2011	Reino Unido	retrospectivo	187	cervical	US	14 a 18	1 a 7	sim (104)	81,0%	72,3%	IHQ	sim	não
Amador-Ortiz C <sup>(65)</sup>	2011	EUA	retrospectivo	263	várias	ND	18 a 20	2 a 4	não	90,1%	73,4%	IHQ + CMF + TM	sim	não
Pedersen O <sup>(66)</sup>	2013	Noruega	retrospectivo	140	cervical	US	14	1 a 4	não	92,1%	88,6%	IHQ + TM	sim	sim
Pruneri G <sup>(36)</sup>	2015	Itália	retrospectivo	390	várias	US e TC	14 a 18	ND	não	95,4%	85,1%	IHQ + TM	sim	não
Skelton E <sup>(46)</sup>	2015	Reino Unido	retrospectivo	237	várias	US e TC	14 a 20	2 a 6	sim (80)	97,0%	ND	IHQ + TM	sim	não
He Y <sup>(55)</sup>	2015	China	prospectivo	110	várias	US	14 e 16	2 a 6	sim (95)	95,4%	92,7%	IHQ	sim	não
Groneck L <sup>(45)</sup>	2016	Alemanha	retrospectivo	138	superficial	US	14 a 18	3 a 6	Sim (26)	91,6%	87,7%	IHQ	sim	sim
Pugliese N <sup>(67)</sup>	2016	Itália	prospectivo	185	várias	US	16	1 a 4	sim (187)	98,8%	96,8%	IHQ + TM	sim	sim
Johl A <sup>(68)</sup>	2016	Alemanha	retrospectivo	229	várias	ND	ND	ND	sim (1212)	ND	91,7%	IHQ + TM	sim	sim
Allin D <sup>(47)</sup>	2017	Reino Unido	retrospectivo	70	cervical	US	16	ND	não	ND	90,0%	IHQ	sim	sim
Han F <sup>(69)</sup>	2018	China	retrospectivo	6695	cervical	US	18 a 20	1 a 6	sim (264)	ND	92,2%	IHQ	sim	sim
Kwon M <sup>(70)</sup>	2018	Coréia	retrospectivo	26	cervical	US	18	1 a 3	sim (57)	69,2%	ND	IHQ	sim	não
Cuenca-Jimenez T <sup>(71)</sup>	2019	Reino Unido	retrospectivo	230	cervical	US	14 a 20	1 a 11	sim (15)	93,5%	ND	IHQ + TM	sim	não
Cohen OC <sup>(38)</sup>	2019	Reino Unido	retrospectivo	554	várias	ND	ND	3 a 4	não	ND	92,1%	ND	sim	não
Wilczynski A <sup>(72)</sup>	2020	Alemanha	retrospectivo	793	várias	US	18	ND	não	95,0%	ND	ND	sim	sim
Assaf N <sup>(73)</sup>	2020	Libano	retrospectivo	210	várias	ND	18	2 a 3	sim (163)	79,0%	ND	IHQ	sim	não
Chatani S <sup>(39)</sup>	2020	Japão	retrospectivo	263	várias	US e TC	14 e 18	1 a 8	sim (108)	90,5%	88,2%	IHQ + CMF	ND	não
Gonçalves MC	2022	Brasil	retrospectivo	218	várias	US e TC	14 a 20	2 to 12	sim (258)	95,9%	91,3%	IHQ + CMF + TM	sim	não

Legenda: BA (biópsia por agulha grossa), BX (biópsia), BC (biópsia cirúrgica), DX (diagnóstico), HMP (hematopatologista), US (ultrassom), TC (tomografia computadorizada), IHQ (imuno-histoquímica), CMF (citometria de fluxo), TM (testes moleculares), ND (não disponível)

Mesmo com as possíveis desvantagens citadas anteriormente, a praticidade das técnicas percutâneas menos invasivas fez com que as últimas décadas observassem aumento no uso principalmente da BA para coleta de tecido em pacientes com suspeita de linfoma<sup>(46, 49-51, 59, 65)</sup>. Este tipo de material chegou a corresponder a 90% das amostras obtidas em alguns centros<sup>(12)</sup>.

Apesar dos dados publicados dando suporte, a *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) recomenda que biópsias por agulha grossa sejam consideradas prática aceitável apenas em casos de recorrência; tumores situados em sítios profundos, não facilmente acessíveis às biópsias excisionais (tumores abdominais, retroperitoneais e mediastinais); ou em pacientes com risco cirúrgico considerável<sup>(74)</sup>. As recomendações são explícitas em relação à preferência por biópsias cirúrgicas ao diagnóstico inicial: “Uma punção por agulha fina ou biópsia por agulha grossa não são geralmente adequadas para o diagnóstico inicial de linfomas”<sup>52</sup>. A sociedade Européia de Oncologia Médica (ESMO) traz as mesmas diretrizes<sup>(75, 76)</sup>. No entanto, estas recomendações em geral não são baseadas em resultados de estudos científicos, mas em consenso de especialistas, indicando a necessidade de maior conhecimento do atual cenário para seu adequado embasamento.

A maioria dos estudos apresentados até então teve como foco avaliar a acurácia da BA no diagnóstico das neoplasias hematolinfoides. No geral, os resultados foram favoráveis a esta prática (tabela 1) e concluiu-se que o fator que mais influencia no sucesso do diagnóstico é a quantidade de material obtida: entre amostras limitadas, quanto maior a quantidade de material disponível, maior é a capacidade diagnóstica<sup>(47, 53, 59, 77)</sup>. No entanto, pouca informação se tem a respeito de maneiras de se melhorar a qualidade das amostras,

principalmente no que tange ao papel do patologista no momento do procedimento para avaliar a adequabilidade do material obtido para diagnóstico. Devido à crescente demanda por tecido suficiente para fazer quantidade cada vez maior de exames, é desejável padronizar a quantidade mínima de material a ser obtido preferencialmente durante o procedimento, bem como propor fluxo para otimizar a utilização da amostra, promovendo o menor desgaste possível do tecido e permitindo armazenar o espécime para análises futuras<sup>(62)</sup>.

Nem todos os trabalhos avaliaram comparativamente a capacidade diagnóstica de BA e BC analisadas em um mesmo serviço. Além disso, o papel de testes adicionais como a IFT CMF realizada em fragmento de tecido obtido durante a BA ou mesmo durante a BC também foi aspecto pouco explorado, com apenas alguns estudos mencionando a sua utilização, geralmente em amostra bastante limitada de pacientes<sup>(39, 40, 65)</sup>.

### **1.6 Rotina de manejo do material do paciente em investigação de doença linfoproliferativa no Hospital Sírio-Libanês**

No Hospital Sírio-libanês em São Paulo, Brasil, conta-se com um patologista de plantão 24 horas por dia, à disposição para fazer avaliação intraoperatória de congelação durante procedimento cirúrgico ou avaliação intraprocedimento da adequabilidade do material durante biópsia guiada por imagem.

As equipes assistenciais e cirúrgicas podem, no momento de realização de BC de linfonodos ou outros órgãos para investigação de provável doença linfoproliferativa, solicitar ao médico patologista a realização de exame de congelação. Nesta oportunidade, o patologista faz a avaliação inicial do

espécime, verificando a representatividade da amostra obtida. Havendo suspeita morfológica ou clínica de linfoma, fragmento de tecido é coletado durante o procedimento de congelação e colocado em meio específico (RPMI) para realização de exame de IFT CMF, o qual é encaminhado com rapidez ao laboratório clínico.

Na maior parte dos procedimentos de BA realizados pela equipe da radiologia intervencionista é solicitada a presença do patologista, o qual avalia a representatividade da amostra por meio de esfregaço citológico do fragmento. Novamente, havendo suspeita morfológica ou clínica de linfoma, um dos fragmentos retirados é enviado em RPMI para o exame de IFT CMF, realizado no laboratório clínico.

O encaminhamento destas amostras para a realização do exame de IFT CMF depende de acordo estabelecido entre o patologista e a equipe cirúrgica ou da radiologia intervencionista, com a anuência do paciente para a realização deste exame. O restante da amostra é fixado em formalina tamponada a 10% e encaminhado para o laboratório de patologia para realização de exame histológico, imuno-histoquímico e eventuais testes adicionais, quando indicado.

Em algumas situações, o exame de IFT CMF pode não ser realizado, como quando, por exemplo, por motivos diversos não é solicitada a presença do patologista durante o procedimento, quando o paciente não tem condições ou se nega a arcar com o custo do exame ou quando neoplasia linfoproliferativa não faz parte da suspeita clínica inicial. Nesses casos, o diagnóstico será baseado na análise histopatológica, IHQ e demais exames complementares/ moleculares realizados em FFPE e indicados pelo patologista responsável pelo caso após a amostra ser processada no laboratório, quando necessário.

## 2 OBJETIVOS

Com base no que foi exposto, os objetivos do presente estudo são:

### 2.1 Objetivos principais:

- 1) Avaliar a aplicabilidade dos critérios da classificação das doenças linfoproliferativas segundo a OMS 2017 em biópsias por agulha grossa (BA).
- 2) Comparar a capacidade diagnóstica de biópsias cirúrgicas (BC) e biópsias por agulha grossa (BA) na abordagem de proliferações linfoides benignas e malignas.

### 2.2 Objetivos secundários:

- 1) Avaliar a contribuição relativa da clínica e de cada um dos exames complementares (IHQ, IFT CMF e testes moleculares) para o diagnóstico nos materiais de BC e BA.
- 2) Comparar a capacidade diagnóstica dos diferentes tipos de material (BC e BA) em diferentes categorias morfológicas e em diferentes subgrupos de entidades.
- 3) Comparar a concordância da IFT CMF com o diagnóstico final entre as diferentes categorias morfológicas e subgrupos de entidades nas amostras de BC e BA.
- 4) Avaliar a influência da qualidade da amostra (comprimento total e número de fragmentos) e do calibre da agulha utilizada na BA para a capacidade diagnóstica final.
- 5) Avaliar a influência da análise de representatividade do material por um patologista durante o procedimento.

- 6) Avaliar a influência do sítio anatômico (superficial ou profundo) no desempenho diagnóstico de BAs.
- 7) Avaliar a concordância dos subgrupos de entidades diagnosticados no material de BA com os dados clínicos.
- 8) Com base nos resultados obtidos, consolidar um protocolo geral de abordagem diagnóstica e de manejo da amostra do paciente com suspeita de doença linfoproliferativa para otimização da qualidade e quantidade de material disponível para análise.

### 3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Este estudo retrospectivo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) sob parecer consubstanciado de número 2.786.656 emitido em 26/07/2018 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Sírio-Libanês, sob parecer de número HSL 2018-55 emitido em 14/08/2018. Todos os casos foram revistos com base no material disponível que foi utilizado para o diagnóstico primário. Nenhum bloco de parafina foi submetido a novos cortes para a realização de nenhum procedimento adicional. Devido a isso, houve dispensa da necessidade de aplicação de termo de consentimento livre e esclarecido para os pacientes participantes dessa casuística, constante no parecer consubstanciado do comitê de ética em pesquisa com seres humanos (CEP) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Ver apêndice.

#### 3.1 Casuística

Foi realizada busca sistemática no banco de dados do Laboratório de Patologia do Hospital Sírio-Libanês utilizando-se como palavras-chave “linfoma”, “linfadenite”, “proliferação linfoide” e “hiperplasia linfoide” e como intervalo de tempo o período compreendido entre outubro de 2013 e agosto de 2017.

Critérios de inclusão:

- Todos os casos de biópsias submetidos a exame anátomo-patológico com suspeita de linfoma foram analisados, fossem eles provenientes de BC ou de BA, oriundos de diversos órgãos;

Critérios de exclusão:

- Amostras de pele, biópsias endoscópicas do trato gastrointestinal, biópsias de baço e biópsias de osso ou medula óssea.
- Casos em que não havia material disponível para revisão histológica.

### 3.2 Registro de dados de revisão patológica e de prontuário

Todas as amostras foram revistas por hematopatologista com experiência em diagnóstico de linfomas. Os seguintes dados foram obtidos neste momento:

- Classificação em categoria morfológica de acordo com a análise da lâmina corada em hematoxilina e eosina (H&E), conforme tabela 2:

Tabela 2 - Relação de códigos e respectivas categorias morfológicas\*.

<b>Código</b>	<b>Categoria morfológica</b>
0	Inconclusivo
1	Proliferação linfoide com predomínio de células pequenas
2	Proliferação linfoide de células pequenas e grandes
3	Proliferação linfoide com predomínio de células grandes
4	Proliferação linfoide com células de tamanho intermediário e morfologia blastoide
5	Proliferação linfoide de células pleomórficas em fundo inflamatório rico

\* Modificada de Mesa H, et al.<sup>(59)</sup>

Para a classificação das amostras de acordo com o tamanho das células foram utilizados os critérios descritos por Gong JZ et al.<sup>(78, 79)</sup> que consideram predomínio de células pequenas quando a amostra é constituída de mais de 80% de células pequenas, predomínio de células grandes quando a amostra é constituída de mais de 40% de células grandes e células pequenas e grandes quando a amostra é constituída por 20% a 40% de células grandes.

- Revisão conjunta de lâminas e laudos dos exames complementares realizados no laboratório de patologia ou por intermédio deste, quando disponíveis - imuno-histoquímica (IHQ), hibridização *in situ* fluorescente (FISH), hibridização *in situ* cromogênica para EBV (HIS EBV), pesquisa de clonalidade

B e T por PCR. Breve descrição da indicação, escolha de painéis de anticorpos, lista de anticorpos disponíveis e metodologia empregada na IHQ e HIS EBV está inserida no anexo 1. Descrição da indicação, metodologia utilizada e sondas disponíveis para a realização do exame de FISH está inserida no anexo 2. No anexo 3 consta breve descrição da indicação, metodologia empregada e sistemas utilizados para a pesquisa de clonalidade B e T por PCR.

- Diagnóstico final;
- Classificação em subgrupos de entidades conforme tabela 3:

Tabela 3 - Relação de códigos e respectivos subgrupos de entidades\*.

<b>Código</b>	<b>Subgrupo de entidades</b>
0	Inconclusivo
1	Benigno
2	Linfoma de Hodgkin clássico
3	Linfoma de Hodgkin, predominância linfocítica nodular
4	Linfoma não Hodgkin de pequenas células B
5	Linfoma não Hodgkin de grandes células B
6	Linfoma não Hodgkin de células intermediárias/ morfologia blastoide**
7	Linfoma não Hodgkin de células T
8	Linfoma folicular

\* Modificada de Burke C et al.<sup>(54)</sup>

\*\* Subgrupo formado para englobar neoplasias enquadradas dentro da categoria morfológica de células intermediárias ou com morfologia blastoide que não estivessem enquadradas em nenhum outro subgrupo de entidades específico descrito nesta tabela.

- Presença ou não de avaliação da adequabilidade do espécime por patologista durante o procedimento.

Em paralelo à revisão da morfologia, foi realizada busca em prontuário eletrônico para obtenção de dados clínico-laboratoriais pertinentes como:

- Sexo e idade;
- Apresentação clínica inicial;
- Presença ou não diagnóstico prévio de linfoma;
- Estadiamento clínico (quando aplicável);

- Sítios anatômicos envolvidos: 1 (predomínio nodal); 2 (predomínio extranodal); 3 (nodal e extranodal);
- Distribuição da doença 1 (localizada superficial), 2 (localizada profunda), 3 (mais de uma região acometida) e 4 (disseminada);
- Tamanho e o SUV da lesão submetida a biópsia (quando disponível);
- Resultados de exame de IFT CMF, quando disponível, conforme tabela 4:

Tabela 4 - Relação de códigos e respectivos resultados de exames de IFT CMF.

<b>Código</b>	<b>Resultado de exame de IFT CMF</b>
0	Inconclusivo
1	Negativo para população anômala
2	Suspeito para população anômala
3	Presença de população anômala
4	Presença de mais de uma população anômala

IFT CMF = imunofenotipagem por citometria de fluxo

- Concordância do resultado da IFT CMF com o diagnóstico final.

A IFT CMF foi realizada em laboratório clínico parceiro e a breve descrição dos sistemas utilizados, metodologias e painéis empregados está descrita no anexo 4.

Nos casos em que foi realizada BA, informações adicionais foram obtidas:

- Número de fragmentos e comprimento total dos fragmentos;
- Tipo de exame de imagem realizado para guiar o procedimento (US ou TC) e o calibre da agulha utilizada (em *gauge*).
- Presença ou não de indicação formal de BA:

Foram considerados como critérios de indicação formal: 1) a necessidade de biópsia de linfonodomegalias/ lesões profundas, 2) pacientes com diagnóstico prévio de linfoma e 3) pacientes sem condição clínica de realização de BC, conforme preconizado pela NCCN<sup>(74)</sup>.

Outros critérios de indicação de BA que não os formais foram: preferência e conforto do paciente, preferência do clínico e necessidade de maior agilidade ao procedimento.

### 3.3 Análise dos resultados

#### 3.3.1 De acordo com os objetivos principais:

1) Avaliação da aplicabilidade dos critérios da classificação das doenças linfoproliferativas segundo a OMS 2017 em biópsias por agulha grossa (BA).

A aplicabilidade dos critérios da OMS em amostras de BA foi inferida levando-se em consideração a possibilidade de subclassificação completa em entidades específicas de acordo com a OMS neste tipo de biópsia. Foi necessário que representantes de todos os subgrupos de entidades conforme descritos na tabela 3 conseguissem ser adequadamente diagnosticados.

2) Comparação da capacidade diagnóstica nos grupos de BA e BC:

Após revisão dos casos, cada biópsia foi classificada de acordo com o seu desempenho diagnóstico (DD), conforme mostra a tabela 5.

Tabela 5 - Relação de classificação, códigos e respectivos desempenhos diagnósticos.

<b>Classificação</b>	<b>Código</b>	<b>Desempenho diagnóstico</b>
Não satisfatórias	0	Inconclusivo
	1	Possível diferenciar entre benigno e maligno
	2	Possível estabelecer linhagem
Satisfatórias	3	Permite início de tratamento
	4	Subclassificação completa

Para a análise estatística, foram agrupadas as categorias 0,1,2 e 3 (não permitiram subclassificação completa) e comparadas com a categoria 4 (permitiram classificação completa).

Os casos foram divididos em grupos de acordo com o tipo de biópsia realizada: cirúrgica (BC) ou por agulha grossa (BA) e desempenho diagnóstico (DD) igual a 4 (permite diagnóstico e subclassificação completa) ou diferente de 4 (não permite subclassificação completa). À partir desta divisão, resultaram quatro grupos que estão representados na figura 2.

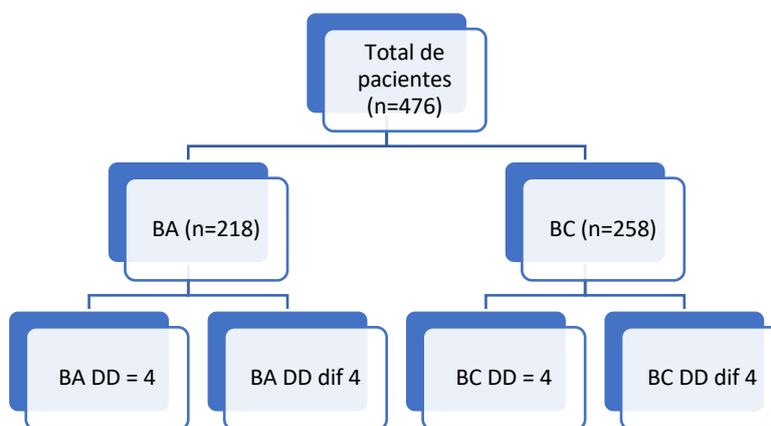


Figura 2 - Divisão dos pacientes do estudo de acordo com o tipo de biópsia realizada e o desempenho diagnóstico (permite subclassificação completa x não permite subclassificação completa). BA = biópsia por agulha grossa, BC = biópsia cirúrgica, DD = desempenho diagnóstico.

A capacidade diagnóstica de BAs e BCs foi medida levando-se em consideração o percentual de diagnósticos definitivos (DD=4) obtidos em cada grupo.

Foram agrupadas também as categorias 0,1,2 (não satisfatórias) e comparadas com as categorias 3 e 4 (satisfatórias). Os casos foram divididos em grupos de acordo com o tipo de biópsia realizada: cirúrgica (BC) ou por agulha grossa (BA) e desempenho diagnóstico (DD) igual a 3 e 4 (satisfatórias)

ou 0, 1 e 2 (não satisfatórias). A partir desta divisão, resultaram quatro grupos que estão representados na figura 3.

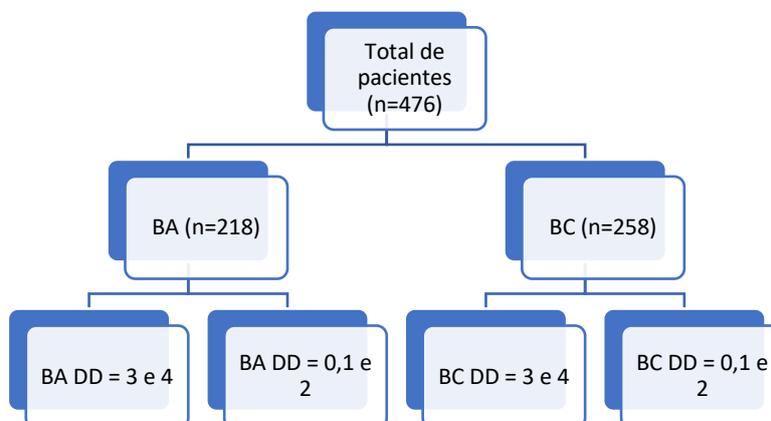


Figura 3 - Divisão dos pacientes do estudo de acordo com o tipo de biópsia realizada e o desempenho diagnóstico (satisfatório x não satisfatório). BA = biópsia por agulha grossa, BC = biópsia cirúrgica, DD = desempenho diagnóstico.

Foi comparado o percentual de biópsias satisfatórias (DD= 3 e 4) e não satisfatórias (DD=0, 1 e 2) entre os grupos de BA e BC.

### 3.3.2 De acordo com os objetivos secundários:

1) Análise da contribuição relativa da clínica/ radiologia e dos demais exames complementares nos diferentes tipos de material (BA e BC)

Atribuiu-se valor de 0 a 3 para contribuição relativa da clínica, da morfologia, da IHQ, da IFT CMF e dos demais exames complementares no diagnóstico final, conforme tabela 6:

Tabela 6 - Relação de códigos e respectiva contribuição relativa da clínica e demais exames para o diagnóstico final.

Código	Contribuição relativa da clínica e demais exames para diagnóstico final
0	Indiferente para o diagnóstico
1	Prejudicou o diagnóstico
2	Auxiliou o diagnóstico
3	Imprescindível para o diagnóstico

Para a análise estatística, foram agrupadas as categorias 0,1 e 2 e comparadas com a categoria 3. Dessa forma, comparou-se a porcentagem de casos em que as informações da clínica/ radiologia e dos demais exames complementares foram consideradas imprescindíveis para o diagnóstico final entre amostras de BA e BC. O motivo que justificou a inclusão dessas informações como imprescindíveis foi descrito para cada caso.

2) Comparação da capacidade diagnóstica dos diferentes tipos de material (BA e BC) em diferentes categorias morfológicas e em diferentes subgrupos de entidades

Para a análise estatística, foram agrupadas as categorias de DD 0,1,2 e 3 (não permitiram subclassificação completa) e comparadas com a categoria 4 (permitiram classificação completa) entre cada uma das categorias morfológicas (tabela 2) e subgrupos de entidades (tabela 3) nos grupos de BA e BC. A mesma comparação foi feita, ainda, entre o grupo que engloba DD 3 e 4 (permite início de tratamento/ permite subclassificação completa) – casos em que a biópsia foi considerada satisfatória, com o grupo que engloba DD 0,1 e 2 (inconclusivo/ diferencia benigno e maligno/ classifica em linhagem) – casos em que a biópsia foi considerada não satisfatória.

3) Comparação da concordância da imunofenotipagem por citometria de fluxo com o diagnóstico final entre as diferentes categorias morfológicas e subgrupos de entidades

O percentual de casos com resultado de IFT CMF discordante do diagnóstico final foi comparado entre as diferentes categorias morfológicas e subgrupos de entidades no geral e entre os materiais de BA e BC. Os casos foram considerados discordantes quando o resultado da IFT CMF foi negativo

para população anômala com diagnóstico final de neoplasia linfoproliferativa na biópsia ou quando o resultado da IFT CMF foi positivo para população anômala, com diagnóstico final de proliferação linfoide benigna na biópsia.

4) Influência da qualidade da amostra (comprimento total e número de fragmentos) e do calibre da agulha utilizada na BA no desempenho diagnóstico

Para a análise estatística, foram agrupadas as categorias de DD 0,1,2 e 3 (não permitiram subclassificação completa) e separadas da categoria 4 (permitiram subclassificação completa). Foi comparada a distribuição do comprimento total dos fragmentos, do número de fragmentos e do calibre da agulha em relação aos grupos de DD = 4 e DD diferente de 4.

5) Influência da avaliação de representatividade do material por um patologista durante o procedimento no desempenho diagnóstico de BAs e BCs

Para a análise estatística, foram agrupadas as categorias de DD 0,1,2 e 3 (não permitiram subclassificação completa) e separadas da categoria 4 (permitiram classificação completa). Foi comparada a proporção de casos que tiveram DD diferente de 4 entre aqueles submetidos e não submetidos a avaliação intraprocedimento de adequabilidade, tanto no geral, quanto entre as amostras de BA e BC separadamente.

6) Influência do sítio anatômico (superficial ou profundo) no desempenho diagnóstico de BAs

Para a análise estatística, foram agrupadas as categorias de DD 0,1,2 e 3 (não permitiram subclassificação completa) e separadas da categoria 4 (permitiram classificação completa). Foi comparada a porcentagem de casos de

BA com DD = 4 e DD diferente de 4 entre amostras provenientes de sítios anatômicos superficiais e profundos.

7) Avaliação da concordância dos subgrupos de entidades no material BA com os dados clínicos

Dados clínicos como apresentação clínica inicial, captação alta ou baixa no PET-CT, doença nodal *versus* extranodal, doença localizada *versus* disseminada, faixa etária, presença de sintomas B, estadiamento clínico (quando aplicável), antecedentes patológicos e mesmo antecedente de linfoma foram avaliados em cada caso a fim de se estabelecer a concordância clínica com o diagnóstico final em amostras de BA. Foi calculada a proporção de casos discordantes para cada subgrupo de entidades. Casos considerados discordantes de acordo com o subgrupo de entidades foram revistos e as particularidades clínicas e/ou morfológicas (quando presentes) foram reportadas.

8) Consolidação de protocolo geral de abordagem diagnóstica e de manejo da amostra do paciente com suspeita de doença linfoproliferativa

Após análise de todos os dados obtidos no estudo, em conjunto com dados de literatura relevante levantada, foi elaborada sugestão de protocolo geral de abordagem diagnóstica e de manejo da amostra do paciente com suspeita de doença linfoproliferativa.

### **3.4 Análise estatística**

A análise estatística utilizou comparação de proporções, o teste qui-quadrado de Pearson e o teste exato de Fisher para a comparação de dados categóricos, expressos em números e porcentagens. O teste exato de Fisher foi utilizado em análises nas quais mais de 20% das caselas apresentavam valores

inferiores a 5. A comparação de distribuição de variáveis contínuas, expressas em média ou intervalos foi feita utilizando-se o teste U de Mann-Whitney e o teste de Kruskal-Wallis de amostras independentes. Foram consideradas estatisticamente significativas comparações com P valor menor do que 0,050.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Resultados descritivos

#### 4.1.1 Descrição dos aspectos clínicos gerais

Ao todo, 515 amostras foram levantadas. Após a aplicação dos critérios de exclusão, 39 foram eliminadas do estudo, o que resultou em um total de 476 amostras, sendo 258 BCs e 218 BAs. Entre as amostras eliminadas, 15 eram provenientes de biópsia endoscópica do trato gastrointestinal, 8 eram biópsias de medula óssea, 5 eram biópsias de pele, 3 eram biópsias de osso, 2 eram biópsias de baço e, em 6 casos, o material havia sido retirado e não estava disponível no arquivo do laboratório para ser revisado para o estudo. Foi analisada apenas uma amostra por paciente, sendo que a primeira biópsia realizada com intuito diagnóstico foi a incluída no estudo. As características gerais dos pacientes, divididos nos grupos de BA e BC, estão apresentadas na tabela 7.

Tabela 7 - Características clínicas gerais dos pacientes dos grupos de BA e BC.

<b>Características</b>	<b>Grupo BA</b>	<b>Grupo BC</b>	<b>Total</b>	<b>P</b>
<b>Total de pacientes</b>	<b>218</b>	<b>258</b>	<b>476</b>	
<b>Sexo</b>				0,461
Masculino	121	134	255	
Feminino	97	124	221	
<b>Idade média [intervalo]</b>	<b>53,9 [2-91]</b>	<b>49,1 [2-95]</b>	-	<b>0,011</b>
<b>Topografia</b>				<b>0,009</b>
Linfonodo	187	241	428	
Outras	31	17	48	
<b>Sítio anatômico</b>				<b>0,000</b>
Superficial	77	206	283	
Profundo	141	52	193	

BA = biópsia por agulha grossa; BC = biópsia cirúrgica

Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram encontradas em relação à idade (os pacientes do grupo de BA são mais velhos

que os pacientes do grupo de BC), topografia (maior proporção de sítios extranodais no grupo BA quando comparado ao grupo BC) e sítio anatômico (maior proporção de biópsias superficiais no grupo BC, enquanto no grupo BA predominaram as biópsias profundas).

Nos pacientes submetidos a BA, características relacionadas à indicação do procedimento e à amostra coletada estão resumidas na tabela 8.

Tabela 8 - Características relacionadas ao procedimento e à amostra coletada nos pacientes submetidos a BA.

<b>Características (casos BA)</b>	<b>Sítio anatômico superficial</b>	<b>Sítio anatômico profundo</b>	<b>Total</b>	<b>P</b>
<b>Indicação formal de BA</b>				<b>0,000</b>
Sim	19	141	160	
Não	58	0	58	
<b>Calibre da agulha</b>				<b>0,000</b>
14	5	2	7	
16	33	25	58	
18	38	111	149	
20	1	3	4	
<b>Número frag. (média/ mediana)</b>	4,7/ 4,0	4,8/ 4,0	-	0,571
<b>Comprimento frag. (média/ mediana)</b>	4,9 cm/ 4,2 cm	5,1 cm/ 4,5 cm	-	0,215
<b>Exame de imagem para guiar</b>				<b>0,000</b>
US	68	20	88	
TC	7	116	123	

BA = biópsia por agulha grossa, frag. = fragmentos, US = ultrassom, TC = tomografia computadorizada

Como esperado, o calibre da agulha utilizado diferiu significativamente entre os grupos de sítios anatômicos superficiais e profundos, com agulhas mais calibradas sendo utilizadas para biópsias de sítios superficiais. O US foi usado com maior frequência para guiar biópsias superficiais, enquanto a TC foi usada com maior frequência para guiar biópsias profundas. O número médio de fragmentos e o comprimento total dos fragmentos não diferiram significativamente entre os grupos.

#### 4.1.2 Descrição dos aspectos anatomopatológicos

Ao todo foram incluídos no estudo 353 (74,2%) casos internos e 123

(25,8%) revisões de casos externos.

A figura 4 mostra a distribuição casos internos ao longo dos anos (total e por tipo de biópsia), bem como o número de casos com desempenho diagnóstico diferente de 4.

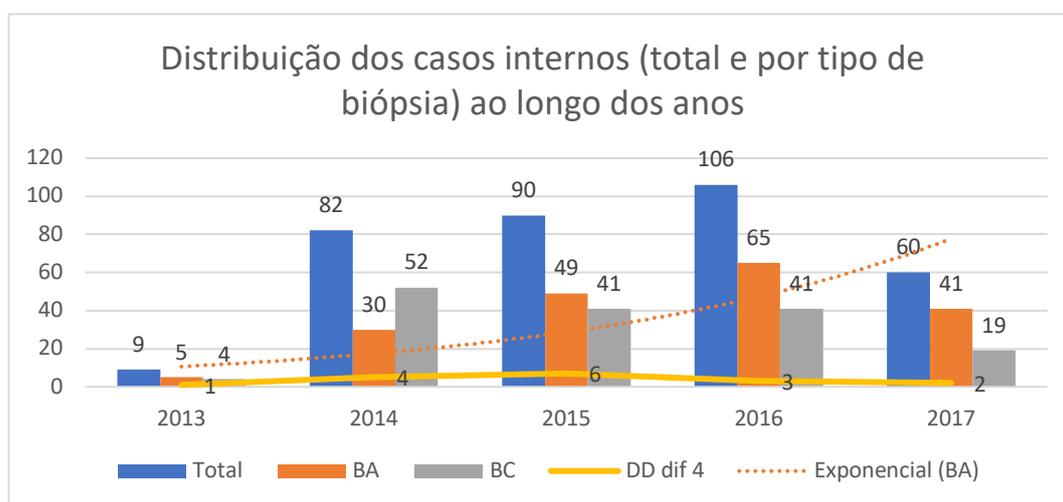


Figura 4 - Distribuição do total e por tipo de biópsia dos casos internos ao longo dos anos, bem como o número de casos com desempenho diagnóstico diferente de 4. BA = biópsia por agulha grossa, BC = biópsia cirúrgica, DD dif 4 = desempenho diagnóstico diferente de 4.

Conforme observado, houve tendência ao aumento proporcional no número de casos de BA ao longo dos anos, enquanto o número de casos com desempenho diagnóstico diferente de 4, após uma tendência de aumento inicial, diminuiu e manteve-se estável na sequência.

Em 450 (94,5%) pacientes foi possível obter diagnóstico definitivo com subclassificação completa das entidades (desempenho diagnóstico = 4). Em 14 (2,9%) pacientes, o resultado da biópsia permitiu o início do tratamento, embora não tenha sido suficiente para subclassificação completa (desempenho diagnóstico = 3). Considerando-se estes aspectos, em 97,4% dos casos a primeira biópsia realizada foi suficiente para permitir que os pacientes recebessem tratamento. A tabela 9 mostra resumo da distribuição das amostras de BA e BC entre os casos internos e de revisão e faz comparação do

desempenho diagnóstico geral em materiais internos e de revisão.

Tabela 9 - Comparação da distribuição dos casos de BA e BC entre amostras originais e de revisão e comparação do desempenho diagnóstico entre amostras originais e de revisão.

<b>Características</b>	<b>Material interno</b>	<b>Material de revisão</b>	<b>Total</b>	<b>P</b>
<b>Tipo de amostra</b>				<b>0,000</b>
BA	193	25	218	
BC	160	98	258	
<b>Desempenho diagnóstico</b>				<b>0,896</b>
4 -Diagnóstico definitivo	334 (94,6%)	116 (94,3%)	450 (94,5%)	
3- Permite tratamento	10	4	14	
2- Define linhagem	1	0	1	
1- Benigno x maligno	4	0	6	
0- Inconclusivo	4	3	7	
<b>Total</b>	<b>353</b>	<b>123</b>	<b>476</b>	

BA = biópsia por agulha grossa, BC = biópsia cirúrgica.

Proporção significativamente maior das amostras de revisão de casos externos (79,7%) era constituída por BCs quando comparado às amostras internas (45,3%). Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados casos em que foi possível chegar a um diagnóstico completo com subclassificação (DD=4) e casos em que não foi possível subclassificação (DD=0,1,2 e 3) entre amostras internas e de revisão.

Em 19 pacientes foi realizada mais de uma biópsia. Em 9 pacientes o tipo de biópsia na repetição foi a BC e em 10 pacientes foi a BA. Em todos os casos que tiveram a biópsia repetida foi obtido diagnóstico completo com subclassificação em entidades. A figura 5 mostra a distribuição dos pacientes com mais de uma biópsia em relação ao motivo que justificou sua indicação.

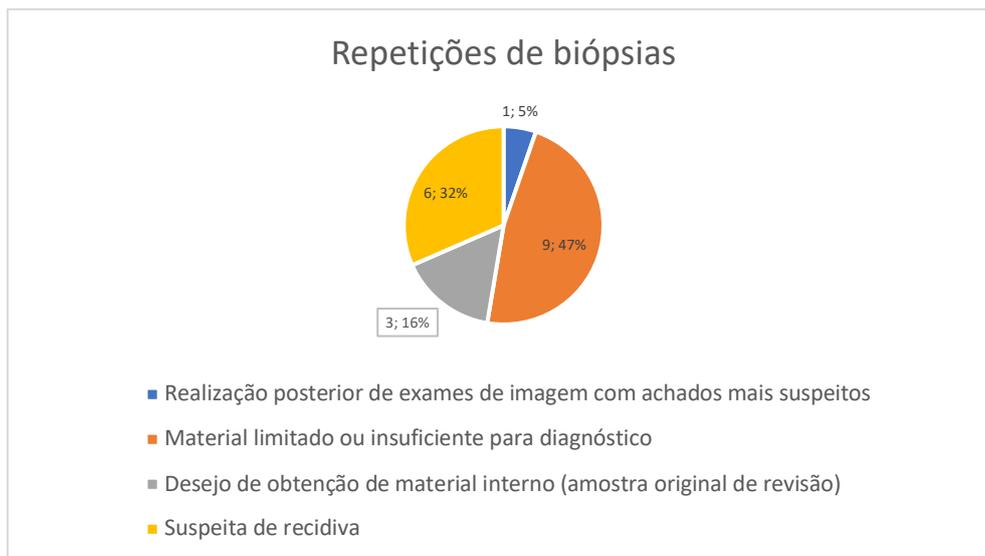


Figura 5 - Distribuição dos pacientes com mais de uma biópsia em relação ao motivo que justificou sua indicação.

Informações relativas aos exames complementares realizados de acordo com o tipo de biópsia estão descritas na tabela 10.

Tabela 10 - Exames complementares realizados nas amostras obtidas por BA e BC.

Exame complementar	BA	BC	Total	P
<b>Imuno-histoquímica</b>	210 (96,3% das BAs)	236 (91,47% das BCs)	446	0,024
<b>IFT CMF</b>	149 (77,2% das BAs)*	88 (55% das BCs)*	237	0,000
Conclusivo	141	88	229	0,027
Inconclusivo	8	0	8	
<b>Hibridização <i>in situ</i> EBV</b>	102 (46,8% das BAs)	119 (46,1% das BCs)	221	0,880
<b>Clonalidade de linfócitos B</b>	0	1	1	1,000
<b>Clonalidade de linfócitos T</b>	0	3	3	
<b>FISH</b>	20 (9,2% das BAs)	25 (9,7% das BCs)	45	0,850
t(14;18)	1	2	3	
t(11;14)	0	4	4	
Painel linfoma alto grau**	19	19	38	

BA = biópsia por agulha grossa, BC = biópsia cirúrgica, IFT CMF = imunofenotipagem por citometria de fluxo, EBV = vírus *Epstein-Barr*, FISH = hibridização *in situ* fluorescente.

\* Cálculo de porcentagem nesta categoria realizado em relação a biópsias internas, já que este exame não pode ser feito em amostras de revisão.

\*\* Composto pela pesquisa do rearranjo nos genes *cMYC*, *BCL6* e *BCL2*.

Entre os exames complementares realizados, tanto a IHQ quanto a IFT CMF foram significativamente mais realizadas no grupo das BAs. A taxa de resultados inconclusivos de IFT CMF também foi significativamente maior no grupo das BAs.

Os diagnósticos finais obtidos após a revisão da patologia por ordem de

frequência estão citados na tabela 11. A tabela 12 é uma versão simplificada que agrupa alguns diagnósticos em categorias para facilitar a visualização da frequência de forma mais abrangente.

Tabela 11 - Sumário da distribuição dos diagnósticos finais por frequência na casuística estudada.

<b>Diagnóstico</b>	<b>N. de casos</b>
Linfoma de Hodgkin clássico	101
Benigno	60
Linfoma folicular grau 1/2	41
Linfoma difuso de grandes células B, centro germinativo	39
Linfoma difuso de grandes células B, não centro germinativo	38
Linfoma folicular grau 3	37
Linfoma difuso de grandes células B, primário do mediastino	17
Linfoma linfocítico	17
Linfoma de células do manto	14
Linfoma de Burkitt	13
Linfoma folicular + linfoma difuso de grandes células B	11
Doença linfoproliferativa pós-transplante	9
Linfoma de Hodgkin, predominância linfocítica nodular	8
Linfoma B de alto grau SOE	7
Linfoma de células T angioimunoblástico	7
Linfoma de grandes células B, rico em células T e histiócitos	7
Linfoma da zona marginal	6
Linfoma de células T periféricas SOE	6
Linfoma linfoblástico de imunofenótipo T	6
Linfoma B de alto grau, com rearranjo do MYC e do BCL2	5
Linfoma de grandes células anaplásicas ALK negativo	5
Linfoma difuso de grandes células B EBV positivo	4
Inconclusivo	4
Linfoma linfoblástico de imunofenótipo B	3
Linfoma de células B inclassificável, com características intermediárias entre LDGCB e Hodgkin	2
Linfoma de grandes células anaplásicas ALK positivo	2
Linfoma linfoplasmocítico	2
Linfoma B de alto grau, com rearranjo do MYC, do BCL2 e do BCL6	1
Linfoma da zona marginal + LDGCB	1
Linfoma difuso de grandes células B (associado à translocação do IRF4?)	1
Linfoma/ leucemia de células T do adulto	1
Neoplasia de células T maduras (leucemia de células granulares grandes?)	1
<b>Total</b>	<b>476</b>

Tabela 12 – Sumário simplificado da distribuição dos diagnósticos finais agrupados em categorias por frequência na casuística estudada.

<b>Diagnóstico</b>	<b>N. de casos</b>
Linfoma de Hodgkin clássico	101
Linfoma difuso de grandes células B	101
Linfoma folicular	78
Benigno	60
Linfoma difuso de grandes células B, primário do mediastino	17
Linfoma linfocítico	17
Linfoma B de alto grau	15
Linfoma de células do manto	14
Linfoma de Burkitt	13
Doença linfoproliferativa pós-transplante	9
Linfoma de Hodgkin, predominância linfocítica nodular	8
Linfoma de células T angioimunoblástico	7
Linfoma da zona marginal	6
Linfoma de células T periféricas SOE	6
Linfoma linfoblástico de imunofenótipo T	6
Linfoma de grandes células anaplásicas ALK negativo	5
Inconclusivo	4
Linfoma linfoblástico de imunofenótipo B	3
Linfoma de grandes células anaplásicas ALK positivo	2
Linfoma linfoplasmocítico	2
Linfoma/ leucemia de células T do adulto	1
Neoplasia de células T maduras (leucemia de células granulares grandes?)	1
<b>Total</b>	<b>476</b>

## 4.2 Resultados analíticos

### 4.2.1 De acordo com os objetivos principais

1) Avaliação da aplicabilidade dos critérios da classificação das doenças linfoproliferativas segundo a OMS 2017 em biópsias por agulha grossa (BA).

Foi demonstrada aplicabilidade dos critérios da OMS em amostras de BA levando-se em consideração a possibilidade de subclassificação completa em entidades específicas de acordo com a OMS neste tipo de biópsia.

Representantes de todos os subgrupos de entidades conseguiram ser adequadamente diagnosticados com subclassificação completa neste estudo. A tabela 13 mostra a distribuição do número de casos diagnosticados entre os subgrupos de entidades em amostras de BA:

Tabela 13 - Distribuição do número de casos diagnosticados em BA em cada subgrupo de entidades.

<b>Subgrupos de entidades</b>	<b>BA</b>
1- Benigno	15
2- Linfoma de Hodgkin clássico	47
3- Linfoma de Hodgkin, PLN	1
4- Linfoma de células B pequenas	21
5- Linfoma de células B grandes	62
6- Linfoma de células B intermediárias/ blastoides	22
7- Linfoma de células T	10
8- Linfoma folicular	39

BA = biópsia por agulha grossa, Linfoma de Hodgkin, PLN = Linfoma de Hodgkin, predominância linfocítica nodular.

2) Comparação do desempenho diagnóstico nas biópsias cirúrgicas e biópsias por agulha grossa

A distribuição dos casos de BA e BC de acordo com o desempenho diagnóstico está especificada na tabela 14.

Tabela 14 - Distribuição dos casos de BA e BC de acordo com o desempenho diagnóstico.

<b>Desempenho diagnóstico (DD)</b>	<b>BA</b>	<b>BC</b>	<b>Total</b>	<b>P</b>
<b>Não satisfatórias</b>	<b>9 (4,1%)</b>	<b>3 (1,2%)</b>	<b>12 (2,5%)</b>	
0 - Inconclusivo	4	3	7	
1 - Benigno x maligno	4	0	4	
2 - Classifica em linhagem	1	0	1	
<b>Satisfatórias</b>	<b>209 (95,9%)</b>	<b>255 (98,8%)</b>	<b>464 (97,4%)</b>	<b>0,049</b>
3 - Permite início de tratamento	10 (4,6%)	4 (1,6%)	14 (2,9%)	
4 - Subclassificação completa	199 (91,3%)	251 (97,3%)	450 (94,5%)	0,010

BA = biópsia por agulha grossa, BC = biópsia cirúrgica

Foi possível estabelecer diagnóstico com subclassificação completa (DD=4) em 251 de 258 (97,3%) casos de BC e em 199 de 218 (91,3%) casos de BA (P=0,010).

Se consideradas as biópsias em que não foi possível subclassificação completa, porém os dados obtidos permitiram início de tratamento (DD=3), 255 de 258 casos de BC (98,8%) podem ser considerados satisfatórios em comparação com 209 de 218 casos de BA (95,9%) P=0,049.

Quando analisadas separadamente amostras internas e de revisão de casos externos em relação a capacidade de subclassificação completa (DD=4), observa-se que amostras originais obtiveram maiores índices de subclassificação completa quando comparadas a amostras de revisão, tanto em BAs quanto em BCs, no entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa, conforme descrito na tabela 15.

Tabela 15 - Comparação dos casos em que foi possível estabelecer subclassificação completa (DD=4) e aqueles em que não foi (DD≠4) entre materiais originais e de revisão em BAs e BCs.

<b>Tipo de amostra</b>	<b>DD=4</b>	<b>DD≠4</b>	<b>Total</b>	<b>P</b>
<b>BA (N=218)</b>				0,536
Original	177 (91,7%)	16 (8,3%)	193	
Revisão	22 (88%)	3 (12%)	25	
<b>BC (N=258)</b>				0,289
Original	157 (98,1%)	3 (1,9%)	160	
Revisão	94 (95,9%)	4 (4,1%)	98	

BA = biópsia por agulha grossa, BC = biópsia cirúrgica, DD = desempenho diagnóstico.

*Descrição dos casos de BA com desempenho diagnóstico diferente de 4 (não permitiram subclassificação completa)*

*Satisfatórias (desempenho diagnóstico = 3)*

Em 10 pacientes do grupo BA não foi possível chegar a um diagnóstico completo com subclassificação das entidades, entretanto, o diagnóstico foi suficiente para o início do tratamento. Em apenas 1 destes pacientes a biópsia foi repetida, sendo um caso de linfoma folicular com transformação para linfoma difuso de grandes células B, no qual não foi possível graduar o componente do

linfoma folicular. Embora não fosse necessário para o tratamento, a equipe clínica preferiu confirmação do diagnóstico em material de BC. As características clínicas e diagnósticos dos pacientes que obtiveram DD=3 em amostras de BA estão detalhados na tabela 16.

Tabela 16 - Características clínicas e diagnóstico dos 10 pacientes do grupo de BA que obtiveram desempenho diagnóstico = 3.

<b>Diagnóstico</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Topografia</b>	<b>Repetiu BX</b>	<b>Tipo de BX rep.</b>	<b>Antecedente</b>
LDGCB	69	M	Partes moles / pleura	Não		LDGCB não CG
LDGCB	63	F	LN retroperitoneal	Não		
LDGCB (primário mediastino?)	23	F	Mediastino	Não		
LDGCB (primário mediastino?)	42	M	Mediastino	Não		
Linfoma folicular + LDGCB	70	F	LN mesentérico	Sim	BC	
Linfoma céls B dif plasmocítica	69	F	Pulmão	Não		
Linfoma céls B pequenas	68	F	LN retroperitoneal	Não		
Linfoma céls T maduras (LCGG?)	70	M	Fígado	Não		LCGG
Linfoma folicular	66	M	LN retroperitoneal	Não		
Neoplasia CD30+ (LGCA ALK-?)	46	M	LN cervical	Não		LGCA ALK-

Legenda: BX (biópsia), LDGCB (Linfoma difuso de grandes células B), LCGG (Leucemia de células granulares grandes), LGCA (Linfoma de grandes células anaplásicas), LN (linfonodo), CG (centro germinativo), rep.(repetição).

*Não-satisfatórias (desempenho diagnóstico = 0, 1 e 2)*

Em 9 pacientes no grupo BA, a biópsia foi considerada não-satisfatória. Foi realizada repetição da biópsia em 8 dos 9 pacientes. O caso considerado não-satisfatório que não teve repetição da biópsia nesta instituição obteve o diagnóstico de proliferação linfoide atípica, suspeita para linfoma de Hodgkin clássico. Em todos os casos em que a biópsia foi repetida, foi possível chegar a um diagnóstico final. As características clínicas e os respectivos diagnósticos finais de cada um desses pacientes estão descritos na tabela 17.

Tabela 17 - Características clínicas e diagnóstico dos 9 pacientes do grupo de BA que obtiveram amostras consideradas não-satisfatórias (desempenho diagnóstico = 0, 1 e 2).

Diagnóstico final	Idade	Sexo	Topografia	Repetiu BX	Tipo de rep. de bx	Antecedente
Suspeito Hodgkin clássico	79	F	LN inguinal	não		
Hodgkin clássico	43	F	LN retroperitoneal	sim	BA	Hodgkin clássico
Hodgkin clássico	25	M	LN cervical	sim	BC	
Hodgkin clássico	27	F	Mediastino	sim	BC	
Hodgkin clássico	33	M	Mediastino	sim	BA	
Hodgkin clássico	45	F	LN cervical	sim	BC	
LDGCB CG	61	M	LN cervical	sim	BC	LDGCB
Linfoma céls T perif SOE	58	M	LN inguinal	sim	BA	
LDGCB	32	F	LN retroperitoneal	sim	BC	

BX = biópsia, rep. = repetição, LDGCB CG = linfoma difuso de grandes células B, subgrupo imuno-histoquímico do tipo centro germinativo, Linfoma céls T perif SOE = linfoma de células T periféricas, sem outras especificações, LDGCB = linfoma difuso de grandes células B, BA = biópsia por agulha grossa, BC = biópsia cirúrgica.

*Descrição dos casos de biópsias cirúrgicas com desempenho diagnóstico diferente de 4*

*Satisfatórias (desempenho diagnóstico = 3)*

Nenhuma das 4 BCs com desempenho diagnóstico = 3 foi repetida. As características clínicas dos pacientes e seus respectivos diagnósticos estão detalhados na tabela 18.

Tabela 18 - Características clínicas e diagnóstico dos 4 pacientes do grupo de BC que obtiveram desempenho diagnóstico = 3.

Diagnóstico	Idade	Sexo	Topografia	Antecedente
Linfoma peq. céls. B	62	F	LN axilar	LLC
Linfoma grandes céls B. IRF4?	37	M	LN cervical	
Linfoma peq. céls. B	67	F	LN axilar	
LDGCB	84	M	Pleura	LLC

Linfoma peq. céls. B = linfoma de pequenas células B, LN = linfonodo, LLC = leucemia linfocítica crônica/ linfoma linfocítico, linfoma grandes céls B IRF4 = linfoma de grandes células B com rearranjo do IRF4, LDGCB = linfoma difuso de grandes células B.

*Não-satisfatórias (desempenho diagnóstico = 0, 1 e 2)*

Nenhuma das 3 BCs consideradas não-satisfatórias foi repetida nesta instituição. Como em todos os casos a clínica favorecia processo reativo, não foi feita repetição e foi optado pelo acompanhamento clínico dos pacientes. As características e os respectivos diagnósticos finais de cada um desses casos

estão descritos na tabela 19.

Tabela 19 - Características clínicas e diagnóstico dos 3 pacientes do grupo de BC que obtiveram amostras consideradas não-satisfatórias (desempenho diagnóstico = 0, 1 e 2).

<b>Diagnóstico</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Topografia</b>	<b>Antecedente</b>	<b>Apresentação sugere linfoma?</b>
Reacional x LZM	23	F	LN cervical		não
PLA + Linfadenite IGG4	67	M	LN cervical		não
PLA com plasmócitos	66	F	LN cervical	dç auto-imune	não

LZM = linfoma da zona marginal, PLA = proliferação linfoide atípica, F = feminino, M = masculino, LN = linfonodo, dç = doença.

#### 4.2.2 De acordo com os objetivos secundários

1) Contribuição relativa da clínica/ radiologia e dos demais exames complementares nos diferentes tipos de material (BA e BC)

A tabela 20 mostra a distribuição geral das contribuições relativas da clínica/ radiologia e dos demais exames complementares no diagnóstico em amostras de BA e BC. Interessante ressaltar que em nenhum caso, as informações clínicas ou os exames complementares prejudicaram o diagnóstico.

Tabela 20 - distribuição geral das contribuições relativas da clínica/ radiologia e dos demais exames nas amostras de BA e BC:

<b>Contribuição</b>	<b>Clínica (n=476)</b>			<b>IHQ (n=446)</b>			<b>IFT CMF (n=237)</b>			<b>Outros (n=270)</b>		
	<b>BA</b>	<b>BC</b>	<b>p</b>	<b>BA</b>	<b>BC</b>	<b>p</b>	<b>BA</b>	<b>BC</b>	<b>p</b>	<b>BA</b>	<b>BC</b>	<b>P</b>
<b>0 - indiferente</b>	0	0		0	0		35	20		5	3	
<b>1 - prejudicou</b>	0	0		0	0		0	0		0	0	
<b>2 - auxiliou</b>	173	239		0	0		96	62		107	122	
<b>3 - imprescindível</b>	45	19	0,000	210	236	0,024	18	6	0,165	10	23	0,058
<b>Total</b>	218	258		210	236		149	88		122	148	

BA = biópsia por agulha grossa, BC = biópsia cirúrgica, IHQ = imuno-histoquímica, IFT CMF = imunofenotipagem por citometria de fluxo.

#### *Contribuição relativa da clínica / radiologia*

Os dados clínicos e achados radiológicos foram considerados imprescindíveis para o diagnóstico em 45 de 218 casos de BA (20,6%) e em 19 de 258 casos de BC (7,4%)  $P < 0,001$ . A tabela 1 do anexo 5 cita os casos de BA e a tabela 2 do anexo 5 cita os casos de BC em que as informações clínicas/ radiológicas foram consideradas imprescindíveis para o diagnóstico e o motivo

que levou a essa conclusão.

A imagem 2 ilustra um caso de BA de paciente portador de síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), com doença linfoproliferativa polimórfica semelhante à DLPT, no qual a informação clínica sobre a imunodeficiência foi considerada imprescindível para o diagnóstico.

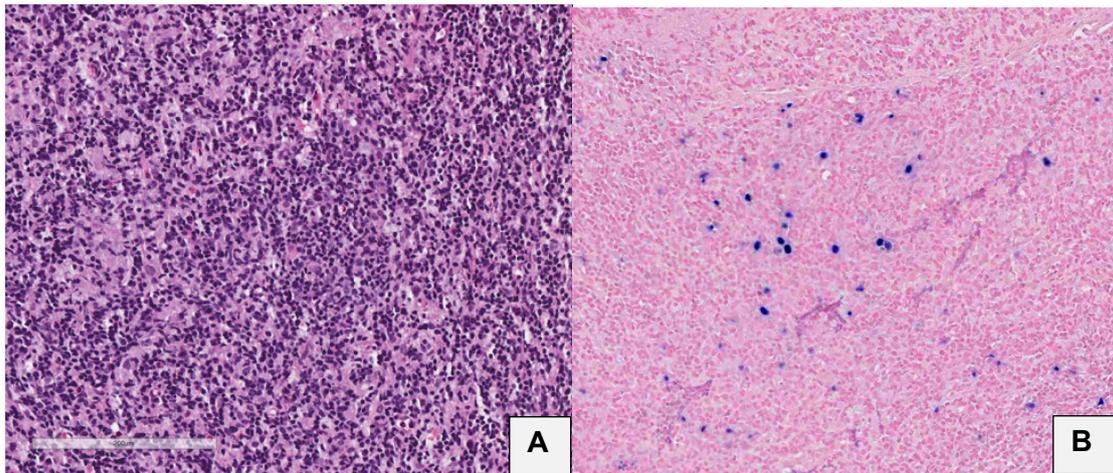


Imagem 2 – Caso 161 – Linfonodo retroperitoneal. Exemplo de doença linfoproliferativa polimórfica semelhante à DLPT em paciente HIV positivo. A) H&E mostrando população celular polimórfica. B) HIS EBV mostrando positividade para EBV em subpopulação de células.

A imagem 3 ilustra um caso de BC em paciente com proliferação linfoide com numerosos plasmócitos, no qual a informação clínica sobre doença autoimune em atividade foi considerada imprescindível para o diagnóstico de linfadenopatia autoimune.

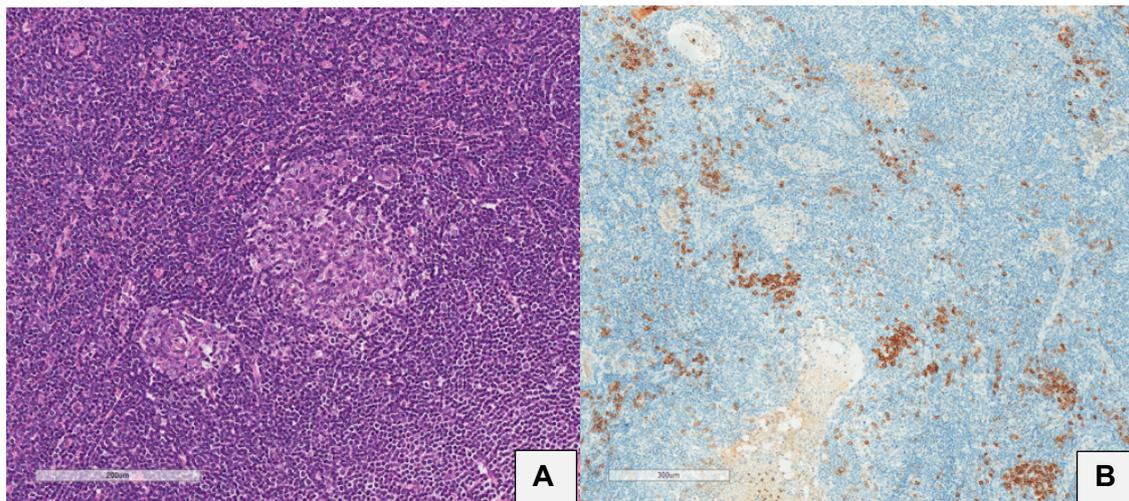


Imagem 3 – Caso 371 – Linfonodo cervical. Exemplo de proliferação linfoide com numerosos plasmócitos, compatível com linfadenopatia autoimune. A) H&E mostrando alguns folículos linfoides. B) CD138 ressaltando o componente de plasmócitos.

#### *Contribuição relativa da imuno-histoquímica*

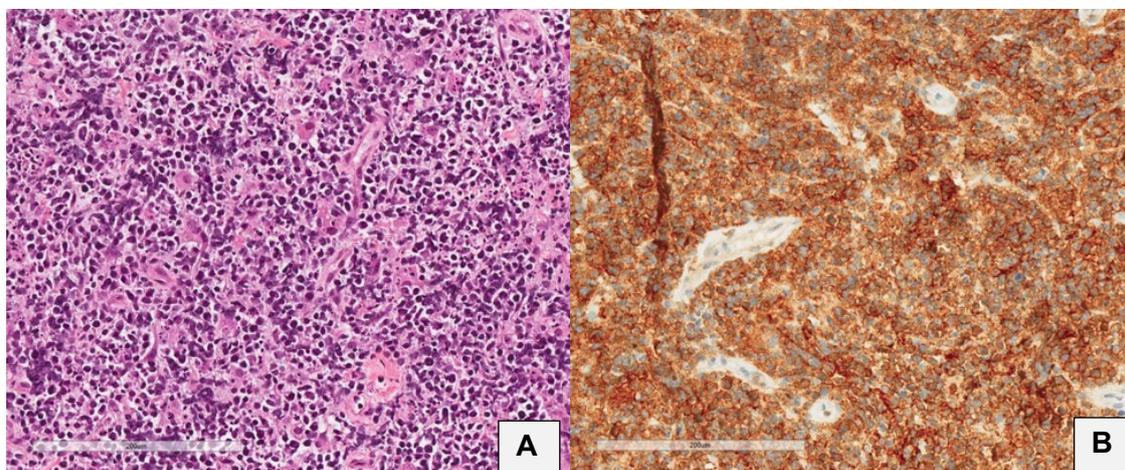
Estudo imuno-histoquímico foi imprescindível para o diagnóstico em 446 casos (93,7%). Os casos em que o exame não foi realizado foram aqueles considerados indubitavelmente benignos na avaliação morfológica inicial em conjunto com os dados obtidos da clínica/ radiologia e da imunofenotipagem por citometria de fluxo, quando disponível. A IHQ foi considerada dispensável em 8 casos de BA, sendo que em 4 deles a IFT CMF foi realizada e corroborava a ausência de população clonal e em 22 casos de BC, dos quais nenhum possuía exame de IFT CMF. A IHQ foi considerada imprescindível em 210 dos 218 casos de BA (96,3%) e em 236 dos 258 casos de BC (91,5%)  $P=0,024$ .

#### *Contribuição relativa da imunofenotipagem por citometria de fluxo*

O exame de imunofenotipagem por citometria de fluxo (IFT CMF) foi realizado em amostras de 237 pacientes, sendo 149 BA e 88 BC. Proporcionalmente, 77,2% dos pacientes que foram submetidos a BA tiveram material encaminhado para IFT CMF, em comparação com 55% dos pacientes

submetidos a BC  $P < 0,001$  (tabela 10). Em relação à contribuição, a IFT CMF foi considerada imprescindível para o diagnóstico em 24 de 237 casos (10,1%), sendo 18 de 149 amostras de BA (12%) em comparação com 6 de 88 amostras de BC (6,8%)  $P = 0,165$ . A IFT CMF contribuiu de alguma forma, auxiliando o diagnóstico em 66,7% dos casos em que foi realizada. As tabelas 3 e 4 do anexo 5 relacionam os casos em que a IFT CMF foi considerada imprescindível para o diagnóstico nas BAs e BCs, respectivamente, juntamente com o motivo que justificou a inclusão nesta categoria.

A imagem 4 ilustra um caso de BA com diagnóstico de linfoma linfoblástico T, TDT negativo, no qual a IFT CMF foi imprescindível para a segurança do diagnóstico, confirmando a natureza imatura da neoplasia, ao demonstrar CD3 em padrão citoplasmático e dupla negatividade CD4/CD8.



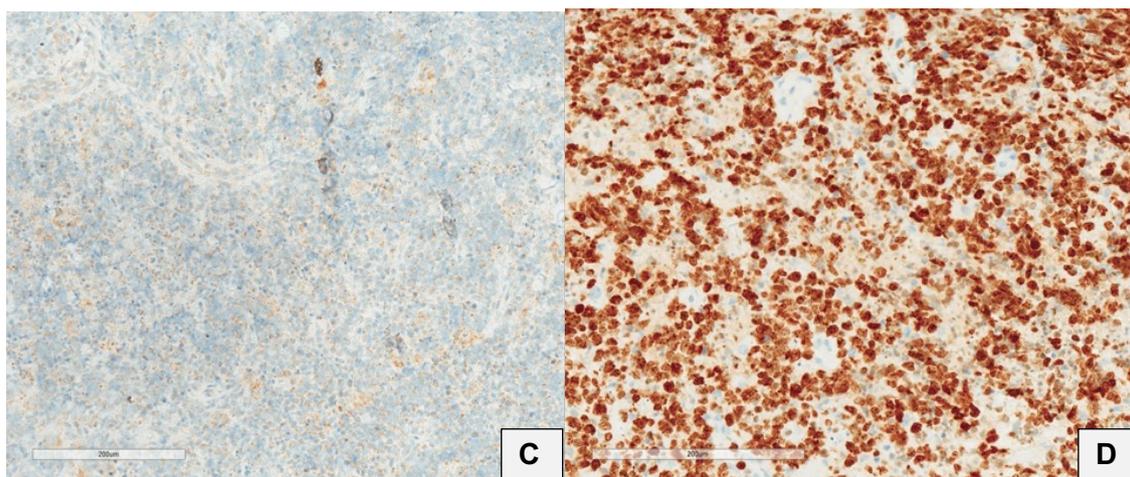
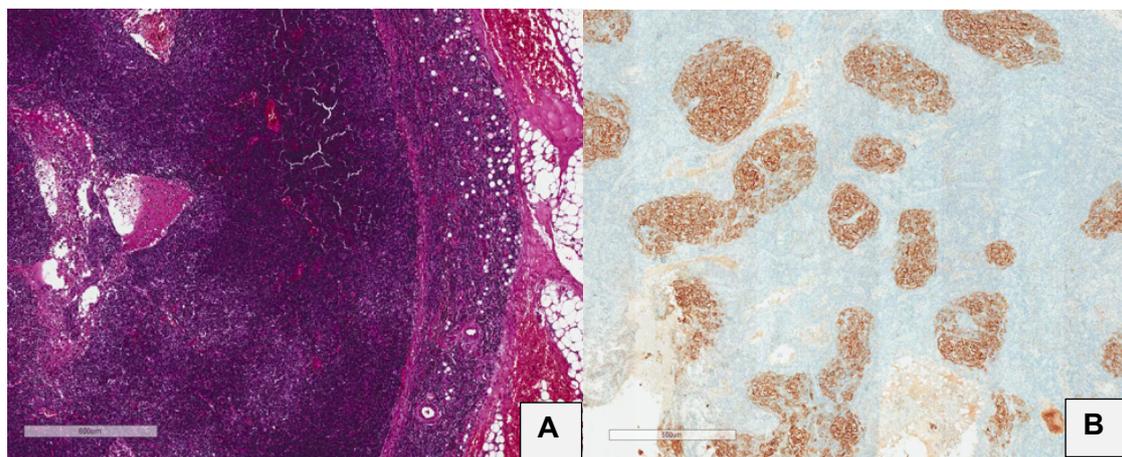


Imagem 4 – Caso 41 – Partes moles (glúteo). Exemplo de linfoma linfoblástico T, TDT negativo. A) H&E. B) CD3, C) TDT e D) KI67.

A imagem 5 ilustra um caso de BC de difícil interpretação em que a IFT CMF foi considerada imprescindível para o diagnóstico final de infiltração parcial de linfonodo por neoplasia de células B pequenas e maduras. A IFT CMF auxiliou na identificação precisa da população neoplásica, com perfil imunofenotípico compatível com tricocitoleucemia.



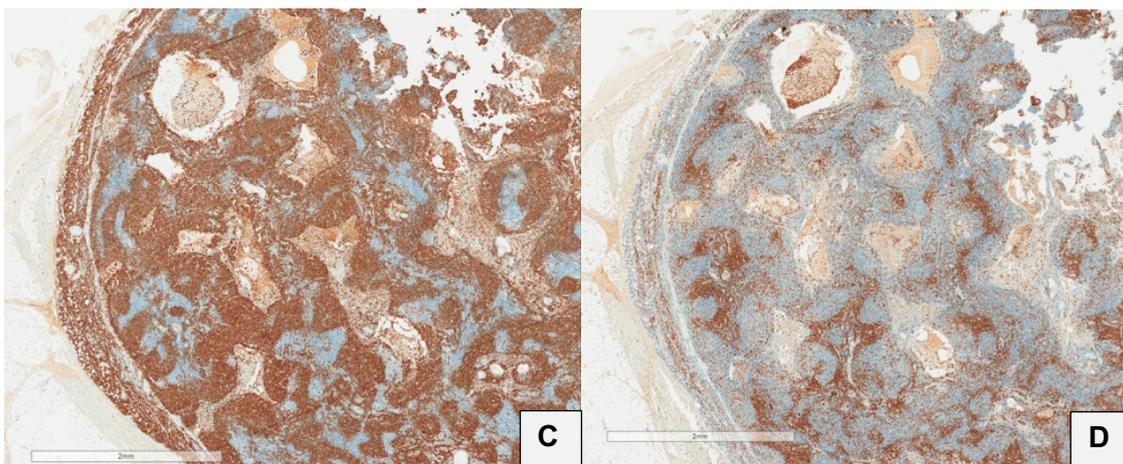


Imagem 5 – Caso 52 – Linfonodo retroperitoneal. Linfonodo apresentando infiltração parcial por neoplasia de células B pequenas e maduras. A) H&E demonstra preservação arquitetural relativa, porém com infiltração de cápsula e tecido adiposo adjacente. B) CD21 mostrando arquitetura folicular preservada. C) CD20 mostrando a distribuição dos linfócitos B e D) CD3 mostrando a distribuição dos linfócitos T.

#### *Contribuição relativa dos demais exames complementares*

Outros exames complementares além da IHQ e IFT CMF foram considerados imprescindíveis para o diagnóstico em 10 de 122 casos de BA (8,2%) e em 23 de 148 casos de BC (17,3%)  $P=0,058$ . As tabelas 5 e 6 do anexo 5 relacionam os casos em que estes exames foram considerados imprescindíveis para o diagnóstico nas BAs e BCs, respectivamente, com o motivo que justificou a inclusão nesta categoria.

A imagem 6 mostra o exemplo de linfoma difuso de grandes células B, EBV positivo, no qual a demonstração da associação com o EBV pelo método de hibridização *in situ* foi imprescindível para o diagnóstico.

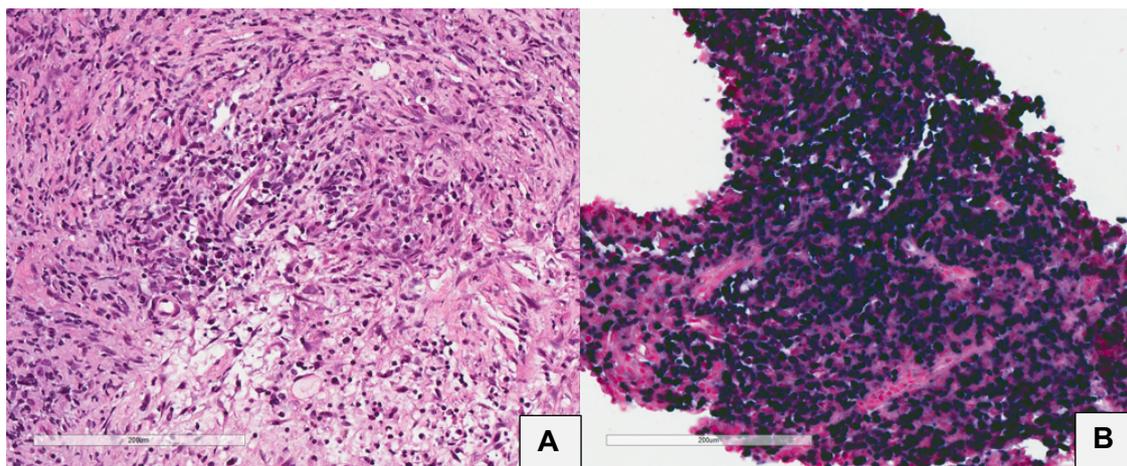


Imagem 6 – Caso 470 – Linfonodo cervical. Exemplo de linfoma difuso de grandes células B, EBV positivo. A) H&E mostrando predominio de células grandes em meio a fundo polimórfico, fibrose e áreas de necrose. B) Positividade para EBV na maior parte das células pelo método de HIS.

A imagem 7 mostra exemplo de Linfoma B de alto grau com rearranjo do MYC e do BCL2, no qual a demonstração dos rearranjos pelo método de FISH foi essencial para o diagnóstico final.

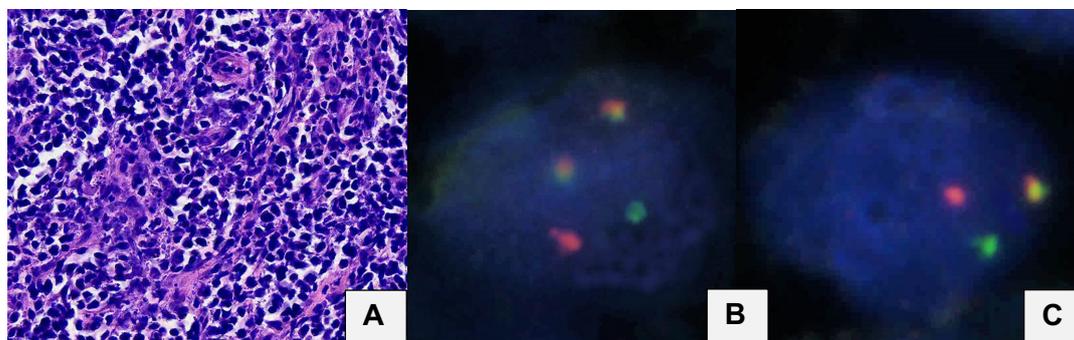


Imagem 7 – Caso 135 – Linfonodo cervical. Exemplo de Linfoma B de alto grau com rearranjo do MYC e do BCL2. A) H&E mostrando neoplasia composta por células intermediárias a grandes. B) Núcleo em intérfase apresentando rearranjo IGH/BCL2 demonstrado por meio de sonda do tipo dual fusion para os dois genes, na qual o sinal vermelho corresponde ao gene BCL2 e o sinal verde corresponde ao gene IGH. Os sinais verde e vermelho separados indicam os alelos normais, enquanto o par de sinais verde e vermelho juntos indicam os alelos rearranjados. C) Núcleo em intérfase apresentando rearranjo do gene cMYC por meio de sonda break apart, na qual um sinal de fusão representa o alelo normal e os sinais verde e vermelho separados representam o alelo rearranjado.

2) Comparação da capacidade diagnóstica dos diferentes tipos de material em diferentes categorias morfológicas e em diferentes subgrupos de entidades

Antes de analisar a capacidade diagnóstica dentro das categorias morfológicas e subgrupos de entidades, será apresentada nas figuras de 6 a 10 a distribuição dos subgrupos de entidades e respectivos diagnósticos em cada uma das categorias morfológicas observadas.

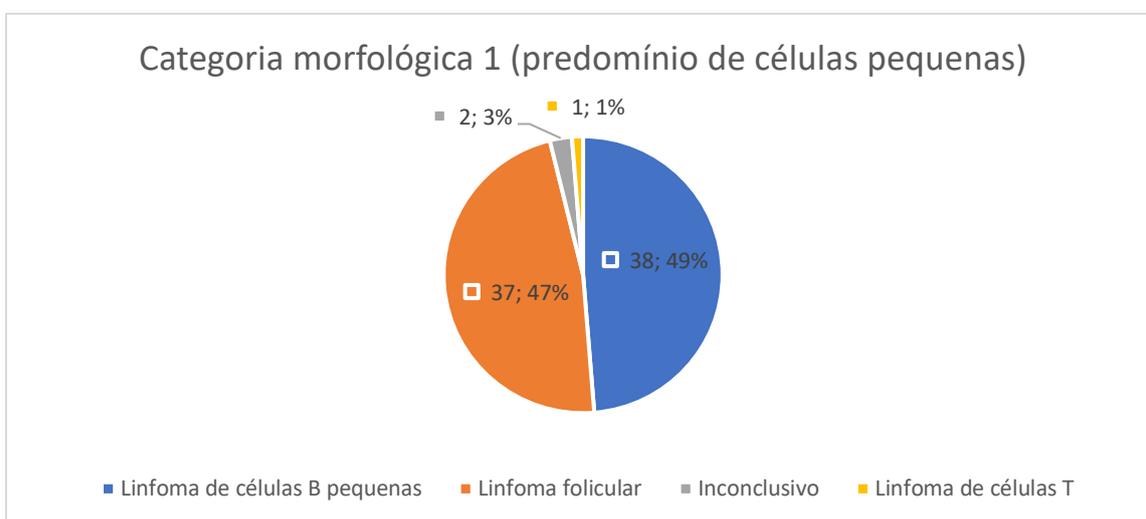


Figura 6 - Distribuição dos subgrupos de entidades que se enquadraram na categoria morfológica 1.

Na categoria morfológica 1, a maior parte dos casos correspondeu aos subgrupos de entidades do linfoma folicular e do linfoma de células B pequenas. Um caso de linfoma de células T foi enquadrado nesta categoria e se tratava de infiltração hepática por leucemia de células granulares grandes (LCGG).

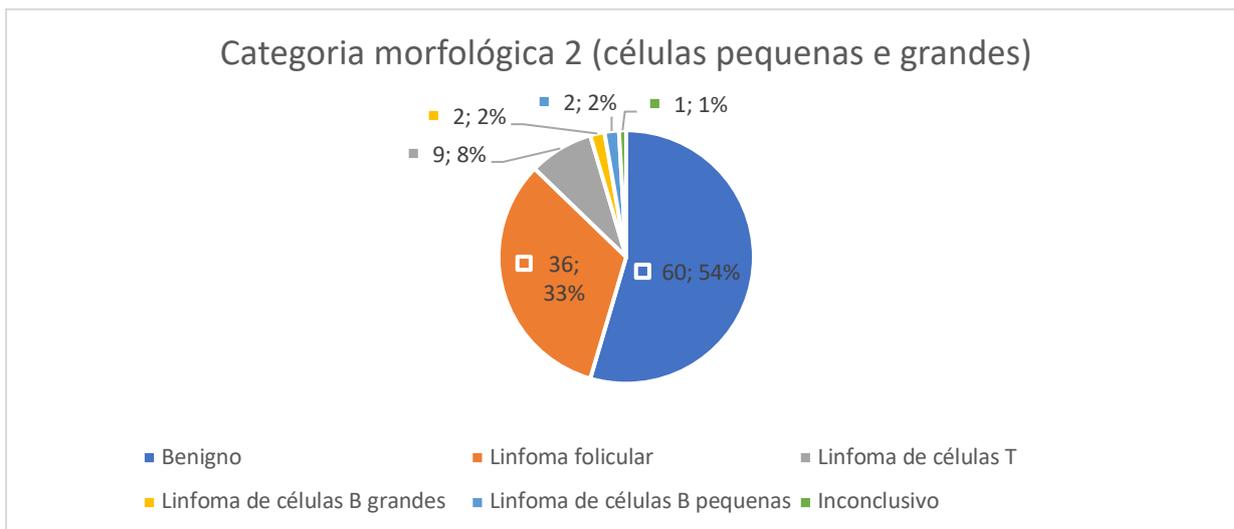


Figura 7 - Distribuição dos subgrupos de entidades que se enquadraram na categoria morfológica 2.

Na categoria morfológica 2 a maior parte dos casos correspondeu aos subgrupos de entidades benigno e linfoma folicular. O subgrupo linfoma de células T veio em terceiro lugar, representado por linfoma de células T angioimunoblástico (n=6) e linfoma de células T periféricas SOE (n=3). Foram observados 2 casos do subgrupo de linfomas de células B pequenas, sendo representados por linfoma de zona marginal com aumento no contingente de células grandes (n=1) e linfoma linfocítico com centros de proliferação grandes e confluentes e maior atividade mitótica (n=1). Foram observados também dois representantes do subgrupo de linfoma de células B grandes, sendo um caso de linfoma difuso de grandes células B com componente de linfoma de zona marginal associado (provável transformação) e um caso de linfoma de grandes células B EBV positivo.

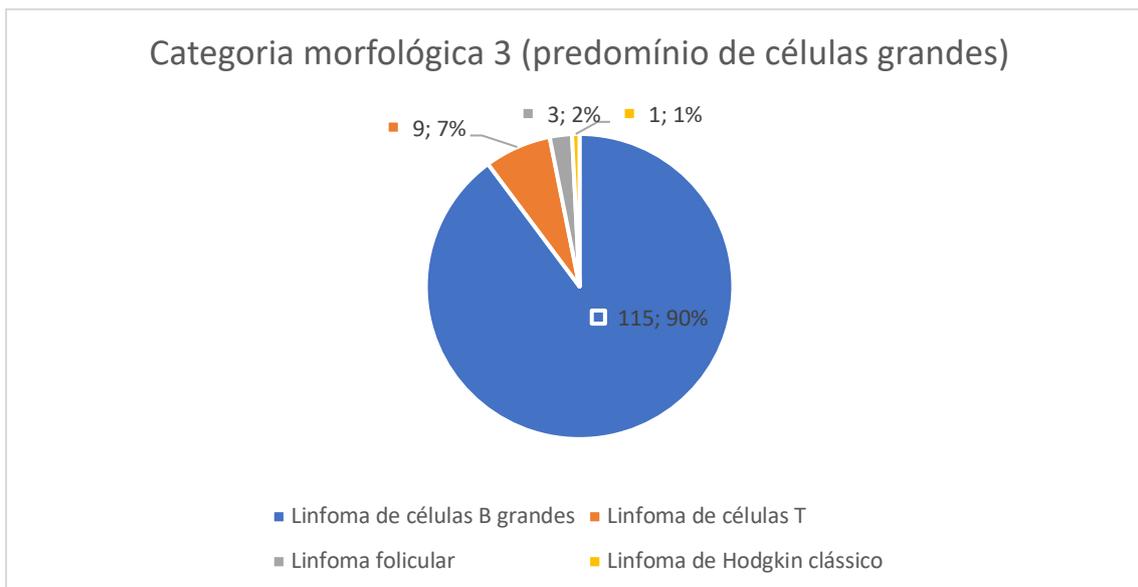


Figura 8 - Distribuição dos subgrupos de entidades que se enquadraram na categoria morfológica 3.

Na categoria morfológica 3 a maior parte dos casos correspondeu ao subgrupo de linfoma de grandes células B. Nove casos do subgrupo de linfoma de células T foram classificados nesta categoria e representados por linfoma de grandes células anaplásicas ALK negativos (n=4), linfoma de grandes células anaplásicas ALK positivos (n=2), linfoma de células T periféricas SOE (n=2) e linfoma/ leucemia de células T do adulto (n=1). Foram observados três casos do subgrupo linfoma folicular, todos correspondendo a linfoma folicular grau 3B e um caso do subgrupo linfoma de Hodgkin clássico, sendo classificado como depleção linfocitária.

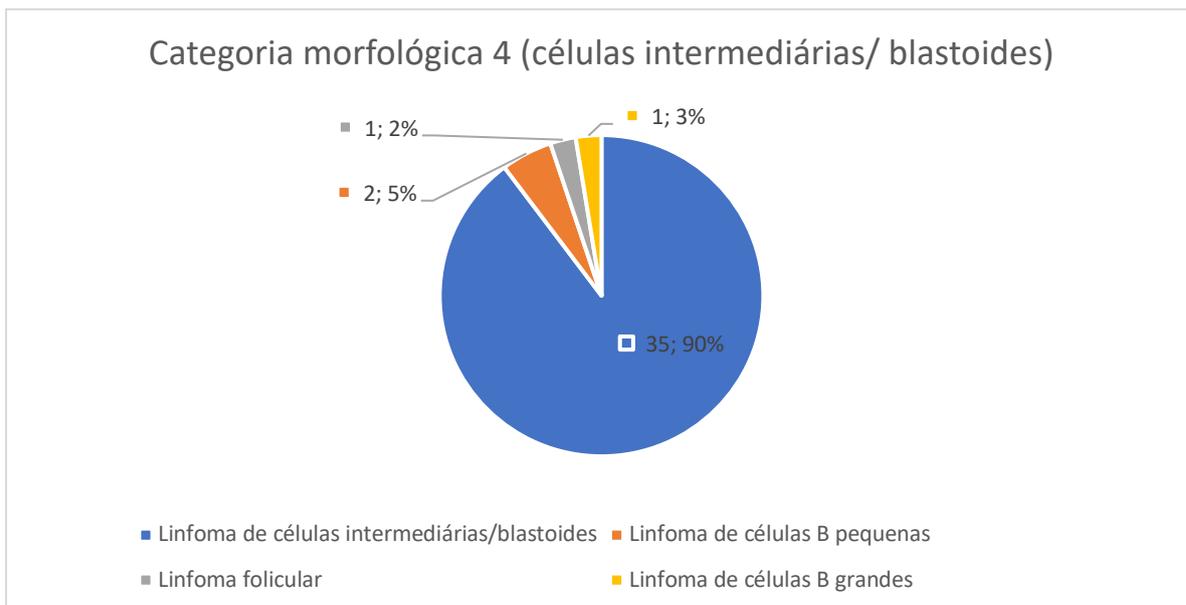


Figura 9 - Distribuição dos subgrupos de entidades que se enquadraram na categoria morfológica 4.

A categoria morfológica 4 correspondeu, em sua maior parte, ao subgrupo de linfomas de células intermediárias e com morfologia blastoide que não se enquadravam em nenhum outro subgrupo de entidades específico e que, nessa casuística, foram representados pelo linfoma de Burkitt (n=13), doença linfoproliferativa pós-transplante monomórfica do tipo linfoma de Burkitt (n=6), linfoma B de alto grau com morfologia blastoide (n=7) e linfoma linfoblástico (n=9). Foram encontrados dois casos do subgrupo de linfomas de células B pequenas, que se tratavam de linfoma de células do manto com morfologia blastoide, um caso do subgrupo de linfoma de células B grandes, representado por um caso de síndrome de Richter em que a maior parte do componente transformado era composto por células grandes e com morfologia blastoide e um caso do subgrupo do linfoma folicular que apresentou morfologia blastoide.

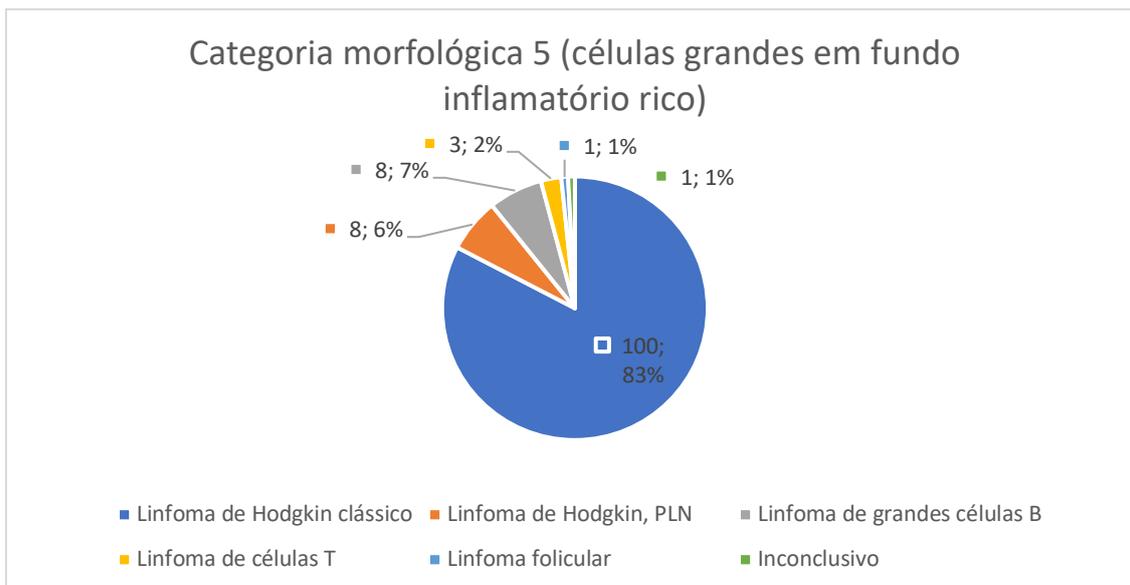


Figura 10 - Distribuição dos subgrupos de entidades que se enquadraram na categoria morfológica 5. Linfoma de Hodgkin, PLN = Linfoma de Hodgkin, predominância linfocítica nodular.

Na categoria morfológica 5 a maior parte dos casos correspondeu ao subgrupo de linfoma de Hodgkin clássico e linfoma de Hodgkin, PLN. Foram encontrados 8 casos do subgrupo linfoma de grandes células B representados por linfoma de grandes células B rico em células T e histiócitos (n=6) e linfoma de grandes células B inclassificável, com características intermediárias entre o linfoma difuso de grandes células B e o linfoma de Hodgkin clássico (n=2). Três casos do subgrupo de linfoma de células T foram enquadrados nessa categoria, correspondendo a linfoma de células T angioimunoblástico (n=2) e linfoma de grandes células anaplásicas ALK negativo (n=1). Além disso, um caso do subgrupo de linfoma folicular com componente de células de Reed-Sternberg símile também foi enquadrado nessa categoria.

A tabela 21 mostra o número de casos de BA e BC e a porcentagem distribuída nas categorias morfológicas e subgrupos de entidades.

Tabela 21 - Número de casos e percentagem distribuída nas categorias morfológicas e subgrupos de entidades em BAs e BCs.

	BA (n=218)	BC (n=258)	Total (n=476)	P
<b>Categorias morfológicas</b>				
1- Predomínio pequenas células	41 (18,8%)	37 (14,3%)	78	0,193
2- Células pequenas e grandes	38 (17,4%)	72 (27,9%)	110	0,006
3- Predomínio grandes células	62 (28,4%)	66 (25,6%)	128	0,484
4- Células intermediárias/ blastoides	24 (11,1%)	15 (5,8%)	39	0,043
5- Células grandes em fundo inflamatório rico	53 (24,3%)	68 (26,4%)	121	0,609
Total	218	258	476	
<b>Subgrupos de entidades</b>				
0- Inconclusivo	1 (0,5%)	3 (1,2%)	4	0,384
1- Benigno	15 (6,9%)	45 (17,4%)	60	0,000
2- Linfoma de Hodgkin clássico	47 (21,5%)	54 (20,9%)	101	0,867
3- Linfoma de Hodgkin, PLN	1 (0,5%)	7 (2,7%)	8	0,042
4- Linfoma de células B pequenas	21 (9,6%)	21 (8,2%)	42	0,569
5- Linfoma de células B grandes	62 (28,4%)	64 (24,8%)	126	0,372
6- Linfoma de células intermediárias/ blastoides	22 (10,1%)	13 (5%)	35	0,039
7- Linfoma de células T	10 (4,6%)	12 (4,7%)	22	0,974
8- Linfoma folicular	39 (17,9%)	39 (15,1%)	78	0,418

BA = biópsia por agulha grossa, BC = biópsia cirúrgica, Linfoma de Hodgkin, PLN = Linfoma de Hodgkin, predominância linfocítica nodular.

Diferença significativa nos dois tipos de material foi observada entre a percentagem de diagnósticos benignos, de casos de Linfoma de Hodgkin PLN e de casos de linfomas de células intermediárias/ blastoides.

Nos materiais de BA, em relação à categoria morfológica, maior percentagem de casos com desempenho diagnóstico diferente de 4 foi observada na categoria 5 (proliferação linfoide de células pleomórficas com fundo inflamatório rico), sendo 7 de 53 (13,2%). Nos materiais de BC, maior percentagem de casos foi observada na categoria 1 (proliferação linfoide com predomínio de células pequenas), sendo 2 de 37 (5,4%). A distribuição do número e percentagem de casos com DD diferente de 4 em categorias morfológicas está ilustrada na tabela 22 e figura 11.

Tabela 22 - Distribuição do número de casos com DD diferente de 4 em categorias morfológicas em materiais de BA e BC.

<b>Categoria morfológica</b>	<b>BA</b>	<b>BC</b>	<b>Total</b>	<b>P</b>
<b>Células pequenas</b>				
Total	41	37	78	0,916
DD diferente de 4	2	2	4	
<b>Células pequenas e grandes</b>				
Total	38	72	110	0,248
DD diferente de 4	4	3	7	
<b>Células grandes</b>				
Total	62	66	128	0,123
DD diferente de 4	6	2	8	
<b>Células grandes em fundo inflamatório rico</b>				
Total	53	68	121	0,005
DD diferente de 4	7	0	7	
<b>P</b>				0,364

BA = biópsia por agulha grossa, BC = biópsia cirúrgica, DD = desempenho diagnóstico

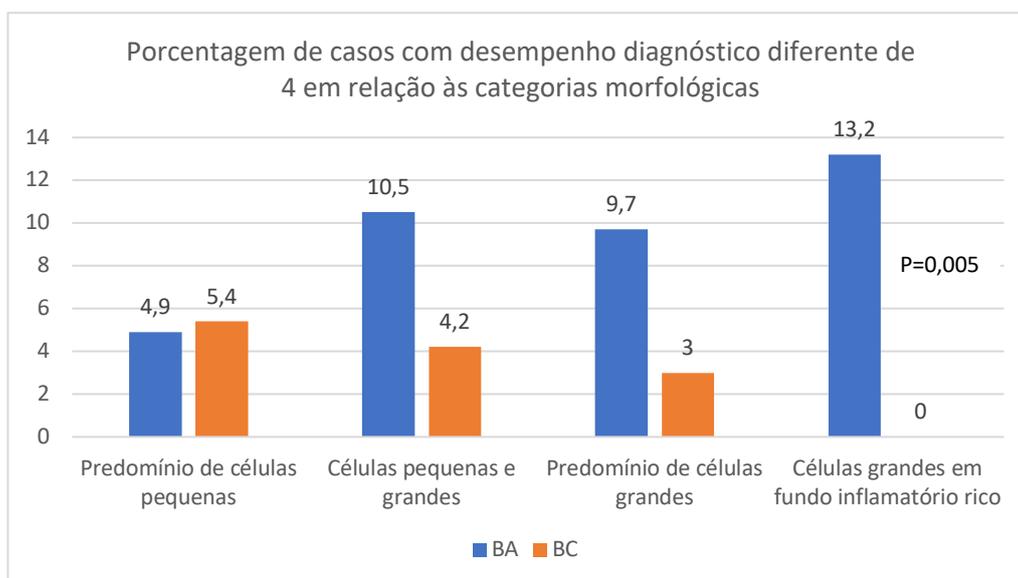


Figura 11 - Porcentagem de casos com desempenho diagnóstico diferente de 4 em relação às categorias morfológicas em materiais de BA e BC. BA = biópsia por agulha grossa, BC = biópsia cirúrgica.

Quando analisados apenas os casos considerados não-satisfatórios (DD = 0,1 e 2), nas BAs, maior porcentagem esteve na categoria morfológica 5 (proliferação linfóide de células pleomórficas com fundo inflamatório rico), sendo 7 de 53 (13,2%). Nas BCs, todas as biópsias não-satisfatórias pertenciam à categoria 2 (proliferação linfóide de células pequenas e grandes),

correspondendo a 3 de 72 (4,2%) casos desta categoria. A distribuição do número e porcentagem de casos não-satisfatórios em categorias morfológicas está ilustrada na tabela 23 e figura 12.

Tabela 23 - Distribuição do número de casos não satisfatórios em categorias morfológicas em BAs e BCs.

<b>Categoria morfológica</b>	<b>BA</b>	<b>BC</b>	<b>Total</b>	<b>P</b>
<b>Células pequenas e grandes</b>				
Total	38	72	110	0,077
Não satisfatórias	0	3	3	
<b>Células grandes</b>				
Total	62	66	128	0,151
Não satisfatórias	2	0	2	
<b>Células grandes com fundo inflamatório rico</b>				
Total	53	68	121	0,005
Não satisfatórias	7	0	7	
<b>P</b>				0,199

BA = biópsia por agulha grossa, BC = biópsia cirúrgica

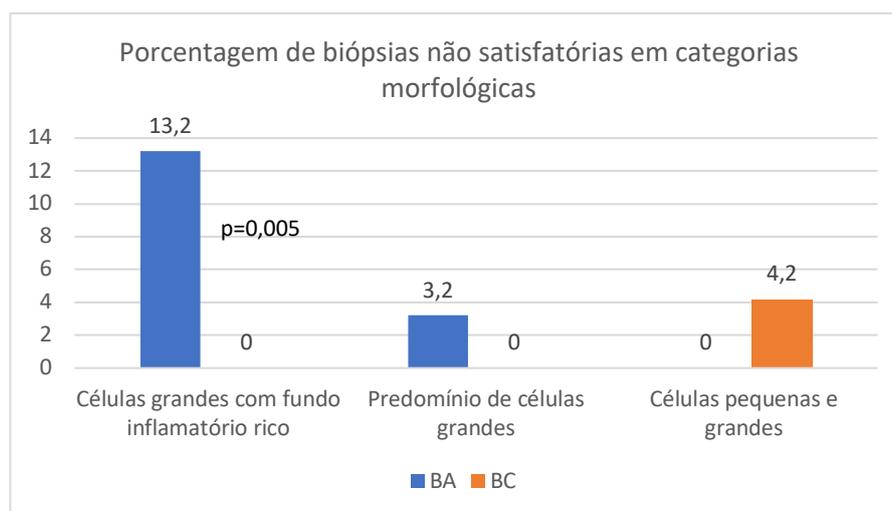


Figura 12 - Distribuição da porcentagem de casos não satisfatórios em categorias morfológicas em BAs e BCs. BA = biópsia por agulha grossa, BC = biópsia cirúrgica.

Em relação aos subgrupos de entidades, nos materiais de BA, maior porcentagem de casos com capacidade diagnóstica diferente de 4 foi observada no subgrupo de linfoma não Hodgkin de células T, 3 de 10 (30%) e, nas BCs, no subgrupo de linfoma não Hodgkin de pequenas células B, 2 de 21 (9,5%). A distribuição do número e porcentagem de casos com DD diferente de 4 em

subgrupos de entidades está ilustrada na tabela 24 e figura 13. A imagem 8 ilustra o exemplo de uma BA inconclusiva, com histologia suspeita para linfoma de Hodgkin clássico em que, apesar do fundo ser compatível, não foram identificadas células neoplásicas diagnósticas na amostra.

Tabela 24 - Número de casos com desempenho diagnóstico diferente de 4 em relação aos subgrupos de entidades em materiais de BA e BC.

Subgrupo de entidades	BA	BC	Total	P
<b>Linfoma de Hodgkin clássico</b>				
Total	47	54	101	0,018
DD diferente de 4	5	0	5	
<b>Linfoma de pequenas células B</b>				
Total	21	21	42	1,000
DD diferente de 4	2	2	4	
<b>Linfoma de grandes células B</b>				
Total	62	64	126	0,074
DD diferente de 4	7	2	9	
<b>Linfoma de células T</b>				
Total	10	12	22	0,038
DD diferente de 4	3	0	3	
<b>Linfoma folicular</b>				
Total	39	39	78	0,311
DD diferente de 4	1	0	1	
<b>P</b>				0,000

BA = biópsia por agulha grossa, BC = biópsia cirúrgica, DD = desempenho diagnóstico.

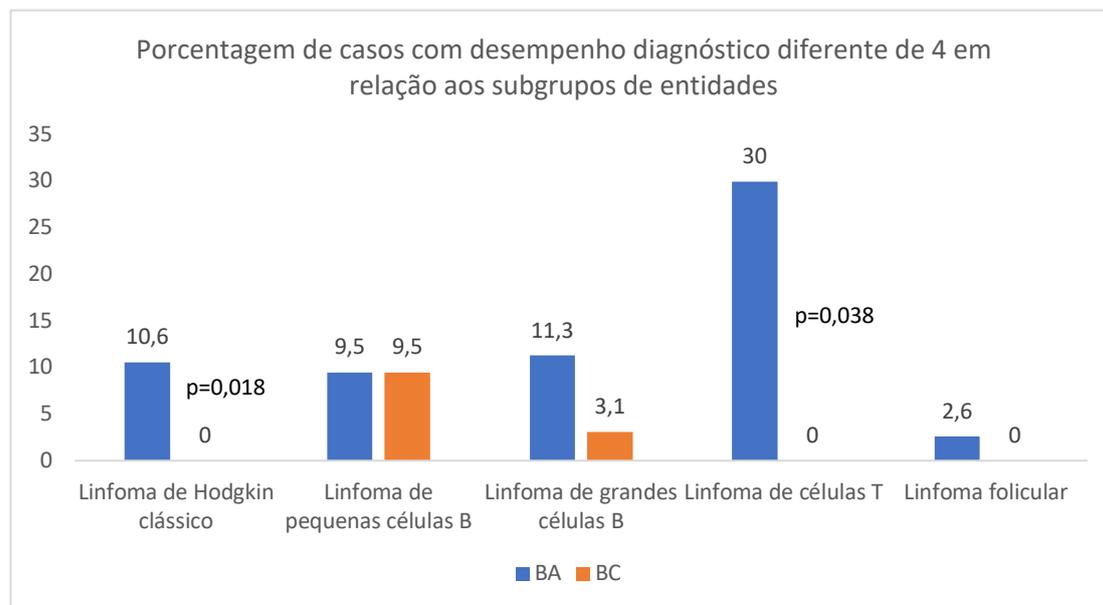


Figura 13 - Porcentagem de casos com desempenho diagnóstico diferente de 4 em relação aos subgrupos de entidades em materiais de BA e BC. BA = biópsia por agulha grossa, BC = biópsia cirúrgica.

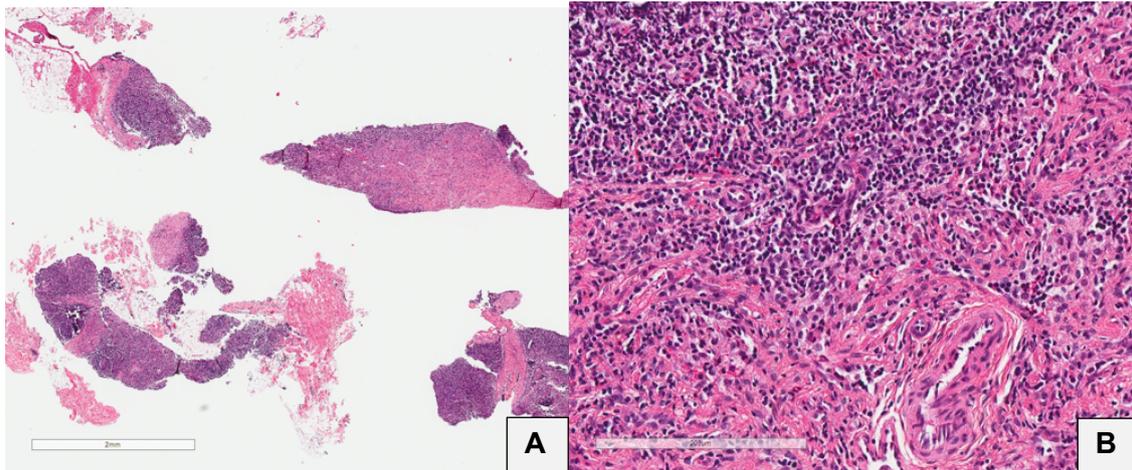


Imagem 8 – Caso 468 – Linfonodo cervical. Exemplo de BA inconclusiva, suspeita para linfoma de Hodgkin clássico. A) H&E em menor aumento mostrando fragmentos de linfonodo com densa fibrose, por vezes delimitando nódulos. B) H&E maior aumento mostrando fibrose e fundo inflamatório misto, rico em eosinófilos.

Quando apenas as biópsias consideradas não-satisfatórias são analisadas, entre as que foram repetidas em nosso serviço (todas provenientes de BA), maior porcentagem de casos foi observada no subgrupo de Linfoma não Hodgkin de células T, sendo 1 de 10 casos (10%), seguido pelo subgrupo de linfoma de Hodgkin clássico, 5 de 53 casos (9,4%).

A tabela 25 e figura 14 ilustram a distribuição de números e porcentagem de biópsias não-satisfatórias que foram repetidas em nosso serviço em relação ao total de casos em cada subgrupo de entidades.

Tabela 25 - Distribuição do número de biópsias não-satisfatórias (BA) que foram repetidas em nosso serviço em relação ao total de casos em cada subgrupo de entidades.

Subgrupo de entidades	Número de biópsias não satisfatórias	Total de biópsias
Linfoma de Hodgkin clássico	5 (9,4%)	53
Linfoma de grandes células B	2 (3,2%)	62
Linfoma de células T	1 (10%)	10

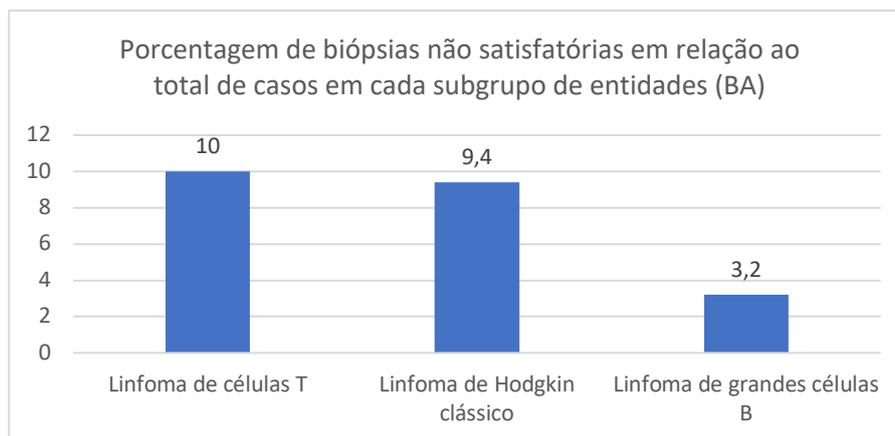


Figura 14 - Distribuição da porcentagem de biópsias não satisfatórias (BA) que foram repetidas em nosso serviço em relação ao total de casos em cada subgrupo de entidades. BA = biópsia por agulha grossa.

3) Comparação do resultado e da concordância da imunofenotipagem por citometria de fluxo com o diagnóstico final entre as diferentes categorias morfológicas e subgrupos de entidades

A IFT CMF foi considerada inconclusiva em 8 amostras, todas provenientes de BAs, distribuídas em subgrupos de entidades conforme demonstrado na tabela 26 e figura 15.

Tabela 26 - Número de biópsias com IFT CMF inconclusiva entre o total de casos com IFT CMF distribuídos por subgrupos de entidades.

Subgrupo de entidades	Número de IFT CMF inconclusivas	Total de casos com IFT CMF
Linfoma de Hodgkin clássico	4 (12,1%)	33
Linfoma de grandes células B	3 (7,9%)	38
Linfoma de células intermediárias / morfologia blastoide	1 (6,5%)	16

IFT CMF = imunofenotipagem por citometria de fluxo.

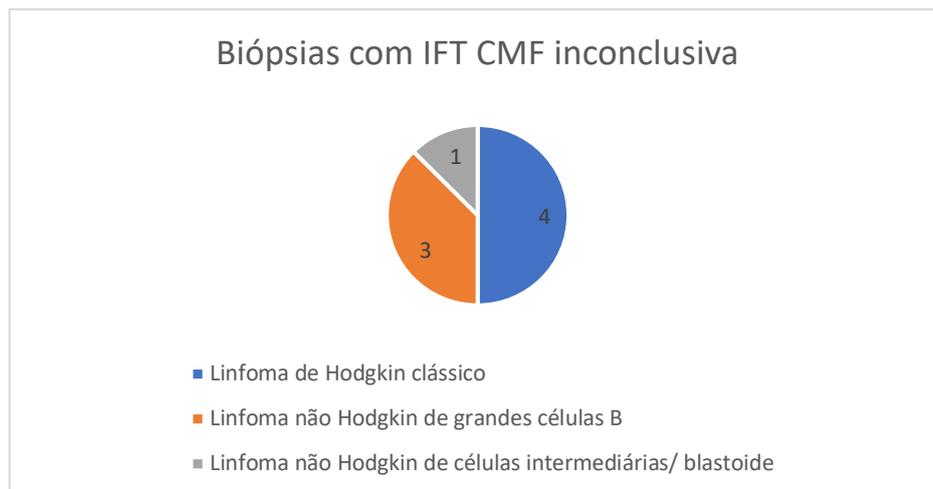


Figura 15 - Distribuição das biópsias com IFT CMF inconclusiva entre os subgrupos de entidades. IFT CMF = imunofenotipagem por citometria de fluxo.

Em relação à concordância do resultado da IFT CMF com o diagnóstico final, em 47 de 237 casos (19,8%) o resultado foi considerado discordante. Destes, 29 (61,7%) eram linfomas de Hodgkin clássico. Todos os 5 casos de linfoma de Hodgkin, PLN tiveram resultado de IFT CMF discordante (negativo para população anômala).

A distribuição dos casos com IFT CMF discordante de acordo com o total de casos com IFT CMF nos diferentes subgrupos de entidades em materiais de BA e BC estão ilustrados na tabela 27 e figura 16.

Tabela 27 - Distribuição dos casos com IFT CMF discordante de acordo com o total de casos com IFT CMF entre os subgrupos de entidades.

Subgrupo de entidades	BA	BC	Total	P
<b>Linfoma de Hodgkin clássico</b>				
Discordantes	16 (48,5%)	13 (62%)	29 (53,7%)	0,328
Total	33	21	54	
<b>Linfoma de Hodgkin, PLN</b>				
Discordantes	1 (100%)	4 (100%)	5 (100%)	*
Total	1	4	5	
<b>Linfoma de pequenas células B</b>				
Discordantes	0 (0%)	1 (16,6%)	1 (4%)	0,273
Total	19	6	25	
<b>Linfoma de grandes células B</b>				
Discordantes	5 (13,2%)	4 (21%)	9 (15,8%)	0,467
Total	38	19	57	
<b>Linfoma de células T</b>				
Discordantes	2 (28,6%)	0 (0%)	2 (20%)	0,094
Total	7	3	10	
<b>Linfoma folicular</b>				
Discordantes	1 (3,7%)	0 (0%)	1 (2,1%)	0,308
Total	27	20	47	

BA = biópsia por agulha grossa, BC = biópsia cirúrgica, Linfoma de Hodgkin, PLN = Linfoma de Hodgkin, predominância linfocítica nodular.

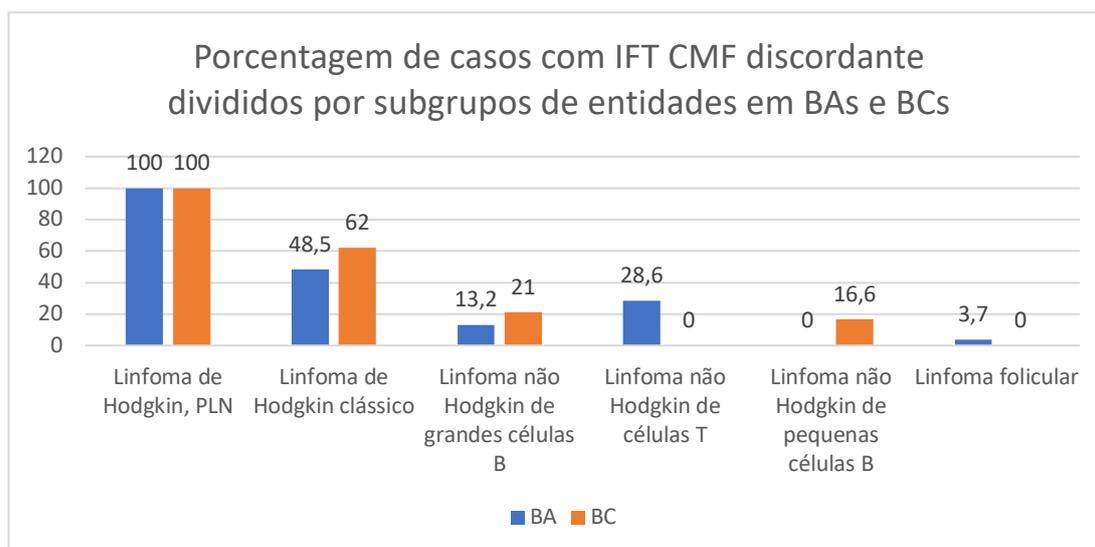
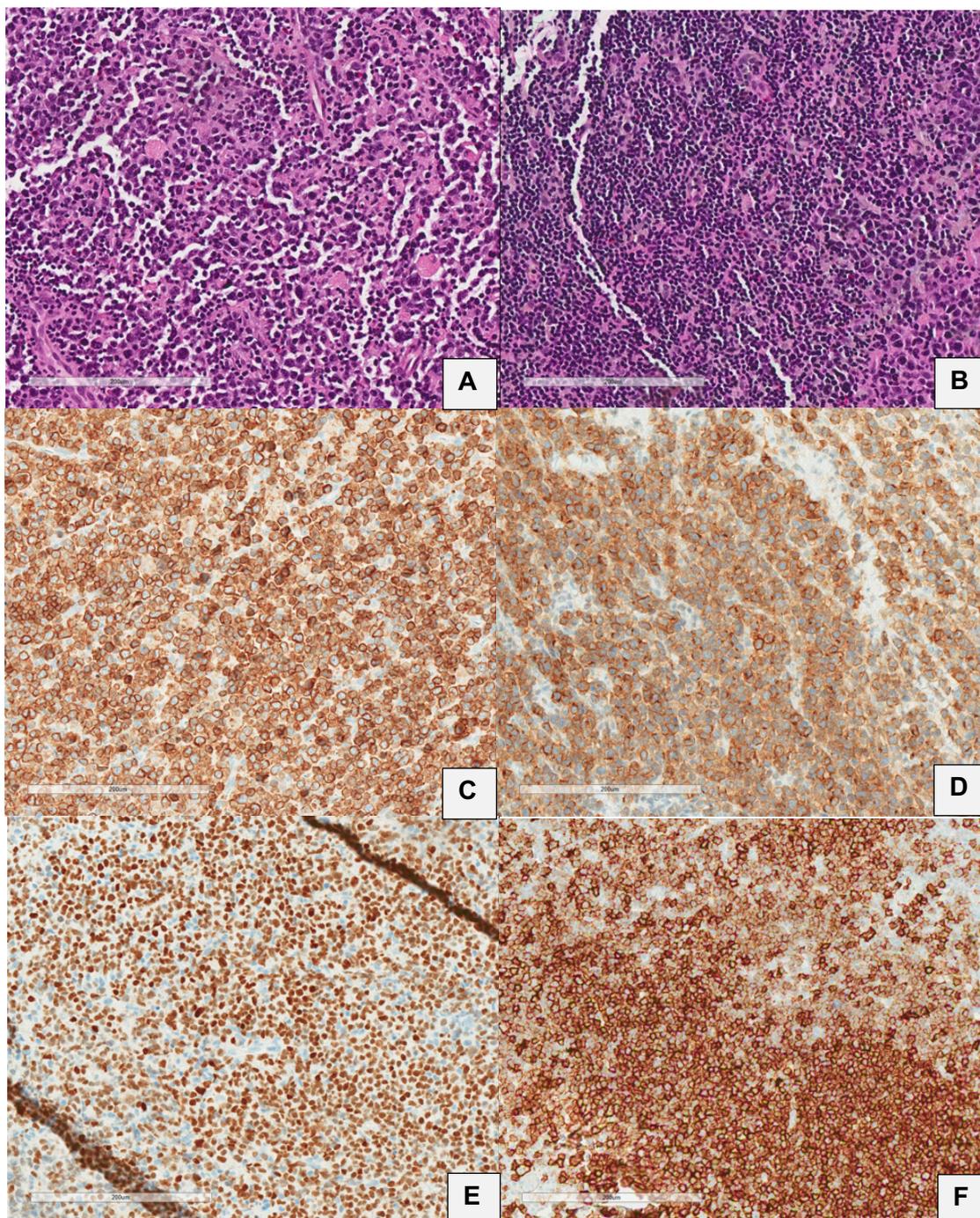


Figura 16 - Porcentagem de casos com IFT CMF discordante distribuídos entre os diferentes subgrupos de entidades em materiais de BA e BC. BA = biópsia por agulha grossa, BC = biópsia cirúrgica, Linfoma de Hodgkin, PLN = Linfoma de Hodgkin, predominância linfocítica nodular.

Casos em que a IFT CMF teve resultado suspeito (4 de 237) ou que mais de uma população linfoide anômala foi encontrada (4 de 237), foram considerados parcialmente concordantes com o diagnóstico do HE + IHQ e corresponderam a 3,4% dos casos. A imagem 9 ilustra o exemplo de um caso

em que duas populações linfoides neoplásicas foram identificadas pelo exame de IFT CMF. O componente de linfoma de baixo grau foi obscurecido na biópsia pelo componente de linfoma agressivo, que era o predominante. Após o resultado da IFT CMF o componente de pequenas células pode ser identificado na biópsia também.



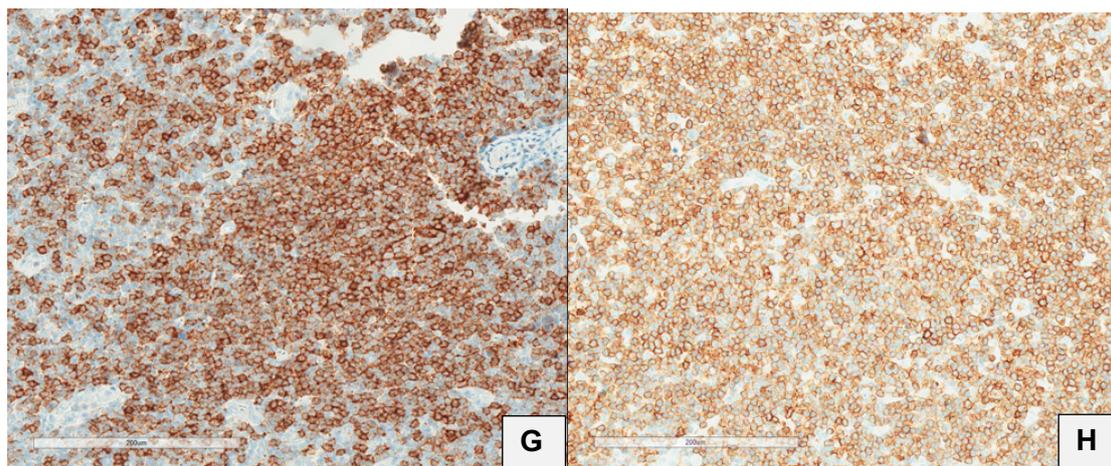


Imagem 9 – Caso 459 – Linfonodo inguinal. Linfoma/ leucemia de células T do adulto (ATLL) + linfoma linfocítico/ LLC. A) H&E mostrando o componente agressivo (ATLL). B) H&E mostrando componente de baixo grau (LLC) à esquerda e componente agressivo (ATLL) à direita. C) CD3, D) CD25, E) FOXP3 positivos no componente de ATLL. F) CD20, G) CD23 e H) CD5 positivos no componente de LLC.

4) Influência da qualidade da amostra (comprimento total e número de fragmentos) e do calibre da agulha utilizada na BA no desempenho diagnóstico

O comprimento total dos fragmentos no grupo de DD = 4 (subclassificação completa) variou de 0,9 a 13,5 cm, com média de 5,1 cm e mediana de 4,4 cm. Já no grupo de DD diferente de 4 (não permitiu subclassificação completa) variou de 1,4 a 9,3 cm, com média de 4,2 cm e mediana de 3,9 cm.

O número de fragmentos no grupo de DD = 4 (subclassificação completa) variou de 2 a 12, com média de 4,8 e mediana de 4. Já no grupo de DD diferente de 4 (não permitiu subclassificação completa) variou de 2 a 7 com média de 4,1 e mediana de 4.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a distribuição do comprimento total dos fragmentos ( $P=0,161$ ) e a distribuição do número de fragmentos ( $P=0,139$ ) em relação aos grupos de desempenho diagnóstico = 4 e desempenho diagnóstico diferente de 4.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a distribuição do calibre da agulha grossa em relação às categorias de desempenho diagnóstico = 4 e desempenho diagnóstico diferente de 4 ( $P=0,243$ ). Entretanto, houve tendência a melhor performance em biópsias com agulhas mais calibradas, como mostra a figura 17.

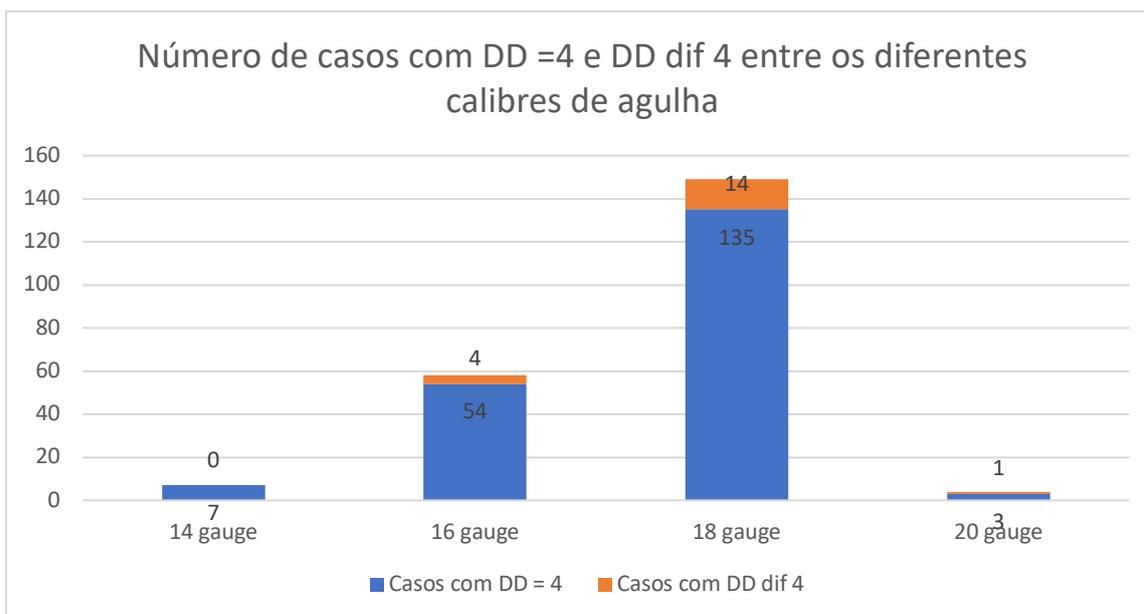


Figura 17 - Distribuição do número de casos com desempenho diagnóstico (DD) igual a 4 e desempenho diagnóstico (DD) diferente de 4 entre os diferentes calibres de agulha grossa utilizados. DD = desempenho diagnóstico.

5) Influência da avaliação de representatividade do material por um patologista durante o procedimento no desempenho diagnóstico de BAs e BCs

Em 270 casos dos 353 casos internos (76,5%) foi realizada avaliação intraoperatória/ intraprocedimento da adequabilidade do material.

No grupo de BAs, 15 dos 170 casos (8,8%) submetidos a avaliação intraprocedimento de adequabilidade tiveram desempenho diagnóstico diferente de 4, comparados com 4 dos 48 casos (8,3%) que não tiveram avaliação intraprocedimento  $P=0,914$ .

No grupo de BCs, 3 dos 100 casos (3%) submetidos a avaliação

intraoperatória de adequabilidade tiveram desempenho diagnóstico diferente de 4, comparados com 4 dos 158 (2,5%) que não tiveram avaliação intraoperatória  $P=0,825$ .

Não foi observada diferença estatisticamente significativa no desempenho diagnóstico entre os casos com avaliação intraoperatória/ intraprocedimento e os casos sem avaliação em BAs e BCs.

6) Influência do sítio anatômico (superficial ou profundo) no desempenho diagnóstico das BAs

Entre as 141 BAs de sítios anatômicos profundos, em 13 (9,2%) não foi possível subclassificação completa (DD diferente de 4), em comparação com 6 das 77 (7,8%) BAs de sítios anatômicos superficiais  $P=0,715$ .

7) Avaliação da concordância dos subgrupos de entidades no material BA com os dados clínicos

### *Benigno*

Ao todo, 15 pacientes tiveram o diagnóstico de doença não neoplásica / reacional. A apresentação clínica do grupo no geral foi considerada concordante, com exceção de 2 pacientes (13,3%) cujos dados se encontram na tabela 28 a seguir:

Tabela 28 - Resumo dos dados clínicos dos pacientes com apresentação discordante no grupo de benignos.

Diagnóstico	Idade	Sexo	Apresentação clínica	Sítios envolvidos	Distribuição da doença	SUV	Tamanho
DLPT não-destrutiva EBV +	64	F	Fortemente sugestiva de linfoma	nodal e extranodal	mais de uma região	22,4	3,8
Tuberculose	50	F	Sugestiva de linfoma	nodal e extranodal	mais de uma região	8,4	2,2

DLPT não-destrutiva EBV+ = doença linfoproliferativa pós-transplante não-destrutiva positiva para o vírus Epstein-Baar, F = feminino, SUV = *standard uptake value*.

### *Linfoma de Hodgkin clássico*

Ao todo, 47 pacientes tiveram o diagnóstico de linfoma de Hodgkin clássico. A apresentação clínica do grupo, no geral, foi considerada concordante, chamando a atenção para dois pacientes (4,3%) cujos dados se encontram na tabela 29 a seguir:

Tabela 29 - Resumo dos dados dos pacientes com peculiaridades clínicas no grupo do LHc.

<b>Diagnóstico</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Apresentação clínica</b>	<b>Sítios envolvidos</b>	<b>Distribuição da doença</b>	<b>SUV</b>	<b>Tamanho</b>	<b>Antecedente</b>
LHc	25	M	Sugestiva de linfoma	nodal	mais de uma região	2,4	0,9	LHc
Richter - LHc	77	M	Fortemente sugestiva de linfoma	nodal	disseminada	24,5	5	LLC

LHc = Linfoma de Hodgkin clássico, Richter – LHc – Síndrome de Richter com transformação para linfoma de Hodgkin clássico, SUV = *standard uptake value*, M = masculino, LLC = leucemia linfocítica crônica/ linfoma linfocítico.

### *Linfoma de Hodgkin, predominância linfocítica nodular*

Apenas 1 paciente compôs este grupo, sexo masculino, 33 anos. A apresentação clínica foi considerada sugestiva de linfoma. A doença acometia predominantemente sítios nodais, com mais de uma região anatômica acometida (linfonodomegalias cervicais e axilares). O estadiamento clínico foi IIIA. Não foi realizado exame de PET CT e o linfonodo submetido a biópsia mediu 3,9 cm. A clínica foi considerada concordante.

### *Linfoma B de pequenas células*

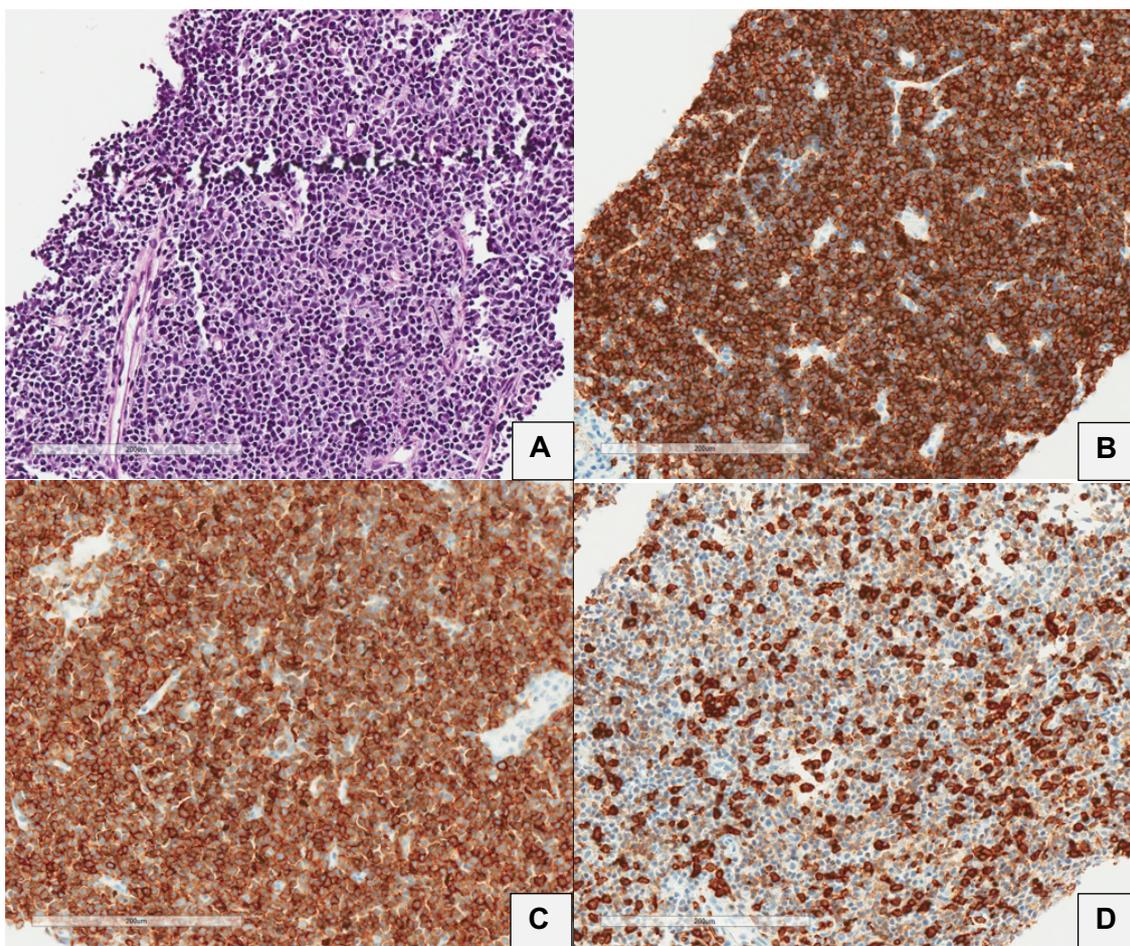
Ao todo, 21 pacientes tiveram o diagnóstico de linfoma B de pequenas células. A apresentação clínica do grupo, no geral, foi considerada concordante, chamando a atenção para 3 pacientes (14,3%) cujos dados se encontram na tabela 30 a seguir.

A imagem 10 ilustra um exemplo de linfoma linfocítico/ LLC acelerada e a imagem 11 ilustra um exemplo de linfoma linfocítico/ LLC com extensa reação granulomatosa associada.

Tabela 30 - Resumo dos dados dos pacientes com peculiaridades clínicas no grupo dos linfomas B de pequenas células.

Diagnóstico	Idade	Sexo	Apresentação clínica	Sítios envolvidos	Distribuição da doença	SUV	Tamanho	KI67
LLC com extensa reação granulomatosa	60	M	Fortemente sugestiva de linfoma	nodal e extranodal	mais de uma região	12,3	3,9 cm	20%
Linfoma de células do manto	64	M	Fortemente sugestiva de linfoma	nodal	mais de uma região	15,4	2,8 cm	40%
LLC acelerada	58	F	Fortemente sugestiva de linfoma	nodal	mais de uma região	11,5	6 cm	30%

LLC = leucemia linfocítica crônica/ linfoma linfocítico, SUV = *standard uptake value*, M = masculino, F = feminino.



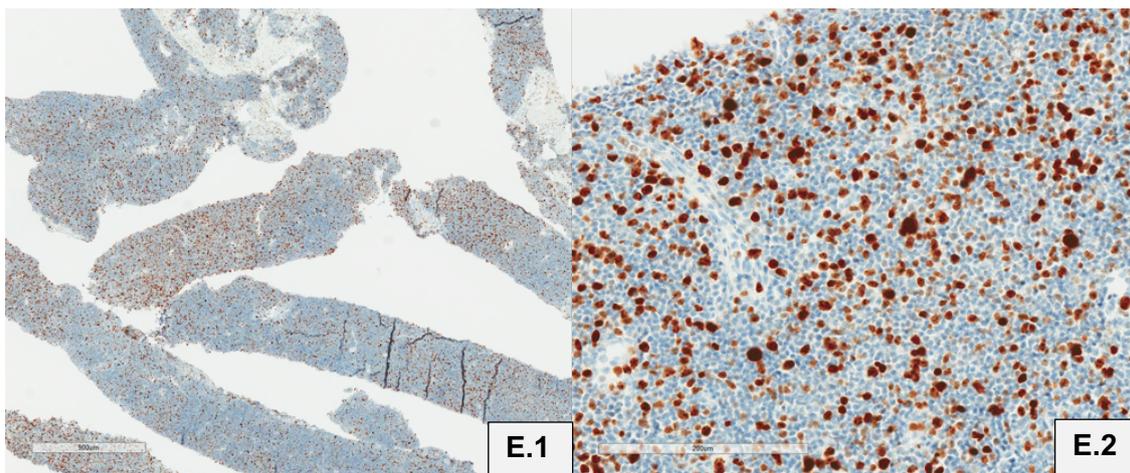


Imagem 10 – Caso 167 – Linfonodo retroperitoneal - Linfoma linfocítico/ LLC acelerada. A) H&E mostrando proliferação linfoide com aumento do contingente de células grandes. B) CD20, C) CD23, D) CD5 positivos nas células neoplásicas. E.1) KI67 em menor aumento mostrando a distribuição e expansão dos centros de proliferação. E.2) KI67 em maior aumento em um centro de proliferação.

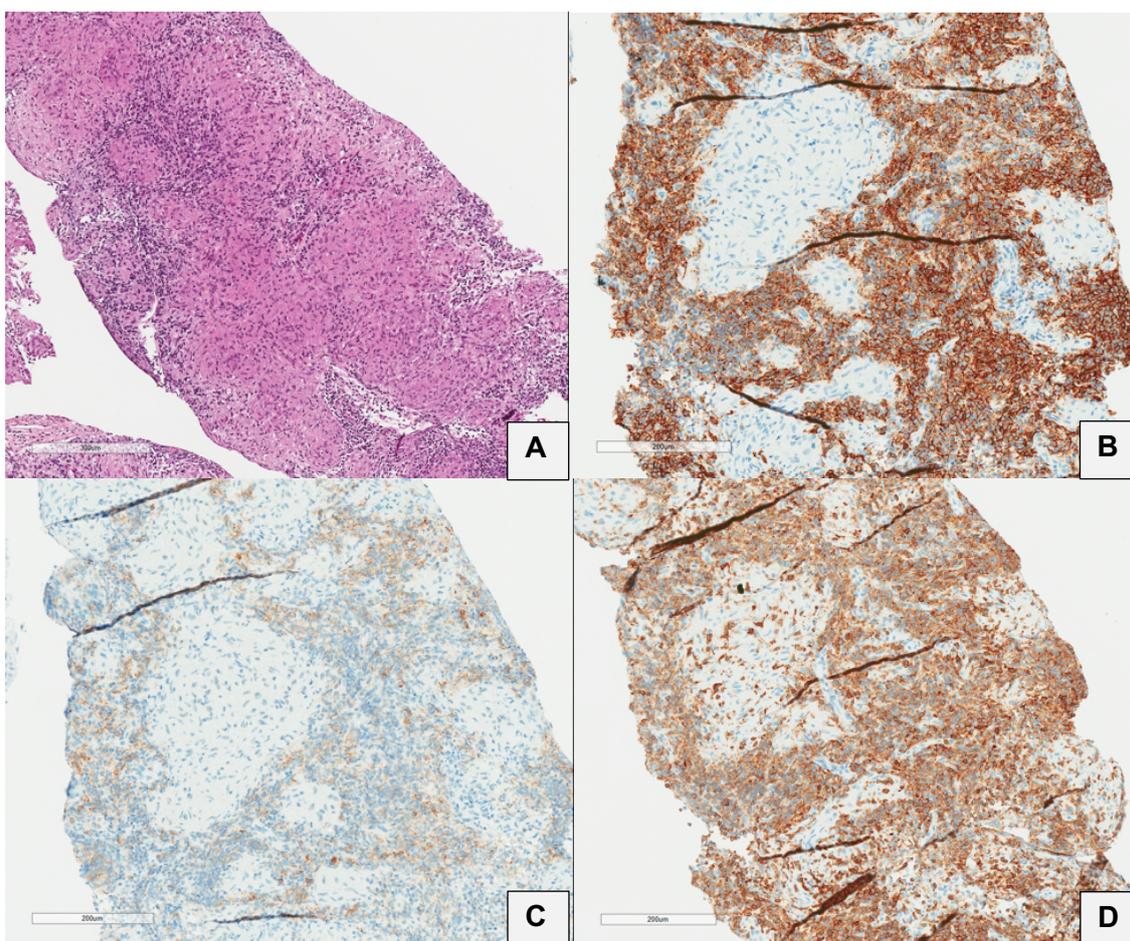


Imagem 11 – Caso 46 – Linfonodo abdominal. Linfoma linfocítico com extensa reação granulomatosa associada. A) H&E mostrando reação granulomatosa mascarando proliferação de pequenos linfócitos. B) CD20 positivo nos linfócitos pequenos, assim como o CD23 (C) e o CD5 (D).

### *Linfoma B de grandes células*

Ao todo, 62 pacientes tiveram o diagnóstico de linfoma B de grandes células. Por ser composto por entidades que, embora parecidas do ponto de vista histológico, apresentam significativas diferenças clínicas e epidemiológicas, este grupo foi subdividido em outros 3 grupos para ser melhor analisado: linfoma difuso de grandes células B primário do mediastino, linfoma B de alto grau e demais linfomas de grandes células B.

#### *Linfoma difuso de grandes células B primário do mediastino*

Este grupo é composto por 15 pacientes e a clínica do grupo foi considerada concordante.

#### *Linfoma B de alto grau*

Este grupo é composto por 5 pacientes e a clínica do grupo foi considerada concordante.

#### *Demais linfomas de grandes células B*

Este grupo é composto por 42 pacientes. A clínica do grupo no geral foi considerada concordante. Apenas uma paciente (2,4%) chamou a atenção devido à captação um pouco mais baixa no PET CT (SUV = 5,2 na lesão submetida a biópsia), entretanto, o exame foi realizado em fase posterior à biópsia e havia lesões mais captantes em outras topografias diferentes da que foi abordada, com SUV de 6,6. Do ponto de vista morfológico, não havia nenhuma peculiaridade que justificasse a associação com uma captação mais baixa no PET-CT. A imagem 12 ilustra exemplo de linfoma difuso de grandes células B, subgrupo imuno-histoquímico não centro germinativo com baixa captação no PET CT.

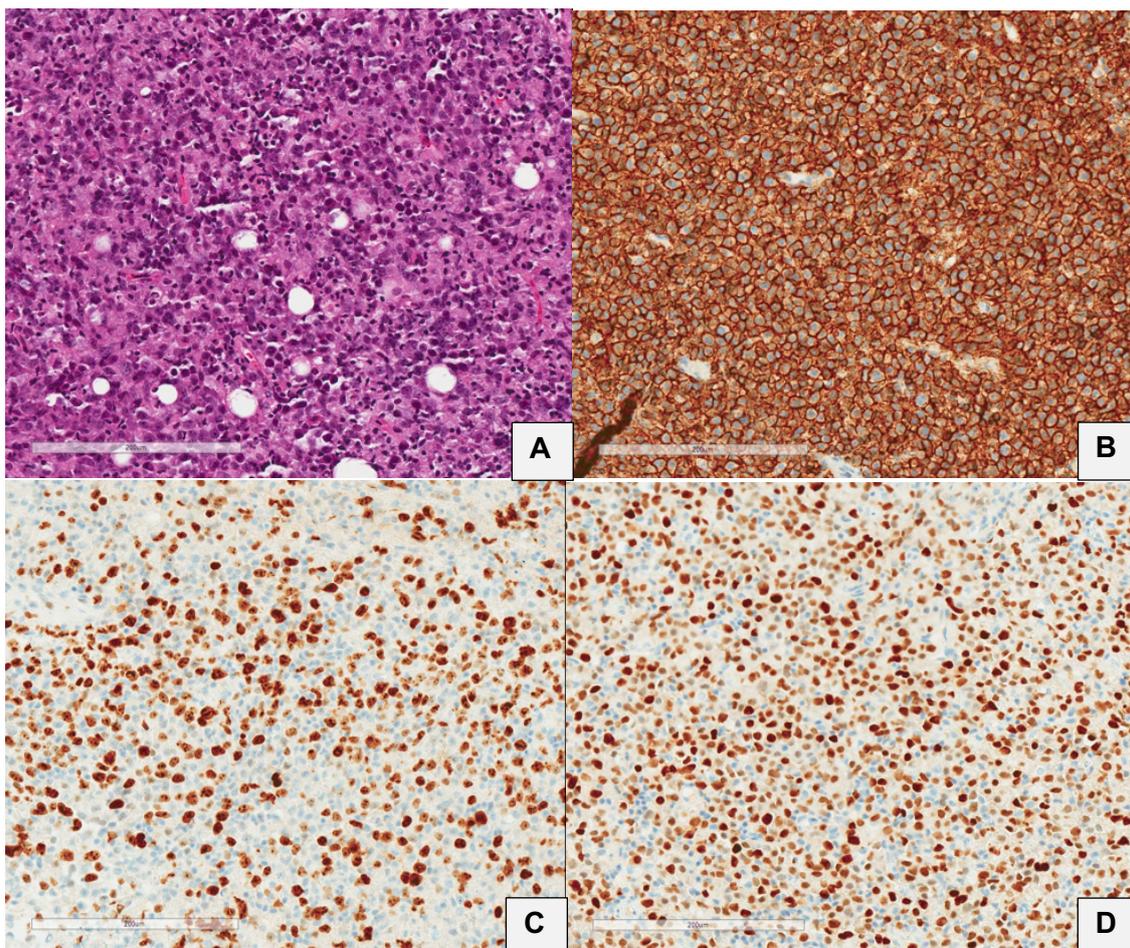


Imagem 12 – Caso 322 – Linfonodo inguinal. Linfoma difuso de grandes células B, subgrupo imuno-histoquímico não centro germinativo com baixa captação no PET-CT. A) H&E mostrando proliferação de células grandes. B) CD20, C) Ki67 – alto e D) MUM1 positivos.

#### *Linfoma de células de tamanho intermediário/ morfologia blastoide*

Ao todo, 22 pacientes tiveram o diagnóstico de linfoma de células de tamanho intermediário/ morfologia blastoide. A clínica do grupo foi considerada concordante.

#### *Linfoma de células T*

Ao todo, 10 pacientes tiveram o diagnóstico de linfoma de células T. A clínica do grupo foi considerada concordante. A imagem 13 ilustra exemplo de linfoma de células T periféricas, SOE.

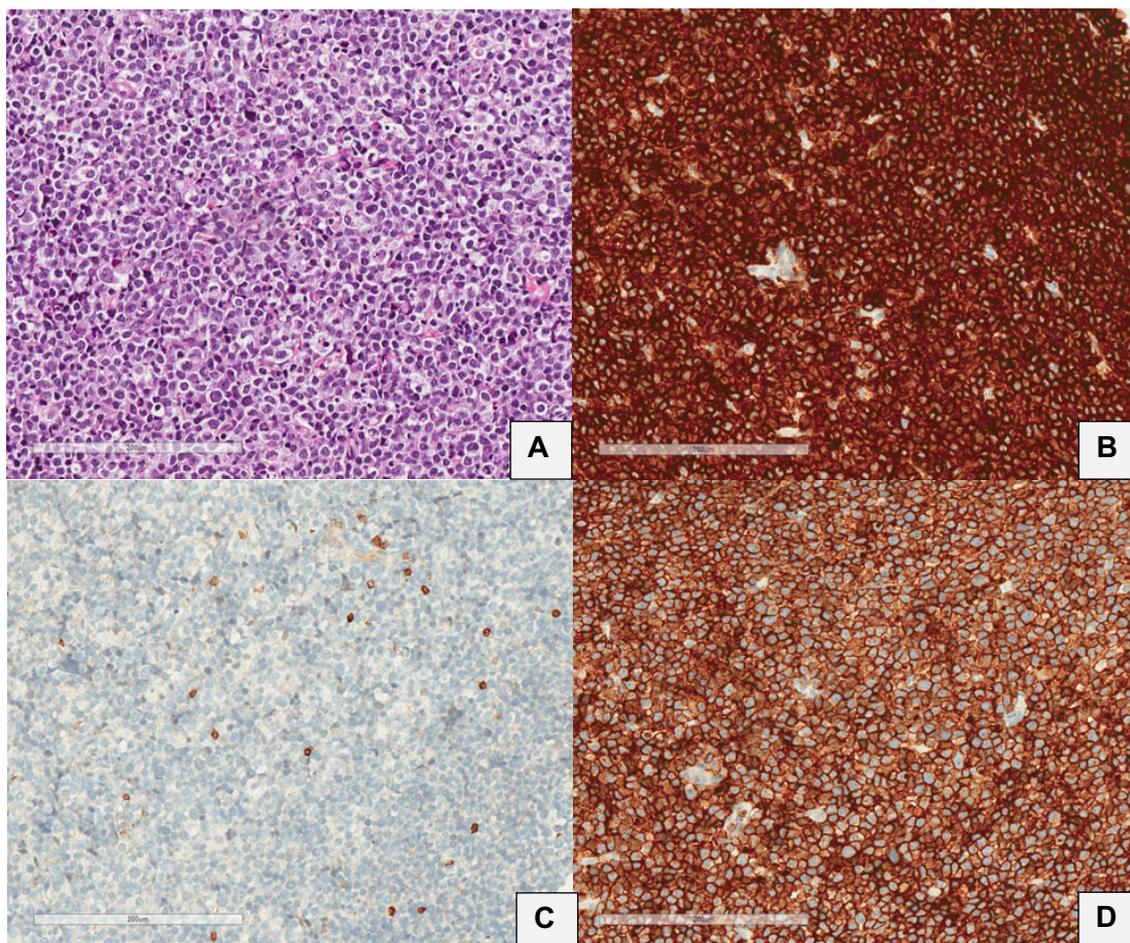


Imagem 13 – Caso 482 – Linfonodo inguinal - Linfoma de células T periféricas SOE. A) H&E. Expressão de B) CD3 e D) CD4. Perda de expressão de C) CD7.

### *Linfoma folicular*

Ao todo, 39 pacientes tiveram o diagnóstico de linfoma folicular, sendo 25 pacientes (64,1%) com diagnóstico de linfoma folicular grau 1/2 e 14 pacientes (35,9%) com diagnóstico de linfoma folicular grau 3. Estes dois subgrupos foram analisados separadamente.

### *Linfoma folicular grau 1/2*

O grupo é composto por 25 pacientes. A clínica do grupo foi considerada discordante em 7 pacientes (28%), baseada principalmente no SUV da lesão, mais alto do que o esperado para esta categoria, estando maior do que 9 nestes casos. Após a revisão destas amostras, não foi encontrada nenhuma

peculiaridade morfológica que pudesse justificar a associação com maior captação ao PET CT. A imagem 14 mostra exemplo de linfoma folicular grau 1 com captação ao PET CT mais alta do que o esperado (SUV = 10,1).

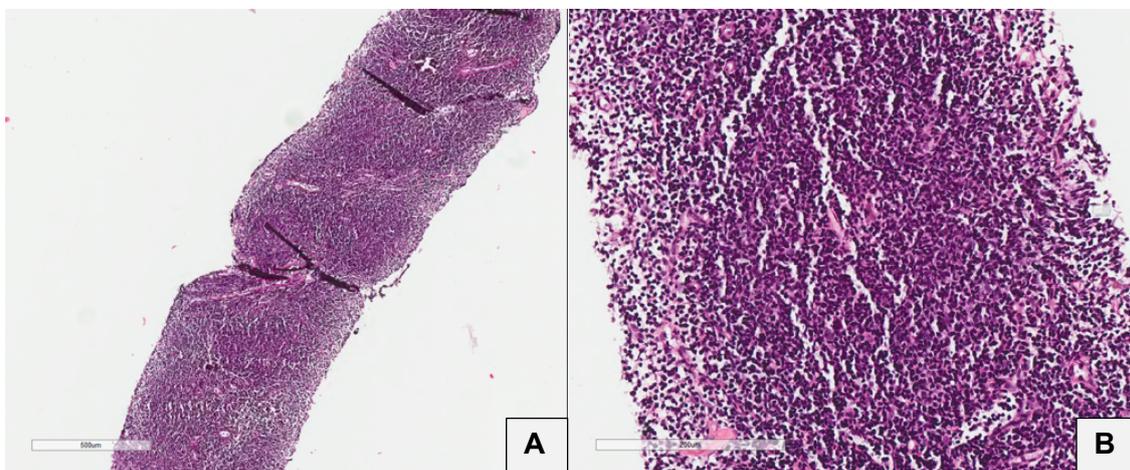


Imagem 14 – Caso 112 – Linfonodo cervical - Linfoma folicular grau 1 com captação ao PET CT mais alta do que o esperado (SUV = 10,1). A) H&E menor aumento, mostrando a arquitetura nodular. B) H&E maior aumento, destacando nódulo composto predominantemente por linfócitos pequenos.

### *Linfoma folicular grau 3*

O grupo é composto por 14 pacientes. A clínica do grupo foi considerada discordante em 2 pacientes (14,3%), baseada principalmente no SUV da lesão, mais baixo do que o esperado para esta categoria, sendo 2,7 em um paciente e 5,5 no outro. Nestes dois casos, a lesão era pequena, uma com 1,5 cm e outra com 2,0 cm. A imagem 15 ilustra exemplo de linfoma folicular grau 3A com baixa captação ao PET-CT (SUV = 2,7).

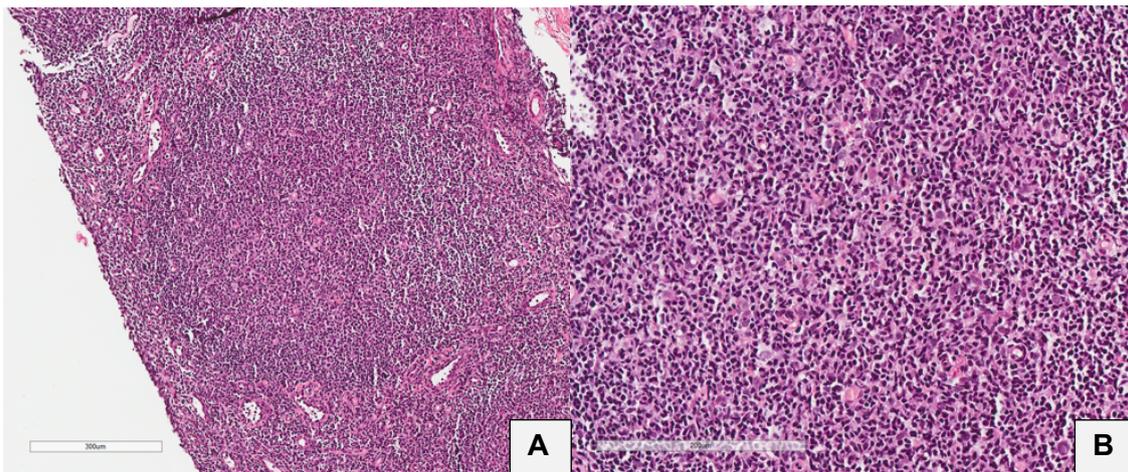
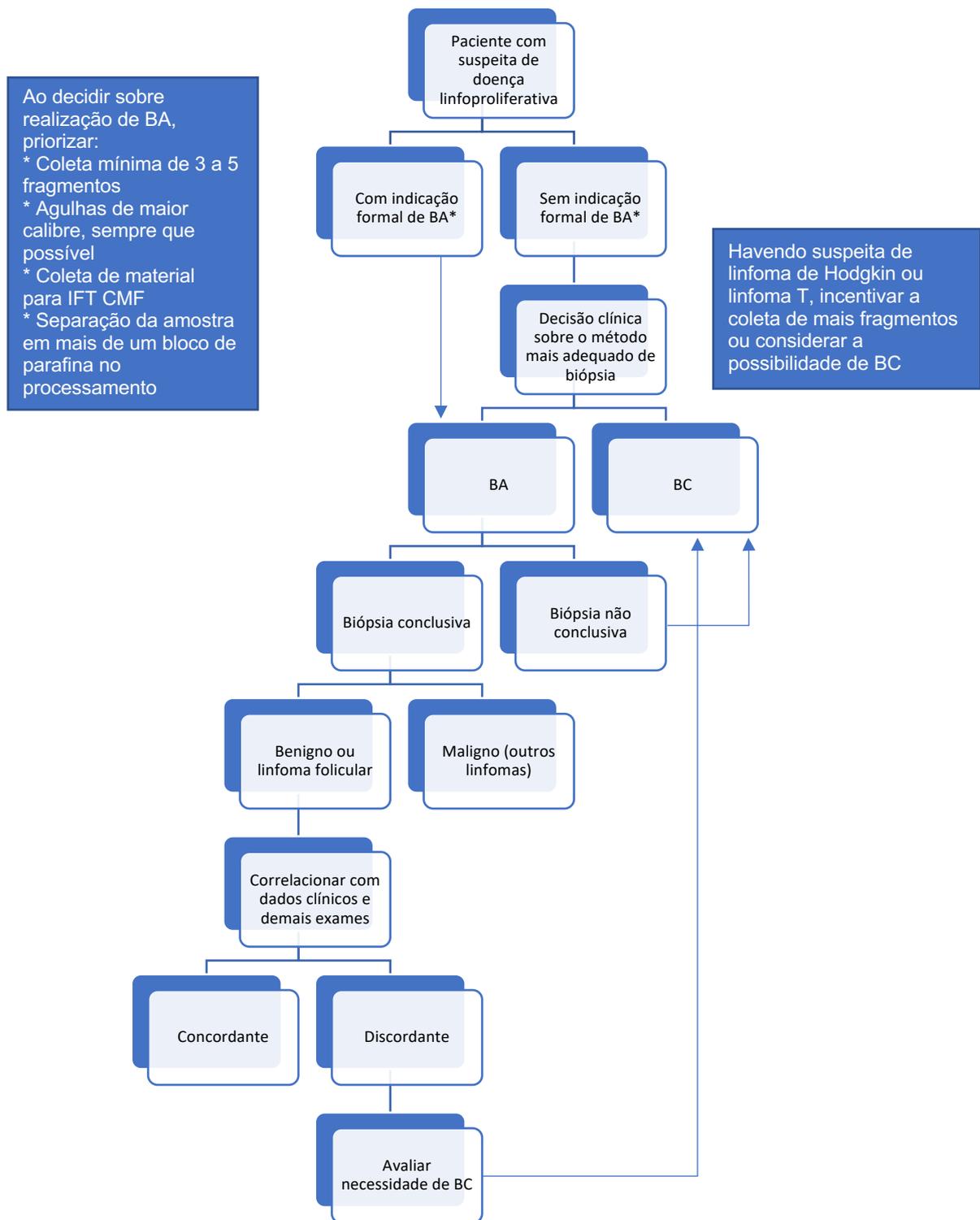


Imagem 15 – Caso 405 – Linfonodo cervical. Linfoma folicular grau 3A com baixa captação ao PET CT (SUV = 2,7). A) H&E menor aumento mostrando arquitetura nodular. B) H&E maior aumento destacando nódulo com numerosas células grandes.

8) Consolidação de protocolo geral de abordagem diagnóstica e de manejo da amostra do paciente com suspeita de doença linfoproliferativa para otimização da qualidade e quantidade de material disponível para análise

A experiência adquirida permitiu a proposição de algoritmo com o objetivo de otimizar a realização das biópsias e dos métodos auxiliares para o diagnóstico dos linfomas (figura 18).



\* São consideradas indicação formal de BA: 1) sítio de biópsia profundo, 2) paciente com diagnóstico prévio de linfoma ou 3) paciente sem condições clínicas para realização de biópsia cirúrgica.

Figura 18 - Algoritmo geral de abordagem diagnóstica e de manejo da amostra do paciente com suspeita de doença linfoproliferativa.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Geral

Este estudo teve como objetivos principais avaliar e comparar a capacidade diagnóstica de BA e BC, bem como avaliar a aplicabilidade dos critérios da classificação das doenças linfoproliferativas segundo a OMS 2017 em amostras de BA.

Aqui foi utilizado o termo “capacidade diagnóstica” ao invés de “acurácia”, como é utilizado em outros trabalhos, por ser considerado este segundo termo inadequado para a situação apresentada, já que não se trata da validação de um método diagnóstico em relação ao seu padrão-ouro. A excelência diagnóstica em hematopatologia depende da possibilidade de avaliação dos critérios definidores de entidades, de acordo com a OMS 2017, em cada paciente, baseados na integração de dados clínicos, anatomopatológicos, imunofenotípicos e moleculares. Para isso é essencial a obtenção de tecido. A comparação realizada neste estudo foi entre métodos diferentes de obtenção de tecido (BA e BC), em grupos distintos de pacientes, levando-se em consideração a proporção de casos em que foi possível firmar um diagnóstico com segurança em cada grupo. Como controle de qualidade dos diagnósticos dessa casuística foram utilizados dados clínicos e de evolução, quando presentes, exames de imagem, bem como dados referentes a outras biópsias do mesmo paciente.

Na casuística total estudada, a capacidade diagnóstica geral com subclassificação completa na biópsia ao diagnóstico, seja ela BA ou BC foi de 94,5%, sendo que, em 97,5% dos casos, apesar de não ter sido possível

subclassificação completa, as informações obtidas foram suficientes para permitir o início do tratamento.

Quando analisadas separadamente amostras internas (N=353) e de revisão de casos externos (N=123) em relação à capacidade diagnóstica, observa-se que amostras internas obtiveram maiores índices de subclassificação completa quando comparadas a amostras de revisão, conforme mostrou a tabela 15, tanto em BA quanto em BC, no entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Vale ressaltar que proporção significativamente maior das amostras de revisão (79,7%) era constituída por BC quando comparada às amostras internas (45,3%). A diferença no tamanho e composição dos grupos pode ter interferido na análise estatística e prejudicado a comparação objetiva entre estes dois tipos de material.

Foi observado que, ao longo dos anos englobados neste estudo, houve tendência de aumento de BAs em relação às BCs, como demonstra a figura 4. Esta tendência também já foi descrita na literatura e muitas instituições de diversos países experimentam a mesma situação<sup>(12, 46, 49-51, 59, 65, 68)</sup>. O aumento proporcional crescente das BAs ao longo dos anos não se refletiu em menor desempenho diagnóstico no período. Após tendência inicial de aumento do número de casos em que não foi possível fazer diagnóstico completo com subclassificação em entidades, estes diminuíram e mantiveram-se estáveis. Pode-se inferir que o observado se deva, ao menos em parte, à experiência educativa adquirida da equipe multidisciplinar treinada ao longo do tempo, que se adaptou à maior demanda por este tipo de amostra e otimizou os procedimentos de coleta, processamento, solicitação de exames complementares e interpretação dos achados no material obtido.

É interessante ressaltar que, apesar do aumento no número e proporção de BAs em nossa instituição, a grande maioria destes procedimentos (73,4%) foi realizada com alguma indicação formal (sítio de biópsia profundo, paciente com diagnóstico prévio de linfoma ou paciente sem condições clínicas para realização de biópsia cirúrgica) e estava de acordo com recomendações vigentes de organizações internacionais<sup>(34, 74-76)</sup>.

Quando comparada a composição dos grupos de BA e BC, diferenças estatisticamente significativas foram encontradas: 1) em relação à idade (os pacientes do grupo de BA são mais idosos que os pacientes do grupo de BC), algo previsível, já que este tipo de biópsia, por ser menos invasivo, costuma ser mais indicado para este grupo de pacientes; 2) em relação à topografia (maior proporção de sítios extranodais no grupo BA, quando comparado ao grupo BC), sendo que isso pode ser explicado por questões técnicas, pois, em geral, é mais fácil fazer a excisão de um linfonodo isolado do que abordar uma lesão extranodal em órgãos mais delicados, nos quais procedimento cirúrgico com biópsia aberta poderiam trazer riscos e transtornos adicionais, conforme observado, por exemplo, no pulmão e no fígado; e, por fim, 3) em relação a sítio anatômico (maior proporção de biópsias superficiais no grupo BC, enquanto no grupo BA predominaram as biópsias profundas), algo também previsível, já que um dos critérios formais de indicação de BA, conforme mencionado anteriormente, é lesão localizada em sítio anatômico profundo.

O calibre da agulha utilizada também diferiu significativamente entre os grupos de sítios anatômicos superficiais e profundos, com agulhas mais calibrosas sendo utilizadas para biópsias de sítios superficiais, onde o risco de lesão vascular ou de outros órgãos vitais é menor. O US foi usado com mais

frequência para guiar biópsias superficiais, enquanto a TC foi usada com mais frequência para guiar biópsias profundas.

Este foi o primeiro trabalho que avaliou em número razoável de pacientes e de forma integrada, a influência de múltiplos parâmetros clínicos, radiológicos, patológicos, imunofenotípicos e moleculares, a fim de esclarecer a contribuição de cada um para o desempenho diagnóstico de BAs e BCs. Outros autores já haviam citado a importância destes parâmetros com base em sua experiência individual, porém sem demonstração objetiva dos dados por meio de estudo científico <sup>(37, 59)</sup>. O fato de ter sido realizado em um único centro pode ser visto ao mesmo tempo como uma vantagem e uma limitação. Vantagem no sentido de se ter maior controle e conhecimento sobre todo o processo envolvido e suas variáveis, permitindo análise mais aprofundada sobre aspectos diversos do problema e possibilitando sugestão de algoritmo baseado em experiência. Como limitação, torna as conclusões válidas para instituições com condições semelhantes às de onde o estudo foi realizado.

A discussão a respeito dos resultados segue a seguir, separada por itens de acordo com cada um dos objetivos apresentados.

## **5.2 De acordo com os objetivos**

### **5.2.1 De acordo com os objetivos principais**

1) Avaliação da aplicabilidade dos critérios da classificação das doenças linfoproliferativas segundo a OMS 2017 em amostras de biópsia por agulha grossa

Foi possível fazer o diagnóstico completo, com subclassificação de acordo com a OMS em casos pertencentes a todos os subgrupos de entidades nos materiais provenientes de BA, o que corrobora a aplicabilidade dos critérios da

classificação das doenças linfoproliferativas segundo a OMS 2017 nestas amostras.

## 2) Comparação do desempenho diagnóstico nas biópsias cirúrgicas e biópsias por agulha grossa

Foram comparados grupos de BA (218 pacientes) e BC (258 pacientes). No grupo BA, a capacidade diagnóstica foi de 91,3%, em comparação com 97,3% no grupo BC, sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $P=0,010$ ). Quando levadas em consideração as biópsias que foram suficientes para início do tratamento, estas constituíram 95,9% das BA e 98,8% das BC ( $P=0,049$ ). Estes dados estão dentro da faixa já reportada na literatura e mostram que as BCs têm desempenho discretamente superior às BAs. No entanto, a capacidade diagnóstica das BAs pode ser considerada satisfatória. A tabela 1 na introdução traz um resumo dos principais dados referentes a trabalhos publicados neste tema, principalmente após a primeira edição da classificação dos tumores dos tecidos hematopoiéticos e linfoides pela OMS<sup>(5)</sup>.

### 5.2.2 De acordo com os objetivos secundários

#### 1) Contribuição relativa da clínica/ radiologia e dos demais exames complementares

Ao ser avaliada a contribuição relativa da clínica/radiologia, foi observado que esta informação foi considerada imprescindível para o diagnóstico em uma porcentagem significativamente maior de casos de BA (20,6%), quando comparados aos casos de BC (7,4%) ( $P<0,001$ ). Isso corrobora o que já havia sido observado em publicações anteriores que referem que o diagnóstico por BA é muito mais dependente de análise integrativa das informações a respeito dos

pacientes do que da consideração de aspectos morfológicos de forma isolada<sup>(45, 46, 56, 57, 60, 80)</sup>. A importância da disponibilidade de consulta a registros clínicos e radiológicos em prontuário eletrônico na maior parte dos centros médicos com a finalidade de permitir correlação clínico-patológica foi enfatizada por Mesa et al.<sup>(59)</sup> Os antecedentes patológicos, dados microbiológicos, informação sobre uso de medicamentos, dados epidemiológicos, distribuição da doença e grau de suspeição de linfoma foram considerados essenciais neste grupo de pacientes.

Em relação à IHQ, esta foi significativamente mais utilizada em BAs do que em BCs, sendo realizada em 96,3% das BAs e em 91,5% das BCs ( $P=0,024$ ). Este dado está de acordo com publicações prévias que afirmam ser necessário maior utilização de exames complementares para conclusão diagnóstica em amostras de BA quando comparadas a amostras de BC<sup>(40, 47, 53, 65, 68, 81, 82)</sup>. A indicação deste exame foi feita pelo médico patologista responsável pelo caso, após avaliação inicial da lâmina de H&E juntamente com os dados clínicos. A IHQ foi dispensável em casos indubitavelmente benignos após apreciação inicial desses fatores em conjunto. A IHQ foi considerada imprescindível para o diagnóstico em todos os casos em que foi realizada.

A IFT CMF também foi significativamente mais utilizada em amostras de BA, quando comparadas com amostras de BC, sendo realizada em 68,3% das BAs e em 34,1% das BCs ( $P<0,001$ ). Este resultado é decorrente de diferenças que ocorrem já no momento da biópsia. O conhecimento prévio sobre a importância deste exame no diagnóstico de neoplasias linfoides em amostras limitadas fez com que toda a equipe envolvida (clínicos, radiologistas e patologistas) já estivesse familiarizada com a indicação de coleta de material a fresco para este exame em casos de BA. Soma-se a isso, o fato de a equipe de

radiologia intervencionista ser uma equipe interna, treinada e orientada de forma homogênea. Em geral, a maior parte das BAs realizadas neste serviço são acompanhadas por um patologista para avaliar a adequabilidade do material e reforçar a orientação sobre os exames complementares recomendados em cada caso.

Por outro lado, as BCs são realizadas por um grupo heterogêneo de cirurgiões, internos e externos à instituição, que nem sempre são orientados a garantir encaminhamento de amostra à fresco para IFT CMF e que, não solicitam necessariamente de forma rotineira a avaliação do material por patologista durante o procedimento, o que torna a prática de coleta de material para IFT CMF mais heterogênea entre esses profissionais.

A IFT CMF auxiliou no diagnóstico em 66,7% dos casos em que foi realizada e foi considerada imprescindível para o diagnóstico em 10,1% dos casos, em porcentagem maior em amostras de BA (12%), quando comparada às amostras de BC (6,8%) ( $P=0,165$ ). Nesta casuística, esta diferença não foi considerada estatisticamente significativa, podendo estar vinculada a diferença no tamanho da amostra de pacientes submetidos a este exame entre os grupos de BA e BC.

A IFT CMF foi importante ao dispensar a realização de IHQ em alguns casos, confirmar a natureza neoplásica de linfoproliferações em amostras limitadas, identificar subpopulações neoplásicas menores e auxiliar na classificação de neoplasias com variações no imunofenótipo esperado. O valor da IFT CMF na complementação diagnóstica em amostras limitadas já havia sido abordado em outros estudos<sup>(39, 40, 53, 59, 65, 73, 80, 83, 84)</sup>. Todos os casos cuja IFT CMF resultou inconclusiva foram provenientes de BA, o que mostra que o

sucesso deste exame também é dependente da quantidade de tecido obtida, sendo que amostras maiores aumentam a probabilidade de obtenção de células viáveis para a análise.

Quando analisada a contribuição dos demais exames complementares (HIS EBV, FISH, pesquisa de clonalidade B e T por PCR), não houve diferença estatisticamente significativa entre a proporção de casos em que estes foram imprescindíveis para o diagnóstico em amostras de BC (17,3%) e BA (8,2%)  $P=0,050$  e isso pode ser justificado pelo fato destes exames serem indicados de acordo com determinadas características clínicas, morfológicas e imuno-histoquímicas que dependem do tipo de doença em questão e não do tipo de amostra. A abordagem multiparamétrica e as informações adicionais obtidas com outros exames complementares contribuem para melhor refinamento, segurança e complementação do processo diagnóstico, quando indicado. No entanto, análise morfológica e imunofenotípica em geral são suficientes para caracterizar a maior parte das neoplasias linfoides<sup>(62)</sup>.

Os outros exames complementares foram importantes ao demonstrar a presença de EBV em entidades relacionadas, fazer o diagnóstico de linfomas B de alto grau, fazer a caracterização molecular de neoplasias com variações morfológicas e imuno-histoquímicas e confirmar/ afastar a natureza neoplásicas das lesões com a pesquisa de clonalidade de linfócitos B e T. Interessante ressaltar que nessa casuística, pesquisa de clonalidade de linfócitos foi realizada em apenas 4 casos e isso pode ser em parte explicado pela sistemática realização de IFT CMF em casos internos, o que, muitas vezes, atua como uma alternativa para a demonstração de população neoplásica.

2) Comparação da capacidade diagnóstica dos diferentes tipos de material em diferentes subtipos morfológicos e em diferentes subgrupos de entidades

Em geral houve correspondência do subgrupo de entidades diagnosticado com sua respectiva categoria morfológica esperada, conforme mostram as figuras de 6 a 10. Por exemplo, como era de se esperar, na categoria morfológica 1 (proliferações linfoides com predomínio de pequenas células), os diagnósticos mais frequentes foram o linfoma folicular e os linfomas de células B pequenas; na categoria 2 (proliferações linfoides de células pequenas e grandes) predominou o subgrupo dos diagnósticos benignos; na categoria morfológica 3 (proliferações linfoides com predomínio de células grandes), o linfoma de grandes células B foi o diagnóstico mais encontrado; na categoria morfológica 4 (proliferações linfoides de células intermediárias/ morfologia blastoide), o subgrupo de células intermediárias/ morfologia blastoide, representados nessa casuística pelos linfomas de Burkitt, linfomas B de alto grau com morfologia blastoide e linfomas linfoblásticos foram os predominantes; e, na categoria morfológica 5 (proliferação linfóide de células grandes em meio a fundo inflamatório rico), predominou o linfoma de Hodgkin clássico.

Fato interessante foi observado com relação ao linfoma folicular, que esteve representado em todas as categorias morfológicas, mostrando que esta é uma neoplasia com grande variação na composição celular, o que por vezes pode trazer desafios no raciocínio inicial à partir de um padrão citológico específico. No entanto, seu diagnóstico não costuma ser problemático em amostras nas quais visualização arquitetural é obtida devido à sua arquitetura nodular e perfil imunofenotípico, característicos na maior parte das vezes. O

mesmo já não acontece com o linfoma de células T, outro subgrupo de entidades que esteve representado em diversas categorias morfológicas nesta casuística, contando com composição celular bastante variável e heterogênea. Nestes casos, poucas pistas se têm sobre o diagnóstico à partir de avaliação morfológica inicial, que pode mimetizar muitas outras condições benignas ou neoplásicas. O perfil imunofenotípico também costuma ser bastante variado e complexo e é de se esperar que o diagnóstico dos linfomas de células T seja desafiador em amostras limitadas, fato que será discutido em mais detalhes adiante.

A experiência adquirida com a divisão dos diagnósticos mais frequentes em cada categoria morfológica permitiu a proposição racional de painel inicial de anticorpos para exame imuno-histoquímico a ser solicitado pelo patologista de acordo com a categoria morfológica identificada na primeira avaliação da lâmina de H&E, conforme mostra a tabela 1 do item b do anexo 1 (seleção de painéis, lista de anticorpos e clones utilizados). Essa forma de abordagem inicial já havia sido utilizada com sucesso e reportada em outros serviços<sup>(37, 59)</sup>.

Considerando-se o número de casos e a porcentagem distribuída nos subgrupos de entidades em BA e BC, diferença significativa foi observada entre a porcentagem de casos benignos, linfomas de Hodgkin PLN e linfomas de células B intermediárias ou com morfologia blastoide nos dois tipos de biópsia. Casos benignos corresponderam a 6,9% das BA e 17,4% das BC ( $P < 0,001$ ), o que pode ser justificado pelo fato de BC ter sido mais realizada em lesões superficiais (79,8%), que são a distribuição preferencial de doenças benignas. Em relação aos 8 casos de Linfoma de Hodgkin PLN, 7 (87,5%) foram provenientes de BC ( $P = 0,042$ ), o que também pode ser em parte explicado pelo mesmo motivo anterior. No entanto, não pode ser afastada a possibilidade de

perda de alguns desses diagnósticos em BA, decorrente da dificuldade de se detectar essa neoplasia em amostras limitadas devido à relativa preservação arquitetural e escassez de células neoplásicas<sup>(45, 46, 53, 68)</sup>. A porcentagem de casos que se enquadraram na categoria de linfomas de células B intermediárias ou com morfologia blastoide em BA (10,1%) foi o dobro da observada em BC (5%) (P=0,039), e, novamente, essa discrepância pode ser justificada, em geral, pela distribuição mais profunda desse grupo de neoplasias, sendo sítio preferencial de utilização de BA (64,7%). Os demais subgrupos de entidades tiveram distribuição semelhante de diagnósticos nos dois tipos de material.

Levando-se em consideração a distribuição de amostras insatisfatórias entre as categorias morfológicas e subgrupos de entidades, no grupo das BAs, porcentagem maior de amostras insatisfatórias se enquadraram na categoria de proliferação de células grandes em meio a fundo inflamatório rico. Essa distribuição deixa claro que doenças heterogêneas e polimórficas ou doenças com escassez de células neoplásicas em sua composição total, representadas nessa casuística principalmente pelos linfomas de células T e linfomas de Hodgkin clássico, tiveram diagnóstico prejudicado em BAs, o que está de acordo com dados já publicados na literatura<sup>(46, 49, 53, 54, 60, 71, 85)</sup>. O linfoma de Hodgkin é uma neoplasia caracterizada pela escassez de células neoplásicas e predomínio de componente inflamatório e fibrose, o que muitas vezes prejudica a sua detecção adequada em amostras limitadas. No presente estudo, amostra de BA foi considerada insatisfatória em 9,4% dos casos de linfoma de Hodgkin clássico e em 10% dos linfomas de células T. Em estudo realizado por Groneck L et al.<sup>(45)</sup>, a porcentagem de BAs insatisfatórias em pacientes com linfoma de Hodgkin clássico chegou a 25%. No entanto, no que diz respeito aos linfomas de células

T, estudo realizado por Cohen et al<sup>(38)</sup> não encontrou maiores problemas no diagnóstico dessas neoplasias, tendo obtido capacidade diagnóstica semelhante no grupo dos linfomas de células T, quando comparado com a capacidade diagnóstica total dos diversos tipos de linfoma da casuística. A IFT CMF também tem limitações conhecidas na caracterização dessas neoplasias <sup>(19-21, 66, 86)</sup> e maior detalhamento a este respeito será trazido no item 4 (comparação do resultado e da concordância da imunofenotipagem por citometria de fluxo com o diagnóstico final entre as diferentes categorias morfológicas e subgrupos de entidades).

Nas BCs, as amostras consideradas insatisfatórias se enquadraram nas categorias de proliferação linfoide com predomínio de células pequenas e de células pequenas e grandes, tendo como principal diferencial nestes casos, linfomas de células B pequenas heterogêneos, com relativa preservação arquitetural (linfomas de zona marginal, linfomas B com diferenciação plasmocítica) e quadros reacionais. No grupo de BC, a capacidade diagnóstica não foi influenciada pela quantidade de material disponível, mas sim por questões inerentes às doenças envolvidas no diagnóstico diferencial (certo grau de atipia citoarquitetural, com dificuldade em demonstrar anormalidades de imunofenótipo). Em nenhum destes casos foi realizado exame de IFT CMF ou pesquisa de clonalidade de linfócitos por PCR, os quais poderiam ter auxiliado na identificação de uma possível população clonal de difícil caracterização pelos métodos convencionais<sup>(19, 40, 73)</sup>. No entanto, dois desses pacientes tinham história de doença autoimune ativa e um deles tinha história de imunodeficiência comum variável, situações em que, nem mesmo o achado de uma população clonal nas amostras estudadas seria suficiente para concluir o diagnóstico de

linfoma, uma vez que os critérios morfológicos não foram definidores<sup>(87-92)</sup>. Por outro lado, a ausência de uma população clonal não poderia garantir por si só a ausência de neoplasia, uma vez que os pacientes apresentavam linfonodos maiores e relativamente mais suspeitos detectados pelos exames de imagem. A biópsia foi realizada em linfonodos cervicais, que são de mais fácil acesso cirúrgico. Devido ao fato de o aspecto clínico geral não ser fortemente sugestivo de neoplasia, optou-se pelo acompanhamento desses pacientes. A capacidade diagnóstica não foi influenciada pela quantidade de material disponível neste grupo, mas por questões relativas à representatividade e questões inerentes às doenças envolvidas no diagnóstico diferencial. Outro fator que pode prejudicar o diagnóstico em biópsias cirúrgicas, além da possível não obtenção do linfonodo mais representativo, é a eventual obtenção de material extensamente necrótico<sup>(67)</sup>.

3) Influência da qualidade da amostra (comprimento total e número de fragmentos) e do calibre da agulha utilizada na BA no desempenho diagnóstico

Quando são analisadas as características da amostra, o número de fragmentos e o comprimento total dos fragmentos também não pareceu influenciar na capacidade diagnóstica final. Sobre este aspecto, os estudos mostram resultados discrepantes, sendo que, em alguns, estes fatores influenciaram o resultado final<sup>(55, 56, 64, 65, 73, 83)</sup> e em outros nenhuma relação foi encontrada<sup>(63, 69, 80)</sup>.

Aqui duas questões devem ser consideradas: em primeiro lugar, a baixa proporção de casos nos quais não foi possível chegar a um diagnóstico completo com subclassificação pode ter interferido na avaliação objetiva deste resultado

e, em segundo lugar, em geral, os casos analisados possuíam boa quantidade de fragmentos, com média de 4,8 fragmentos por amostra e bom comprimento total de fragmentos, com média de 5,0 cm por amostra. Estudos anteriores reportam número mínimo de 3 a 5 fragmentos, com cada fragmento apresentando entre 0,5 cm e 1,0 cm<sup>(50)</sup>, o que corresponderia a um comprimento final total dos fragmentos entre 1,5 cm a 5,0 cm como ideal para permitir diagnóstico adequado<sup>(46, 55, 56, 93, 94)</sup>.

O calibre da agulha utilizada apresentou tendência a interferir no desempenho diagnóstico, conforme mostra a figura 17, com discreta vantagem nas biópsias com agulhas mais calibrosas, dado consistente com outros estudos publicados<sup>(45, 46, 54, 66, 71, 83)</sup>. Semelhante ao observado por Skelton et al<sup>(46)</sup>, nenhuma biópsia realizada com agulha de 14 *gauge* foi inconclusiva, o que pode ser atribuído a maior quantidade de tecido obtida com agulhas deste calibre. Esse dado não teve significância estatística neste estudo, provavelmente devido à grande variação no tamanho da amostra entre os grupos de diferentes calibres de agulhas analisados.

4) Comparação do resultado e da concordância da imunofenotipagem por citometria de fluxo com o diagnóstico final entre as diferentes categorias morfológicas e subgrupos de entidades

A IFT CMF tem limitações na caracterização de neoplasias heterogêneas, com fundo inflamatório rico e com escassez de células neoplásicas, conforme é conhecido<sup>(19-21, 66, 86)</sup> e foi demonstrado no presente estudo, no qual o resultado do exame de IFT CMF foi discordante do diagnóstico final em amostras de BA em 100% dos casos de linfoma de Hodgkin PLN, 48,5% dos casos de linfoma de Hodgkin clássico e em 28,6% dos casos de linfomas T.

Em trabalho recente realizado por Gupta et al<sup>(95)</sup>, o exame de IFT CMF falhou em identificar populações neoplásicas em amostras limitadas em 91% (10 de 11 espécimes) dos casos de linfoma de Hodgkin, PLN, dado que está de acordo com o que foi encontrado nesta casuística. Já quando considerados os casos de linfoma de Hodgkin clássico, trabalho de Fromm et al<sup>(96)</sup> aponta dados diferentes dos obtidos neste estudo e refere sensibilidade de 88,8% da IFT CMF na detecção dessas neoplasias. Este trabalho não avaliou especificamente amostras pequenas e paucicelulares, nas quais o desempenho do exame poderia ser diferente. Estudos recentes mostraram que é possível diagnosticar tanto linfoma de Hodgkin, PLN quanto linfoma de Hodgkin clássico pela IFT CMF<sup>(97, 98)</sup>. No entanto, o painel imunofenotípico realizado em nosso estudo foi projetado para identificar células de Reed-Sternberg apenas a partir de 2015 e não foi projetado para identificar células neoplásicas de pacientes com linfoma de Hodgkin, PLN, o que, em parte, explica a alta taxa de discrepância.

Quando considerados linfomas de células T e NK, além da composição celular heterogênea dessas neoplasias, uma das limitações da citometria de fluxo é a falta de equivalente imunofenotípico de cadeias leves de superfície (ou seja, *kappa* e *lambda* em células B) para células T e NK. Em neoplasias de células T e NK, a demonstração de aberrações imunofenotípicas em população de interesse é um indicador mais forte de neoplasia. No entanto, a depender do contexto, nem sempre é fácil fazer caracterização de perfil aberrante devido ao amplo espectro normal/reactivo e complexidade do repertório de células T/ NK<sup>(99)</sup>. Quando essas dificuldades se sobrepõem à análise de amostras limitadas, a correta identificação destas neoplasias pode ser ainda mais desafiadora. Estudos recentes revelam dados promissores com o uso do anticorpo TRBC1,

um novo marcador para detecção de clonalidade de células T por meio de imunofenotipagem por citometria de fluxo, aumentando substancialmente a sensibilidade deste exame<sup>(100)</sup>.

Em publicação de Ranheim<sup>(37)</sup> a respeito de abordagem diagnóstica em doenças linfoproliferativas com base na experiência do autor, este cita que, com alguma frequência, existem discrepâncias entre o que é observado no tecido enviado para IFT CMF e o que é observado na histologia. Nestes casos, a análise morfológica, IHQ e testes moleculares realizados em FFPE costumam concluir o diagnóstico. Com base nisso, recomenda-se que somente seja enviado fragmento para IFT CMF em casos em que esteja disponível pelo menos 2,0 cm de comprimento total de fragmentos de BA para análise histológica.

5) Influência da avaliação de representatividade do material por um patologista durante o procedimento no desempenho diagnóstico de BAs e BCs

Neste estudo não foi observada diferença estatisticamente significativa no desempenho diagnóstico entre os casos com avaliação intraoperatória/intraprocedimento e os casos sem avaliação, tanto em BAs como em BCs. Este dado deve ser interpretado de forma cautelosa, já que essa análise fica prejudicada, em parte, pela proporção muito baixa de amostras insuficientes nesta casuística. Além disso, a presença constante do patologista na maior parte dos procedimentos realizados pela radiologia intervencionista em nosso serviço pode ter atuado de forma educativa no incentivo à obtenção sistemática de material de melhor qualidade para diagnóstico. A influência da avaliação intraprocedimento do material por um patologista não havia sido ainda avaliada de forma independente em estudos anteriores.

6) Influência do sítio anatômico (superficial ou profundo) no desempenho diagnóstico de BAs

No que diz respeito à capacidade diagnóstica, maior porcentagem de BAs de sítios anatômicos profundos (9,2%) falhou em fornecer diagnóstico final com subclassificação completa quando comparadas a BAs de sítios anatômicos superficiais (7,8%), entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa neste estudo. Publicações realizadas anteriormente mencionam superioridade, ao menos teórica, das amostras obtidas por BA de sítios anatômicos superficiais<sup>(45, 46, 56-58, 70)</sup>. Nesta casuística o calibre da agulha utilizada diferiu significativamente entre os grupos de sítios anatômicos superficiais e profundos, com agulhas mais calibrosas sendo utilizadas para biópsias de sítios superficiais, o que pode acarretar em amostras de melhor qualidade obtidas dessas localizações.

7) Avaliação da concordância dos subgrupos de entidades no material BA com os dados clínicos

A avaliação da concordância dos subgrupos de entidades no material BA com os dados clínicos (captação alta ou baixa no PET-CT, doença nodal *versus* extranodal, doença localizada *versus* disseminada, faixa etária, presença de sintomas B, entre outros) conforme foi relatada nos resultados, atuou na validação e controle de qualidade dos diagnósticos dessa casuística, tendo se mostrado concordante na maior parte das entidades. Os casos considerados como tendo apresentação clínica discordante, no geral, apresentavam alguma peculiaridade histológica ou nos dados clínicos e de imagem que justificavam a apresentação discordante, e esses achados foram relatados de forma individualizada em cada subgrupo. É interessante ressaltar que casos de

discordância entre a clínica e os achados anatomopatológicos foram frequentes no grupo de linfomas foliculares, aparentemente sem qualquer fator que justificasse a discordância, particularmente no que diz respeito a graduação. Este é um ponto passível de sofrer influência de representatividade da lesão, podendo ficar prejudicado em amostras menores. Esta questão já havia sido levantada anteriormente na literatura<sup>(20, 63, 68, 73, 101, 102)</sup>. A detecção de áreas de transformação em linfomas indolentes também pode trazer desafios. Estudo realizado por Johl et al.<sup>(68)</sup> demonstrou que a taxa de detecção de transformação foi maior em BCs (7,6%), quando comparada com BAs (3,3%), embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa. A correlação com aspectos clínicos (checar se os achados histológicos são congruentes com a apresentação), exames laboratoriais (dosagem sérica de desidrogenase láctica e beta2-microglobulina) e exames de imagem, incluindo cuidadosa avaliação por PET CT podem contribuir na redução do impacto deste problema<sup>(45, 59)</sup>.

Estudos prévios também utilizaram como parâmetros para controle de qualidade a correlação com dados clínicos e de evolução, bem como comparação com resultado posterior de biópsia cirúrgica (quando disponível, do mesmo sítio da BA ou de sítios diferentes) e validação diagnóstica por hematopatologista experiente quando a qualidade dos fragmentos de biópsia foi considerada ótima para a análise<sup>(45, 60, 66, 69)</sup>. A análise de todos os casos de proliferações linfoides por hematopatologistas (MCG e CRGCO), pode ter influenciado na alta taxa de sucesso dessa casuística, conforme preconizado como boa prática de acordo com organizações internacionais<sup>(12, 34, 74-76)</sup>. Estudo anterior realizado por Groneck et al.<sup>(45)</sup> indicou que a revisão do material por hematopatologista aumentou a capacidade diagnóstica das BAs de 93,7% para

95,9% em linfomas não-Hodgkin e de 50% para 75% em linfomas de Hodgkin.

Além da utilização destes parâmetros na validação das conclusões nos casos de BA, seria interessante também, se houvesse a possibilidade de comparar, em um mesmo paciente, estes resultados com os de uma BC. No entanto, essa avaliação ainda não foi feita de forma sistemática, já que, do ponto de vista ético, não seria aceitável submeter o paciente a dois procedimentos distintos com a mesma finalidade, aumentando possíveis riscos, transtornos e empenho de recursos. Além do mais, o desenho retrospectivo do presente estudo não permitiria a realização de tal intervenção.

Dois estudos prospectivos tentaram resolver esse problema utilizando estratégias diferentes: em um deles<sup>(53)</sup>, foi obtido espécime de microarray de tecido (TMA) simulando uma BA em 67 linfonodos ressecados cirurgicamente e o diagnóstico do TMA foi comparado ao obtido na análise do linfonodo inteiro. A acurácia diagnóstica do TMA foi de 73,8%. Em outro estudo<sup>(103)</sup>, dois fragmentos de BA foram obtidos de um linfonodo após ressecção cirúrgica em 57 casos, mas apenas um dos fragmentos foi submetido à análise anatomopatológica, enquanto o outro foi dividido, sendo metade enviada para IFT CMF e a outra metade preservada para análise molecular. A acurácia diagnóstica da BA em comparação com a análise total do linfonodo foi de 73%. Aqui alguns pontos podem ter interferido no desempenho diagnóstico final: em ambos os estudos, a quantidade de material obtida não foi a ideal, pois geralmente são recomendados pelo menos três fragmentos de BA para serem submetidos a análise histológica afim de possibilitar uma adequada interpretação diagnóstica. Ao considerar o primeiro estudo, o tamanho de um TMA é muito inferior a um fragmento sequer de BA, e, ao considerar o segundo estudo, apenas um fragmento de BA foi

analisado. A citometria de fluxo não foi realizada no primeiro estudo e não foi considerada na interpretação diagnóstica no segundo estudo, portanto, os benefícios do diagnóstico multimodal não puderam ser adequadamente avaliados. A possibilidade de se realizar uma BA após a excisão cirúrgica de um linfonodo em um estudo prospectivo, com obtenção de mais fragmentos e avaliação concomitante de dados clínicos, patológicos, imunofenotípicos e moleculares pode ser uma boa estratégia para comparar adequadamente os dois métodos.

8) Consolidação de protocolo geral de abordagem diagnóstica e de manejo da amostra do paciente com suspeita de doença linfoproliferativa para otimização da qualidade e quantidade de material disponível para análise

A experiência adquirida em associação com os dados objetivos obtidos com este trabalho permitiu a proposição de algoritmo com o objetivo de otimizar a realização das biópsias e dos métodos auxiliares para o diagnóstico dos linfomas (figura 18).

Em relação à otimização da utilização da amostra, aspecto interessante reportado por Mesa et al.<sup>(59)</sup> foi o aproveitamento das lâminas coradas em panótico durante o exame de avaliação intraprocedimento da adequabilidade do material para a realização do exame de FISH posteriormente, caso indicado. A amostra citológica obtida desta forma tem maior qualidade para a realização deste exame quando comparada com amostra de FFPE, a qual apresenta artefatos decorrentes da fixação e do efeito de truncamento dos núcleos no momento da realização dos cortes histológicos<sup>(26)</sup>. Além disso, a realização de FISH nos esfregaços citológicos seria interessante também ao permitir que maior parte do tecido fosse poupada para armazenamento ou realização de outros

exames que fossem necessários. Neste serviço o exame de FISH é realizado em cortes histológicos de FFPE e a adaptação para a realização deste exame em material citológico pode ser avaliada posteriormente em estudo de validação com esta finalidade.

Outro aspecto interessante foi observado no que diz respeito a realização de IFT CMF neste serviço. Como rotina, um dos fragmentos de tecido obtido no momento do procedimento de BA é enviado para o laboratório clínico em RPMI para a realização deste exame, o que acarreta na perda de um dos fragmentos para análise morfológica. Chi et al.<sup>(82)</sup> reportaram experiência em realizar IFT CMF pela técnica de lavagem dos fragmentos em RPMI, com posterior recuperação deste tecido para ser encaminhado para análise morfológica e encontraram concordância diagnóstica semelhante a observada no grupo que utilizou o método convencional de suspensão de células do tecido para realização de IFT CMF. Isso evita a necessidade de mais passagens de agulha para obter um número adequado de fragmentos, previne a agregação e artefatos de impregnação inespecífica de corantes devido a dissociação mecânica ou enzimática da amostra e aumenta a quantidade de tecido disponível para a análise morfológica. Mesa et al.<sup>(59)</sup> também referem a utilização desta mesma técnica, no entanto, fazem uma ressalva considerando-se a limitação em linfomas associados a acentuada esclerose, o que pode levar a aumento no número de falsos negativos pela IFT CMF, fato que já havia sido reportado em outros estudos<sup>(59, 104)</sup>. Não temos experiência com o emprego desta técnica no Hospital Sírio-Libanês e sua validação na presente instituição pode ser realizada em estudos posteriores dedicados ao tema.

Deve ser lembrado que a decisão entre BA ou BC deve ser feita em

conjunto pela equipe responsável pelo cuidado com o paciente, sendo guiada por inúmeras considerações, que incluem confiabilidade, acurácia, urgência pelo resultado, morbidade, custo-efetividade e conformidade do paciente<sup>(51, 63)</sup>. Os estudos dedicados a este tema em mais de três décadas<sup>(51, 61, 62)</sup> apontam variabilidade grande na capacidade diagnóstica de BAs, a depender da realidade de cada local e das circunstâncias em que estes procedimentos são realizados. É prudente considerar que cada centro deva estudar a possibilidade de utilização da BA como primeira linha na investigação diagnóstica em pacientes com suspeita de doença linfoproliferativa de acordo com a sua realidade, treinamento da equipe e recursos complementares disponíveis.

Centros com altas taxas de amostras não diagnósticas devem dar preferência a abordagem cirúrgica inicial até que todos os parâmetros sejam otimizados para a realização de BAs com maior segurança. Centros com disponibilidade de recursos e altas taxas de sucesso na obtenção de amostras diagnósticas por BA podem priorizar a sua realização como abordagem inicial. Da mesma forma, centros nos quais o agendamento e logística de realização de procedimento cirúrgico impõe dificuldade e atraso no acesso ao diagnóstico podem também considerar a realização de BA em primeira linha<sup>(61)</sup>.

### **5.3 Considerações finais**

A biópsia por agulha grossa demonstrou ser útil e segura no diagnóstico de proliferações linfoides no contexto da instituição em que este estudo foi realizado, sendo possível aplicar os critérios da OMS 2017 neste tipo de material, desde que consideradas suas peculiaridades. Este resultado deveu-se, ao menos em parte, à experiência educativa de uma equipe multidisciplinar treinada

ao longo do tempo para otimizar os procedimentos de coleta, processamento e avaliação do material.



## 6 CONCLUSÕES

### 6.1 De acordo com os objetivos principais:

1) Neste estudo, foi possível aplicar os critérios da classificação das doenças linfoproliferativas segundo a OMS 2017 nas amostras de BA em 91,3% dos casos.

2) As BAs obtiveram capacidade diagnóstica discretamente inferior às BCs, no entanto, apresentaram bom desempenho no diagnóstico de proliferações linfoides benignas e malignas.

### 6.2 De acordo com os objetivos secundários:

1) Proporção maior de BAs foi submetida a exames complementares e dependeu do resultado desses exames e de dados clínicos para o diagnóstico final, quando comparadas às BCs. A frequente realização destes exames e o amplo acesso às informações contidas em prontuário foram decisivos para o bom desempenho diagnóstico final nessa casuística.

2) Foi observada limitação da BA especialmente em doenças heterogêneas e polimórficas, como nos linfomas de células T periféricas e nos linfomas de Hodgkin. Havendo suspeita dessas entidades, sempre que possível, é sensato programar a obtenção de quantidade maior de material ou mesmo considerar abordagem inicial com BC.

3) A IFT CMF também apresentou dificuldade na caracterização dos casos de linfomas de Hodgkin e linfomas de células T, com maior percentual de resultados discordantes com o diagnóstico final nessas categorias.

4) O número de fragmentos, comprimento total dos fragmentos e o calibre da agulha utilizada não interferiu com a capacidade diagnóstica de forma

significativa nesta casuística.

5) Embora a capacidade diagnóstica tenha sido semelhante entre os grupos que tiveram e os que não tiveram acompanhamento do procedimento por um patologista, a presença constante deste profissional na maior parte dos procedimentos realizados na radiologia intervencionista atuou de forma educativa no incentivo à obtenção sistemática de material de melhor qualidade, com maior número de fragmentos.

6) O desempenho diagnóstico nas BAs obtidas em sítios anatômicos superficiais foi discretamente melhor do que o nas obtidas em sítios anatômicos profundos, entretanto, essa diferença não apresentou significância estatística.

7) Quando comparados os diagnósticos com as características clínicas e radiológicas para controle de qualidade de BAs, foi observada maior discrepância clínico-patológica no que diz respeito à graduação dos linfomas foliculares.

8) A experiência obtida permitiu formular algoritmo com o objetivo de otimizar a realização das biópsias e dos métodos auxiliares para o diagnóstico dos linfomas (figura 18).

## 7 ANEXOS

### 7.1 Anexo 1

#### 7.1.1 Metodologia empregada na imuno-histoquímica (IHQ) e hibridização *in situ* (HIS) no Hospital Sírio-Libanês

As técnicas de IHQ e HIS são automatizadas. No equipamento é realizada a recuperação do tecido, a aplicação do anticorpo ou sonda, reagentes para amplificação do sinal, aplicação de cromógeno para visualização de marcação, e contra-coloração.

Todas as lâminas de IHQ e HIS recebem um pequeno fragmento com resultado presumidamente conhecido e positivo, denominado como controle. Tal cuidado é importante para evitar a ocorrência de casos falso-negativos ou falso-positivos, isto é, em todas as reações a avaliação do controle é fundamental. Se ele, que tem um resultado conhecido, não obtiver o resultado esperado, é possível que a reação não tenha ocorrido adequadamente. O tecido do paciente a ser analisado preenche a outra parte da lâmina. No término do processo, os analistas de IHQ avaliam microscopicamente a qualidade do controle e encaminham as lâminas aos patologistas responsáveis.

Quando o lote de anticorpo ou da sonda é trocado ou recebido um novo frasco, é feita uma reação e avaliado o controle. Os 'lotes' e 'datas de início do uso' são registrados em uma pasta de controle de qualidade.

Após o corte histológico, as lâminas permanecem na estufa com temperaturas entre 65° e 68° C para que a parafina seja derretida e o tecido fique aderido à lâmina

As lâminas são etiquetadas por meio do Sistema Ventana-Roche, e inseridas no equipamento BenchMark Ultra para início do processamento. Os protocolos estão definidos de acordo com cada etiqueta.

Nos casos em que utiliza-se o aparelho AutostainerLink 48, as lâminas são inseridas manualmente no computador.

Os protocolos individuais por anticorpo devem ser analisados para que o equipamento seja abastecido com os kits e reagentes necessários. Caso o equipamento não seja abastecido corretamente, o mesmo emite um alarme sonoro informando qual reagente deve ser inserido.

O processamento consiste em todas as etapas de IHQ e HIS. Inicialmente, é realizada a desparafinização, a recuperação do tecido, a aplicação de anticorpo primário ou sonda, amplificadores de sinal para marcação, cromógeno para visualização e finalizando o processo, a contra-coloração.

Ao término do processamento, as lâminas são retiradas e lavadas com detergente em água corrente. São inseridas em banhos de álcool e xilol e encaminhadas ao montador de lâminas Dako.

Os analistas de IHQ avaliam os controles de qualidade de cada lâmina. Com todas as avaliações positivas, é realizado o fechamento do trabalho e as lâminas são enviadas ao patologista responsável para liberação do resultado.

#### 7.1.2 Seleção de painéis, lista de anticorpos e clones utilizados

A seleção dos painéis de imuno-histoquímica é feita de forma individualizada para cada caso após a avaliação inicial da morfologia em lâmina corada em hematoxilina e eosina (H&E) pelo patologista. De acordo com as hipóteses formuladas e seus diagnósticos diferenciais, o painel é escolhido, com

base no perfil de imunexpressão descrito pela OMS 2017<sup>(8)</sup> para cada entidade, com a finalidade de comprovar ou afastar os possíveis diagnósticos diferenciais. Em geral os painéis iniciais são baseados nas categorias morfológicas utilizadas neste trabalho, conforme mostra a tabela 1:

Tabela 1 - Painel inicial de anticorpos de imuno-histoquímica solicitado de acordo com a categoria morfológica identificada pelo patologista.

<b>Código</b>	<b>Categoria morfológica</b>	<b>Painel inicial de imuno-histoquímica</b>
1	Proliferação linfoide com predomínio de células pequenas	CD20, CD3, CD10, BCL6, BCL2, CD5, CD23, CD21, CiclinaD1, CD43, KI67
2	Proliferação linfoide de células pequenas e grandes	CD20, CD3, CD10, BCL6, BCL2, CD5, CD23, CD21, CiclinaD1, CD43, KI67, CD30, CD4, CD8
3	Proliferação linfoide com predomínio de células grandes	CD20, CD3, CD10, BCL6, BCL2, MUM1, CD5, CD30, CD21, CD23, CiclinaD1, cMYC, KI67
4	Proliferação linfoide com células de tamanho intermediário e morfologia blastoide	CD20, CD3, PAX5, CD2, CD5, CiclinaD1, CD10, BCL6, BCL2, MUM1, KI67, cMYC, TDT, CD34, CD117
5	Proliferação linfoide de células pleomórficas em fundo inflamatório rico	CD20, CD3, PAX5, CD30, CD15, CD45, KI67, CD21, CD23, ALK, CD43, MUM1, CD10, BCL6, BCL2

Após o resultado do painel inicial, na maior parte é possível concluir o diagnóstico. Em alguns casos, será necessário complementação com a finalidade de cobrir algumas entidades mais raras ou alguma particularidade específica de cada caso. Por exemplo:

- O painel 1 pode ser complementado com SOX11 em caso de linfoma de células do manto ou suspeita de linfoma de células do manto negativo para CiclinaD1.

- No painel 4, caso haja suspeita de neoplasia mieloide ou linhagens mais raras como de células dendríticas plasmocitoides blásticas, outros marcadores como MPO, CD68, lisozima, CD43, CD56, CD4, CD123 e TCL1 podem ser solicitados.

- Nos painéis 2, 3 e 5, caso haja possibilidade de neoplasia de linhagem histiocítica, pode-se adicionar marcadores como o CD68, CD163, lisozima, CD1a e S100.

- Em todos os casos em que seja observada diferenciação plasmocítica, CD138, *kappa*, *lambda*, CD19, CD56, IgM, IgG e IgG4 também podem ser solicitados.

- Em todos os casos em que haja suspeita de linfoma de células T, pode ser realizada complementação da avaliação com CD7, CD57, CD56, TIA1, Granzima B, FOXP3, CD25 e ALK.

- Em pacientes imunossuprimidos, marcadores como HHV8 e outros virais como CMV e herpesvírus simples também podem ser adicionados.

Também de acordo com a avaliação morfológica e hipótese diagnóstica formulada, o patologista responsável decide se existe ou não o benefício de pesquisa de EBV por meio de HIS nos material estudado.

A seguir lista de anticorpos e clones (IHQ) e sonda (HIS EBV) utilizados:

- 1) Hibridização *in situ* para EBV (HIS EBV) – INFORM EBER probe (Ventana)
- 2) Imuno-histoquímica

---

**Lista de anticorpos e clones**


---

AE1/AE1 - AE1/AE3&PCK26 - Ventana	CMV - CCH2+DDG9 - Dako
ALK1 - ALK-01 - Ventana	cMYC - EP121 Cell marque
Amiloide A - 115 - Abcam	Cyclin D1 - SP4R - Ventana
Annexin A1 - MRQ-3 - Cell marque	Cytokeratin (Pan) AE1/AE3 - Ventana
Bcl-2 - 124 - Ventana	FOXP3 - 236A/E7 - Abcam
Bcl-6 - GI191E/A8 - Cell marque	GATA3 - (L50-823) - Biocare
CD10 - SP67 - Ventana	Glycophorin A - GA-R2&HIR2 - Cell marque
CD138 (Syndecan-1) - B-A38 - Cell marque	Granzyme B - GRB-7
CD15 - MMA - Ventana	Herpes Simplex Virus - policlonal - Dako
CD19 - LE-CD19 / Dako	HHV-8 - 13B10 - Cell marque
CD1a - EP3622 - Cell Marque	IgA (Immunoglobulin A) - policlonal - Ventana
CD20 - L26 - Ventana	IgD (Immunoglobulin D) - policlonal - Ventana
CD21 - 2G9 - Cell marque	IgG (Immunoglobulin G) - policlonal - Ventana
CD23 - SP23 - Ventana	IgG4 - MRQ-44 - Cell marque
CD25 - 4C9 - Ventana	IgM (Immunoglobulin M) - policlonal - Ventana
CD3 - 2GV6 - Ventana	Kappa - policlonal - Ventana
CD30 - BER-H2 - Ventana	KI-67 - MIB-1 - Dako
CD34 - QBEnd/10 - Ventana	Lambda - policlonal - Ventana
CD4 - SP35 - Ventana	Lysozyme - policlonal - Cell marque
CD43 - L60 - Ventana	MUM1 - MRQ8 - Cell marque
CD45 (LCA) - RP2/18 - Ventana	Myeloperoxidase - policlonal - Cell marque
CD5 - SP19 - Ventana	p53 - DO7 - Ventana
CD56 (NCAM) - 123C3 - Ventana	p63 - 4A4 - Ventana
CD57 - NK1 - Ventana	PAX-5 - SP34 - Ventana
CD61 - 2f2 - Cell marque	PAX8 - MRQ-50 - Cell marque
CD68 - NK1 - Ventana	PD-1 (Programmed Death-1)
CD7 - SP94 - Ventana	S100 - policlonal - Ventana
CD8 - SP57 - Ventana	SOX 11 - MRQ-58 Cell marque
CD99 - O13 - Ventana	TdT - policlonal - Cell Marque
c-KIT (CD117) 9.7 - Ventana	TIA- 1 - TIA-1 / BioSB

---

## 7.2 Anexo 2

### 7.2.1 Metodologia empregada na hibridização *in situ* fluorescente no Hospital Sírio-Libanês

Com a lâmina histológica corada pela hematoxilina e eosina (HE), o patologista irá definir a viabilidade do material em relação a presença de área tumoral no tecido. O bloco de parafina é retirado do arquivo e enviado aos analistas de FISH para solicitação dos cortes em lâminas com cargas elétricas positivas (Lâminas Superfrost Plus) para execução da técnica.

A técnica de FISH é semi-automatizada. No equipamento (Hibridizer) são realizadas as etapas de digestão enzimática a 37°C, desnaturação a 75°C e hibridização a 37°C. No Banho Maria, são realizadas as etapas de pré-tratamento por calor e lavagens pós-hibridização. Os procedimentos que envolvem a desparafinização, hidratação, aplicação da sonda, e lavagens entre as etapas são realizados manualmente.

Os analistas de FISH avaliam os controles de qualidade de cada lâmina. Os sinais devem ser vivos, distintos e fáceis de interpretar. As células normais permitem efetuar um controle interno do ensaio de coloração. A não detecção de sinais nas células normais indica falha do ensaio e os resultados devem ser considerados inválidos.

### 7.2.2 Indicações de realização do exame de FISH e sondas disponíveis

Atualmente, segundo a OMS 2017<sup>(8)</sup> existe indicação de realização do exame de FISH para pesquisa de rearranjo dos genes *cMYC*, *BCL6* e *BCL2* em todos os linfomas difusos de grandes células B e nos casos com patologia

compatível com linfoma B de alto grau (antigo linfoma de células B inclassificável, com características intermediárias entre o linfoma de Burkitt e o linfoma difuso de grandes células B<sup>(6)</sup> e casos com morfologia blastoide). No Hospital Sírio-Libanês, este exame será realizado a depender da solicitação do médico assistente ou do paciente e pode ser feito de duas formas, também a depender das preferências do clínico ou do paciente:

1) Rastreio com pesquisa do rearranjo do gene *cMYC*, que, caso esteja presente, indica a realização da pesquisa do rearranjo dos genes *BCL2* e *BCL6* em etapa posterior ou;

2) Pesquisa simultânea do rearranjo dos genes *cMYC*, *BCL2* e *BCL6*.

Outras possíveis utilizações do exame de FISH realizado no Hospital Sírio-Libanês são a pesquisa do rearranjo *IGH-BCL2* t(14;18) para complementação diagnóstica em suspeitas de linfoma folicular e pesquisa do rearranjo do gene *cMYC* para complementação diagnóstica em pacientes com suspeita de linfoma de Burkitt.

Para a pesquisa dos rearranjos mencionados, as seguintes sondas são utilizadas:

- Sonda ZytoLight SPEC *MYC* Dual-break, sonda do tipo *break-apart* projetada para detectar translocações envolvendo a região cromossômica 8q24.21 que contém o gene *MYC*.

- Sonda ZytoLight SPEC *BCL2/IGH* Dual color, sonda do tipo *dual fusion* projetada para detectar translocações t(14;18)(q32.3;q21.3) envolvendo os genes *IGH* e *BCL2*.

- Sonda ZytoLight SPEC *BCL6* Dual-break, sonda do tipo *break-apart* projetada para detectar translocações envolvendo a região cromossômica 3q27.3 que contém o gene *BCL6*.

Pesquisas de outros rearranjos eventualmente solicitadas e que não são realizadas no Hospital Sírio-Libanês são encaminhadas para laboratórios parceiros. Estas incluem pesquisa do rearranjo *IGH-CCND1* t(11;14) para complementação diagnóstica em suspeitas de linfoma de células do manto, pesquisa do rearranjo do gene *IRF4* em suspeitas de linfoma de grandes células B com rearranjo do *IRF4* e pesquisa do rearranjo dos genes *DUSP22* e *P63* para estratificação prognóstica em pacientes com linfoma de grandes células anaplásicas ALK negativos.

Novamente, estes exames poderão ser realizado a depender da solicitação do médico assistente ou do paciente, de acordo com indicação pertinente baseada em cada caso.

### 7.3 Anexo 3

#### 7.3.1 Metodologia empregada para a pesquisa de clonalidade de linfócitos B e T por PCR no Hospital Sírio-Libanês

A pesquisa de clonalidade de linfócitos B e T por PCR no Hospital Sírio-Libanês é realizada em FFPE, com material sendo enviado para laboratório externo internacional, Quest diagnostics. Após o patologista responsável pelo caso avaliar o material, se for julgado necessária a realização do exame para complementação diagnóstica, será feita a escolha do bloco de parafina mais adequado e representativo da lesão de interesse. Este bloco será submetido a cortes histológicos para a confecção de lâminas em branco silanizadas. Após esta etapa, as lâminas serão enviadas ao laboratório externo, após o paciente fazer a autorização por escrito do envio do material. O método utilizado para o exame é a análise de fragmento em PCR. A tabela 1 deste anexo contém sumário da descrição dos exames realizados e especificações técnicas.

Tabela 1 – Descrição e especificação técnica do exame realizado para pesquisa de clonalidade de linfócitos B e T.

Descrição	Material para envio	Documentos necessários	Temperatura para transporte	Estabilidade	Método
Painel de clonalidade B (IGH, IGK), PCR	FFPE 08 lâminas (+) não coradas	Laudo AP	Temperatura ambiente.	5 anos	Reação em cadeia de polimerase (PCR) • Análise de fragmento
Painel de clonalidade T (TCRB, TCRG), PCR	FFPE 08 lâminas (+), não coradas	Laudo AP	Temperatura ambiente.	5 anos	Reação em cadeia de polimerase (PCR) • Análise de fragmento

Após o resultado do teste ser emitido, a equipe de assessoria científica e o patologista responsável pelo caso faz a análise e a correlação com os achados

anatomopatológicos e é realizado o contato com o médico assistente do paciente.

### 7.3.2 Indicações de realização da pesquisa de clonalidade B e T por PCR

A pesquisa de clonalidade B e/ ou T por PCR tem sua realização indicada em casos em que, após análise conjunta dos dados clínicos, anatomopatológicos e de IFT CMF, quando disponíveis, não é possível se chegar a uma conclusão definitiva sobre presença ou não de neoplasia linfóide em determinada amostra. Dentro do contexto apropriado, é um importante exame de suporte ao diagnóstico.

## 7.4 Anexo 4

### 7.4.1 Metodologia empregada para a realização de IFT CMF multiparamétrica (realizada no laboratório *Fleury*)

Preparação da suspensão tecidual:

Um pedaço fresco de linfonodo/massa mediastinal é alocado em placa de Petri contendo 5 mL de RPMI. O tecido é delicadamente fragmentado com uma pinça e desagregado mecanicamente com uma vareta de vidro. Em seguida, o homogenato é filtrado e centrifugado durante 5 min a 540g. O sedimento celular é lavado em 4 ml de PBS e ressuspenso em 0,5 ml de RPMI.

Estudos imunofenotípicos:

Alíquotas de amostra de suspensão de tecido ( $2 \times 10^6$  células em 50–100  $\mu$ L por teste) são coradas com quantidades saturantes de anticorpos monoclonais (ACm) direcionados contra marcadores de superfície celular usando uma técnica de imunofluorescência direta de coloração e lavagem.

Inicialmente, um único tubo de oito cores para triagem de linfomas não-Hodgkin B e T é realizado em todos os casos: CD20-pacific blue (PacB, clone 2H7, Biolegend, San Diego, CA, EUA) mais CD4-PacB (clone RPA-T4, Becton-Dickinson (BD) Pharmigen, San Jose, Califórnia, EUA); CD45-V500 (clone HI30, BD Horizon); CD8– isotiocianato de fluoresceína (FITC, clone RPA-T8, BD Pharmigen) mais lambda-FITC (policlonal, Cytognos, Salamanca, Espanha), CD56-ficoeritrina (PE, clone NCAM16.2, BD Biosciences) mais kappa-PE (policlonal, Cytognos); CD3 – proteína clorofila peridina (PerCP-Cy5.5, clone SK7, BDB); CD19 – PE-Cy7 (clone SJ25C1, BD Pharmigen); CD5–aloficocianina

(APC, clone UCHT2, BDB) e CD38–APC-H7 (clone HB7, BDB). Se o tubo de rastreio linfoide for positivo, é realizado um painel ACm completo para subclassificação de linfoma de células B ou linfoma de células T.

Se o tubo de triagem linfoide for negativo, um segundo tubo é realizado para triagem de linfoma de Hodgkin clássico, composto por: CD15-PacB (clone 80H5, Immunotech, Marselha, França), CD45-V500 (BDB), CD30-FITC (clone Ber-H83, BDB), CD64-PE (clone 22, Immunotech), CD20-PerCP-Cy5 (clone 2H7, BD Pharmigen), CD95-APC (clone DX2, BDB), CD40-PE-Cy7 (clone 5C3, BD Pharmigen) e CD3-APC-H7 (clone SK7, BD Pharmigen).

As amostras são incubadas com ACm por 15 min no escuro à temperatura ambiente. Após a coloração, 2 ml de solução de lise FACS (BDB) diluída 1/10 (vol/vol) em água destilada é adicionada a cada tubo e após mistura suave, as amostras são incubadas por 10 min no escuro à temperatura ambiente, a fim de lisar as hemácias não nucleadas. Em seguida, as células são centrifugadas (5 min a 540g) e o sedimento celular lavado em 4 ml de PBS. Finalmente, as células são novamente suspensas em 0,5 ml de PBS e imediatamente executadas em um citômetro de fluxo FACSCanto II (BDB).

A aquisição de dados é realizada imediatamente após a conclusão da preparação da amostra usando o programa de software BD FACSDIVA (BDB). Para cada amostra, são adquiridas informações sobre um total de >105 células nucleadas/tubo. Para a análise dos dados, são utilizados os softwares Infinicyt (Cytognos, SL, Salamanca, Espanha). A identificação imunofenotípica das células HRS é realizada de acordo com os critérios definidos por Fromm et al<sup>(98)</sup>, sendo: expressão de CD30, CD40hi e CD95hi; aumento do FSC e SSC; falta de expressão de CD64; falta de expressão brilhante de CD20; e um cluster

contendo pelo menos 30 eventos. Além disso, um gráfico de pontos FCS-A versus FSC-H é traçado para avaliar e distinguir a presença de rosetas de células T/HRS e dupletos inespecíficos.

## 7.5 Anexo 5 - Tabelas

Tabela 1 do anexo 5 - Casos de BA em que as informações clínicas/ radiológicas foram consideradas imprescindíveis para o diagnóstico.

N	Diagnóstico	Justificativa
1	Benigno - Hiperplasia linfoide reacional de padrão paracortical e sinusal	Histologia benigna + mastite em mama homolateral (dispensou IHQ)
1	Benigno - Linfadenite necrotizante supurativa - arranhadura do gato	Paciente jovem, veterinário, contato com gatos (dispensou IHQ)
1	Benigno - Hiperplasia linfoide reacional de padrão paracortical	Uso de anticonvulsivante + doença localizada + população T anômala suspeita (IFT CMF)
1	Benigno - Linfadenite necrotizante supurativa - arranhadura do gato	Paciente jovem, filhotes de gato em casa (dispensou IHQ)
1	Linfoma folicular grau 1/2 - variante difusa, inguinal	Doença inguinal localizada + arquitetura difusa + CD23 positivo
1	Linfoma da zona marginal com diferenciação plasmocítica, IgG4 positivo	Massa perirrenal + infiltração de pleura + pico monoclonal
1	Linfoma de células B pequenas com diferenciação plasmocítica (LZM?)	Massa perirrenal localizada + pico monoclonal
1	Linfoma de células B pequenas com diferenciação plasmocítica (LZM?)	Acometimento pulmonar exclusivo
1	Linfoma difuso de grande células B, perfil centro germinativo	Paciente jovem + massa mediastinal, porém com acometimento gástrico extenso e de linfonodos abdominais
1	LDGCB	Linfoma B de grandes células CD10 positivo com extensa necrose, em vigência de tratamento para LDGCB CG
1	LDGCB	Linfoma B de grandes células com extensa necrose, em vigência de tratamento para LDGCB não CG
1	LDGCB, perfil não centro germinativo + linfoma linfoplasmocítico	Paraproteinemia IgM + envolvimento de baço e medula óssea. Crescimento linfonodal rápido associado
3	Linfoma de Hodgkin clássico, esclerose nodular	Clínica fortemente sugestiva de linfoma (massa mediastinal + linfonodomegalia cervical) - repetiu a biópsia
1	Linfoma de Hodgkin clássico, esclerose nodular	Material escasso, poucas células diagnósticas, porém IHQ clássica e clínica compatível
3	DLPT monomórfica do tipo linfoma de Burkitt	Antecedente de transplante hepático
1	Doença linfoproliferativa polimórfica, semelhante à DLPT	Paciente HIV positiva
15	Linfoma difuso de grandes células B, primário do mediastino	Paciente jovem + predomínio de doença mediastinal extensa
1	Linfoma difuso de grandes células B, rico em células T e histiócitos	morfologia característica + linfonodomegalia + acometimento de baço e medula óssea
1	Linfoma de Burkitt	Paciente jovem, HIV positiva, com doença agressiva
1	Neoplasia linfoproliferativa CD30 positiva (LDGCA ALK -?)	Amostra escassa. Antecedente patológico de LDGCA ALK -
1	LGCA primário da pele com acometimento nodal secundário	Antecedente patológico de LGCA primário da pele. Lesão cutânea predominante
1	Linfoma linfoblástico T, TDT negativo	Criança com massa mediastinal com infiltração de partes moles em parede torácica
1	Linfoma de Hodgkin clássico + linfoma linfocítico (Richter)	Paciente com antecedente de LLC de longa data
1	Linfoma difuso de grandes células B, EBV positivo	Paciente idoso, lesão extranodal - indicou pesquisa de EBV
1	Linfoma linfoplasmocítico	Paraproteinemia IgM + envolvimento de medula óssea
1	Linfoma/ leucemia de células T do adulto + LLC	Sorologia positiva para HTLV1
1	Neoplasia de células T maduras (LCGG?)	Comportamento clínico indolente. Acometimento de baço, fígado, medula óssea e sangue periférico

Legenda: N = número de casos com características semelhantes

Tabela 2 do anexo 5 - Casos de BC em que as informações clínicas/ radiológicas foram consideradas imprescindíveis para o diagnóstico.

<b>N</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>Justificativa</b>
1	Benigno. Linfadenite reacional de padrão misto	Histologia benigna + clínica não sugestiva de linfoma - dispensou IHQ
1	Benigno. Mononucleose	Linfonomegalia cervical + Sorologia para EBV (IgM+, IgG-)
1	Benigno. Linfadenite necrotizante supurativa	PCR positivo para <i>Chlamydia trachomatis</i> na secreção uretral
1	Proliferação linfoide com numerosos plasmócitos	Paciente com doença autoimune em atividade - acompanhamento
1	Linfoma folicular variante difusa, inguinal	Doença inguinal localizada + arquitetura difusa + CD23 positivo
1	Linfoma folicular grau 3A	Doença acometendo mais de uma região, além da inguinal
1	Linfoma de zona marginal (MALT)	Antecedente de MALT do intestino delgado
1	Linfoma de grandes células B (rearranjo IRF4?)	Paciente jovem, com linfonomegalia cervical localizada
3	DLPT monomórfica do tipo linfoma de Burkitt	Antecedente de transplante hepático
1	DLPT do tipo linfoma de Hodgkin clássico	Antecedente de transplante hepático
2	DLPT monomórfica do tipo LDGCB EBV +	Antecedente de transplante hepático
1	Linfoma difuso de grandes células B, primário do mediastino	Paciente jovem + predomínio de doença mediastinal extensa
1	Linfoma de Hodgkin PLN, padrão difuso, B rico em T símile	Antecedente de linfoma de Hodgkin PLN
1	Linfoma de Hodgkin PLN	Clínica sugestiva de linfoma orientou repetição da biópsia
1	Linfoma linfoplasmocítico	Paraproteinemia IgM + acometimento de baço e medula óssea

Legenda: N = número de casos com características semelhantes.

Tabela 3 do anexo 5 - Casos de BA em que a IFT CMF foi considerada imprescindível para o diagnóstico.

<b>N</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>Justificativa</b>
3	Linfadenite reacional de padrão misto	Histologia benigna + IFT CMF negativa - dispensou IHQ
1	Linfoma linfocítico	Dupla população neoplásica na IFT CMF - LLC típica e LLC atípica
1	Linfoma linfocítico com reação granulomatosa	Auxiliou a estabelecer a natureza neoplásica da lesão
4	Linfoma de zona marginal	Auxiliou a estabelecer a natureza neoplásica da lesão
2	Linfoma de células B pequenas e maduras (LZM?)	Auxiliou a estabelecer a natureza neoplásica da lesão
1	LDGCB, perfil não centro germinativo + linfoma linfoplasmocítico	Auxiliou a identificar o componente de pequenas células/ plasmócitos
1	LDGCB + linfoma folicular grau 3B	Amostra limitada. População clonal CD10 negativa - repetiu biópsia
2	Linfoma linfoblástico T	TDT negativo. CD3 citoplasmático + duplo negativo CD4/ CD8
1	Linfoma B de alto grau (SOE) + LLC	Identificação de dupla população neoplásica na IFT CMF
1	Linfoma difuso de grandes células B, CG + LLC	Auxiliou a identificar o componente de pequenas células
1	Linfoma/ leucemia de células T do adulto + LLC	Auxiliou a identificar o componente de pequenas células

Legenda: N = número de casos com características semelhantes.

Tabela 4 do anexo 5 – Casos de BC em que a IFT CMF foi considerada imprescindível para o diagnóstico.

<b>N</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>Justificativa</b>
1	Linfadenite reacional de padrão misto	Histologia benigna + IFT CMF negativa - dispensou IHQ
1	Neoplasia de células B pequenas e maduras (infiltração parcial)	Confirmação de população linfoide neoplásica em linfonodo duvidoso ao HE + IHQ
2	Linfoma da zona marginal	Auxiliou a estabelecer a natureza neoplásica da lesão
1	Linfoma difuso de grandes células B, não CG + LLC	Auxiliou a identificar o componente de pequenas células
1	Linfoma difuso de grandes células B, não CG (infiltração parcial)	Confirmação de população linfoide neoplásica em linfonodo duvidoso ao HE + IHQ

Legenda: N = número de casos com características semelhantes.

Tabela 5 do anexo 5 – Casos de BA em que outros exames foram considerados imprescindíveis para o diagnóstico.

<b>N</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>Justificativa</b>
3	Linfoma de grandes células B, rico em células T e histiócitos	Negatividade para HIS-EBV afasta outros possíveis diferenciais
1	Linfoma B de alto grau, SOE	FISH negativo para rearranjo MYC, BCL6 e BCL2 confirma LBAG SOE
1	Linfoma B de alto grau, SOE	FISH com rearranjo isolado do MYC confirma LBAG SOE
2	Linfoma difuso de grandes células B, EBV positivo	Detecção do EBV é fundamental para o diagnóstico
1	Linfoma B de alto grau, com rearranjo do MYC e do BCL2	Identificação do rearranjo é fundamental para o diagnóstico
1	Linfoma B de alto grau, com rearranjo do MYC, BCL2 e BCL6	Identificação do rearranjo é fundamental para o diagnóstico
1	Leucemia de células granulares grandes	Fundamental afastar neoplasias de células T maduras associadas ao EBV

Legenda: N = número de casos com características semelhantes.

Tabela 6 do anexo 5 – casos de BC em que outros exames foram considerados imprescindíveis para o diagnóstico.

<b>N</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>Justificativa</b>
1	Linfadenite reacional - mononucleose	Deteção do EBV é fundamental para o diagnóstico
1	Linfadenite reacional com expansão de zona T	Pesquisa de clonalidade T negativa confirma o diagnóstico de reacional
1	Linfoma folicular variante difusa (inguinal)	Ausência do rearranjo do BCL2 reforça o diagnóstico
1	Linfoma folicular grau 3A (BCL2 negativo IHQ)	Presença do rearranjo do BCL2 confirma o diagnóstico
1	Linfoma de células do manto CD5 e SOX-11 negativo	Presença da t(11;14) confirma o diagnóstico
2	Linfoma difuso de grandes células B, EBV positivo	Deteção do EBV é fundamental para o diagnóstico
7	Linfoma de células T angioimunoblástico	Deteção do EBV é fundamental para o diagnóstico
1	Linfoma de células T periféricas SOE	Pesquisa de clonalidade T positiva confirma o diagnóstico de linfoma
4	Linfoma de grandes células B, rico em células T e histiócitos	Negatividade para HIS-EBV afasta outros possíveis diferenciais
4	Linfoma B de alto grau, com rearranjo do MYC e do BCL2	Identificação do rearranjo é fundamental para o diagnóstico

Legenda: N = número de casos com características semelhantes.

## 8 REFERÊNCIAS

1. Lukes RJ, Collins RD. Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer*. 1974;34(4 Suppl):suppl:1488-503.
2. Stansfeld AG, Diebold J, Noel H, Kapanci Y, Rilke F, Kelényi G, et al. Updated Kiel classification for lymphomas. *Lancet*. 1988;1(8580):292-3.
3. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. *Cancer*. 1982;49(10):2112-35.
4. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994;84(5):1361-92.
5. Jaffe ES. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press ; Oxford : Oxford University Press [distributor]; 2001.
6. Swerdlow SH. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008.
7. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4<sup>th</sup> edition ed. Lyon.2017.
8. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-90.

9. Swerdlow SH, Cook JR. As the world turns, evolving lymphoma classifications-past, present and future. *Hum Pathol.* 2020;95:55-77.
10. Ireland R. Haematological malignancies: the rationale for integrated haematopathology services, key elements of organization and wider contribution to patient care. *Histopathology.* 2011;58(1):145-54.
11. Cuthbert RJG. Haematological cancers: improving outcomes. A summary of updated NICE service guidance in relation to Specialist Integrated Haematological Malignancy Diagnostic Services (SIHMDS). *J Clin Pathol.* 2017;70(6):469.
12. Ramsay AD. 30 years of lymph node pathology: biomarkers and other advances. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2013;21(2):103-9.
13. Orazi A, Foucar K, Knowles DM, Weiss LM. Knowles' neoplastic hematopathology. Third ed. [Place of publication not identified]: LWW; 2013.
14. Jaffe ES, Arber DA, Campo E, Harris NL, Quintanilla-Martinez L. *Hematopathology.* Second ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2017.
15. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975;256(5517):495-7.
16. Rossi S, Laurino L, Furlanetto A, Chinellato S, Orvieto E, Canal F, et al. Rabbit monoclonal antibodies: a comparative study between a novel category of immunoreagents and the corresponding mouse monoclonal antibodies. *Am J Clin Pathol.* 2005;124(2):295-302.
17. Gulley ML, Tang W. Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. *J Mol Diagn.* 2008;10(4):279-92.
18. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood.* 2008;111(8):3941-67.

19. Stetler-Stevenson M, Braylan RC. Flow cytometric analysis of lymphomas and lymphoproliferative disorders. *Semin Hematol.* 2001;38(2):111-23.
20. Calvo KR, McCoy CS, Stetler-Stevenson M. Flow cytometry immunophenotyping of hematolymphoid neoplasia. *Methods Mol Biol.* 2011;699:295-316.
21. Stetler-Stevenson M, Davis B, Wood B, Braylan R. 2006 Bethesda International Consensus Conference on Flow Cytometric Immunophenotyping of Hematolymphoid Neoplasia. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007;72 Suppl 1:S3.
22. Hoffman R, Benz EJ, Silberstein LE, Heslop H, Weitz JI, Anastasi J, et al. *Hematology : basic principles and practice.* Seventh edition. ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2018. 1 online resource ( xxx, 2374 pages) p.
23. Bagg A. Malleable immunoglobulin genes and hematopathology - the good, the bad, and the ugly: a paper from the 2007 William Beaumont hospital symposium on molecular pathology. *J Mol Diagn.* 2008;10(5):396-410.
24. Haralambieva E, Banham AH, Bastard C, Delsol G, Gaulard P, Ott G, et al. Detection by the fluorescence in situ hybridization technique of MYC translocations in paraffin-embedded lymphoma biopsy samples. *Br J Haematol.* 2003;121(1):49-56.
25. Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, McParland J, Gesk S, Mason DY, et al. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn.* 2006;8(2):141-51.
26. Wolff DJ, Bagg A, Cooley LD, Dewald GW, Hirsch BA, Jacky PB, et al. Guidance for fluorescence in situ hybridization testing in hematologic disorders. *J Mol Diagn.* 2007;9(2):134-43.

27. Boguski MS, Arnaout R, Hill C. Customized care 2020: how medical sequencing and network biology will enable personalized medicine. *F1000 Biol Rep.* 2009;1:73.
28. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, Kamel-Reid S, Lubin IM, Pfeifer J, et al. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn.* 2017;19(3):341-65.
29. Ohgami RS, Rosenwald A, Bagg A. Next-Generation Sequencing for Lymphomas: Perfecting a Pipeline for Personalized Pathobiologic and Prognostic Predictions. *J Mol Diagn.* 2018;20(2):163-5.
30. Desai AN, Jere A. Next-generation sequencing: ready for the clinics? *Clin Genet.* 2012;81(6):503-10.
31. Dave SS. Gene expression signatures and outcome prediction in mature B-cell malignancies. *Curr Treat Options Oncol.* 2006;7(4):261-9.
32. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, Johnson CA, Phelan JD, Wang JQ, et al. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2018;378(15):1396-407.
33. Chen N, Dennis S, Danaher P, Wallden B, Hood T, Ren X, et al. Analytical Validation of the nCounter (R)-based Lymphoma Subtyping Test (LST) for Cell-of-Origin (COO) Identification in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) Specimens. *Blood.* 2016;128(22).
34. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of

Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol.* 2014;32(27):3059-68.

35. Shaw JH, Rumball EM. Complications and local recurrence following lymphadenectomy. *Br J Surg.* 1990;77(7):760-4.

36. Pruneri G, Gigli F, Rafaniello Raviele P, Gardellini A, Raimondi S, De Fiori E, et al. Core needle biopsy as a front line diagnostic approach for lymphoma patients. *Hematol Oncol.* 2015;33(4):247-9.

37. Ranheim EA. Pearls and pitfalls in the diagnostic workup of small lymph node biopsies. *Mod Pathol.* 2019;32(Suppl 1):38-43.

38. OC C, M B, A D, S M, I P, N R, et al. Core biopsies performed by experienced radiologists and analysed by expert haemato-pathologists reliably permit the rapid and safe diagnosis of lymphoproliferative diseases and negate the need for excisional biopsy in almost all patients. Experience from 554 sequential core biopsies from a single centre. *Blood.* 2019;134:4746.

39. Chatani S, Hasegawa T, Kato S, Murata S, Sato Y, Yamaura H, et al. Image-guided core needle biopsy in the diagnosis of malignant lymphoma: comparison with surgical excision biopsy. *Eur J Radiol.* 2020;127:108990.

40. Lachar WA, Shahab I, Saad AJ. Accuracy and cost-effectiveness of core needle biopsy in the evaluation of suspected lymphoma: a study of 101 cases. *Arch Pathol Lab Med.* 2007;131(7):1033-9.

41. Kühnl A, Cunningham D, Hutka M, Peckitt C, Rozati H, Morano F, et al. Rapid access clinic for unexplained lymphadenopathy and suspected malignancy: prospective analysis of 1000 patients. *BMC Hematol.* 2018;18:19.

42. Hehn ST, Grogan TM, Miller TP. Utility of fine-needle aspiration as a diagnostic technique in lymphoma. *J Clin Oncol.* 2004;22(15):3046-52.

43. Landgren O, Porwit MacDonald A, Tani E, Czader M, Grimfors G, Skoog L, et al. A prospective comparison of fine-needle aspiration cytology and histopathology in the diagnosis and classification of lymphomas. *Hematol J*. 2004;5(1):69-76.
44. Gupta RK, Naran S, Lallu S, Fauck R. The diagnostic value of fine needle aspiration cytology (FNAC) in the assessment of palpable supraclavicular lymph nodes: a study of 218 cases. *Cytopathology*. 2003;14(4):201-7.
45. Groneck L, Quaas A, Hallek M, Zander T, Weihrauch MR. Ultrasound-guided core needle biopsies for workup of lymphadenopathy and lymphoma. *Eur J Haematol*. 2016;97(4):379-86.
46. Skelton E, Jewison A, Okpaluba C, Sallomi J, Lowe J, Ramesar K, et al. Image-guided core needle biopsy in the diagnosis of malignant lymphoma. *Eur J Surg Oncol*. 2015;41(7):852-8.
47. Allin D, David S, Jacob A, Mir N, Giles A, Gibbins N. Use of core biopsy in diagnosing cervical lymphadenopathy: a viable alternative to surgical excisional biopsy of lymph nodes? *Ann R Coll Surg Engl*. 2017;99(3):242-4.
48. Screatton NJ, Berman LH, Grant JW. Head and neck lymphadenopathy: evaluation with US-guided cutting-needle biopsy. *Radiology*. 2002;224(1):75-81.
49. Vandervelde C, Kamani T, Varghese A, Ramesar K, Grace R, Howlett DC. A study to evaluate the efficacy of image-guided core biopsy in the diagnosis and management of lymphoma--results in 103 biopsies. *Eur J Radiol*. 2008;66(1):107-11.
50. Hu Q, Naushad H, Xie Q, Al-Howaidi I, Wang M, Fu K. Needle-core biopsy in the pathologic diagnosis of malignant lymphoma showing high reproducibility among pathologists. *Am J Clin Pathol*. 2013;140(2):238-47.

51. Frederiksen JK, Sharma M, Casulo C, Burack WR. Systematic review of the effectiveness of fine-needle aspiration and/or core needle biopsy for subclassifying lymphoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2015;139(2):245-51.
52. Carbone A, Ferlito A, Devaney KO, Rinaldo A. Ultrasound-guided core-needle biopsy: is it effective in the diagnosis of suspected lymphomas presenting in the head and neck? *J Surg Oncol.* 2008;98(1):4-5.
53. Farmer PL, Bailey DJ, Burns BF, Day A, LeBrun DP. The reliability of lymphoma diagnosis in small tissue samples is heavily influenced by lymphoma subtype. *Am J Clin Pathol.* 2007;128(3):474-80.
54. Burke C, Thomas R, Inglis C, Baldwin A, Ramesar K, Grace R, et al. Ultrasound-guided core biopsy in the diagnosis of lymphoma of the head and neck. A 9 year experience. *Br J Radiol.* 2011;84(1004):727-32.
55. He Y, Ji X, Xie Y, He B, Xu X, Chen X, et al. Clinical application of ultrasound-guided core needle biopsy with multiple punches in the diagnosis of lymphoma. *World J Surg Oncol.* 2015;13:126.
56. de Kerviler E, Benet C, Brière J, de Bazelaire C. Image-guided needle biopsy for diagnosis and molecular biology in lymphomas. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2012;25(1):29-39.
57. Picardi M, Gennarelli N, Ciancia R, De Renzo A, Gargiulo G, Ciancia G, et al. Randomized comparison of power Doppler ultrasound-directed excisional biopsy with standard excisional biopsy for the characterization of lymphadenopathies in patients with suspected lymphoma. *J Clin Oncol.* 2004;22(18):3733-40.
58. Tatli S, Gerbaudo VH, Mamede M, Tuncali K, Shyn PB, Silverman SG. Abdominal masses sampled at PET/CT-guided percutaneous biopsy: initial

experience with registration of prior PET/CT images. *Radiology*. 2010;256(1):305-11.

59. Mesa H, Rawal A, Gupta P. Diagnosis of Lymphoid Lesions in Limited Samples: A Guide for the General Surgical Pathologist, Cytopathologist, and Cytotechnologist. *Am J Clin Pathol*. 2018;150(6):471-84.

60. de Larrinoa AF, del Cura J, Zabala R, Fuertes E, Bilbao F, Lopez JI. Value of ultrasound-guided core biopsy in the diagnosis of malignant lymphoma. *J Clin Ultrasound*. 2007;35(6):295-301.

61. Warshavsky A, Rosen R, Perry C, Muhanna N, Ungar OJ, Carmel-Neiderman NN, et al. Core needle biopsy for diagnosing lymphoma in cervical lymphadenopathy: Meta-analysis. *Head Neck*. 2020;42(10):3051-60.

62. Seviar D, Yousuff M, Chia Z, Ramesar K, Newman J, Howlett DC. Image-guided core needle biopsy as the first-line diagnostic approach in lymphoproliferative disorders-A review of the current literature. *Eur J Haematol*. 2021;106(2):139-47.

63. de Kerviler E, de Bazelaire C, Mounier N, Mathieu O, Brethon B, Brière J, et al. Image-guided core-needle biopsy of peripheral lymph nodes allows the diagnosis of lymphomas. *Eur Radiol*. 2007;17(3):843-9.

64. Yuan J, Li XH. Evaluation of pathological diagnosis using ultrasonography-guided lymph node core-needle biopsy. *Chin Med J (Engl)*. 2010;123(6):690-4.

65. Amador-Ortiz C, Chen L, Hassan A, Frater JL, Burack R, Nguyen TT, et al. Combined core needle biopsy and fine-needle aspiration with ancillary studies correlate highly with traditional techniques in the diagnosis of nodal-based lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2011;135(4):516-24.

66. Pedersen OM, Aarstad HJ, Løkeland T, Bostad L. Diagnostic yield of biopsies of cervical lymph nodes using a large (14-gauge) core biopsy needle. *APMIS*. 2013;121(12):1119-30.
67. Pugliese N, Di Perna M, Cozzolino I, Ciancia G, Pettinato G, Zeppa P, et al. Randomized comparison of power Doppler ultrasonography-guided core-needle biopsy with open surgical biopsy for the characterization of lymphadenopathies in patients with suspected lymphoma. *Ann Hematol*. 2017;96(4):627-37.
68. Johl A, Lengfelder E, Hiddemann W, Klapper W, (GLSG) GL-gLSG. Core needle biopsies and surgical excision biopsies in the diagnosis of lymphoma-experience at the Lymph Node Registry Kiel. *Ann Hematol*. 2016;95(8):1281-6.
69. Han F, Xu M, Xie T, Wang JW, Lin QG, Guo ZX, et al. Efficacy of ultrasound-guided core needle biopsy in cervical lymphadenopathy: A retrospective study of 6,695 cases. *Eur Radiol*. 2018;28(5):1809-17.
70. Kwon M, Yim C, Baek HJ, Lee JS, Seo JH, Kim JP, et al. Ultrasonography-guided core needle biopsy of cervical lymph nodes for diagnosing head and neck lymphoma compared with open surgical biopsy: Exploration for factors that shape diagnostic yield. *Am J Otolaryngol*. 2018;39(6):679-84.
71. Cuenca-Jimenez T, Chia Z, Desai A, Moody A, Ramesar K, Grace R, et al. The diagnostic performance of ultrasound-guided core biopsy in the diagnosis of head and neck lymphoma: results in 226 patients. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2021;50(4):431-6.
72. Wilczynski A, Görg C, Timmesfeld N, Ramaswamy A, Neubauer A, Burchert A, et al. Value and Diagnostic Accuracy of Ultrasound-Guided Full Core

Needle Biopsy in the Diagnosis of Lymphadenopathy: A Retrospective Evaluation of 793 Cases. *J Ultrasound Med.* 2020;39(3):559-67.

73. Assaf N, Nassif S, Tamim H, Bazarbachi A, Zaatari G, Chakhachiro Z. Diagnosing Lymphoproliferative Disorders Using Core Needle Biopsy Versus Surgical Excisional Biopsy: Three-Year Experience of a Reference Center in Lebanon. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2020;20(8):e455-e60.

74. NCCN clinical practice guidelines in oncology for non-Hodgkin's lymphomas. 2021.

75. Tilly H, Vitolo U, Walewski J, da Silva MG, Shpilberg O, André M, et al. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2012;23 Suppl 7:vii78-82.

76. Engert A, Dreyling M, Group EGW. Hodgkin's lymphoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2008;19 Suppl 2:ii65-6.

77. Huang PC, Liu CY, Chuang WY, Shih LY, Wan YL. Ultrasound-guided core needle biopsy of cervical lymphadenopathy in patients with lymphoma: the clinical efficacy and factors associated with unsuccessful diagnosis. *Ultrasound Med Biol.* 2010;36(9):1431-6.

78. Gong JZ, Williams DC, 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.

79. Gong JZ, Snyder MJ, Lagoo AS, Vollmer RT, Dash RR, Madden JF, et al. Diagnostic impact of core-needle biopsy on fine-needle aspiration of non-Hodgkin lymphoma. *Diagn Cytopathol.* 2004;31(1):23-30.

80. Drylewicz MR, Watkins MP, Shetty AS, Lin MF, Salter A, Bartlett NL, et al. Formulating a Treatment Plan in Suspected Lymphoma: Ultrasound-Guided Core Needle Biopsy Versus Core Needle Biopsy and Fine-Needle Aspiration of Peripheral Lymph Nodes. *J Ultrasound Med.* 2019;38(3):581-6.
81. Fang H, Jin J, Wang WH, Wang SL, Zhou LQ, Li YX. Prognostic factors and treatment outcomes for patients with stage II extranodal nasal-type natural killer/T-cell lymphoma of the upper aerodigestive tract. *Leuk Lymphoma.* 2014;55(8):1832-7.
82. Chi PD, Freed NS, Wake L, Page C, Smith LM, Amador C, et al. A Simple and Effective Method for Flow Cytometric Study of Lymphoid Malignancies Using Needle Core Biopsy Specimens. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018;94(5):637-43.
83. Nguyen BM, Halprin C, Olimpiadi Y, Traum P, Yeh JJ, Dauphine C. Core needle biopsy is a safe and accurate initial diagnostic procedure for suspected lymphoma. *Am J Surg.* 2014;208(6):1003-8; discussion 7-8.
84. Ingersoll KF, Zhao Y, Harrison GP, Li Y, Yang LH, Wang E. Limited Tissue Biopsies and Hematolymphoid Neoplasms. *Am J Clin Pathol.* 2019;152(6):782-98.
85. de Kerviler E, Guermazi A, Zagdanski AM, Meignin V, Gossot D, Oksenhendler E, et al. Image-guided core-needle biopsy in patients with suspected or recurrent lymphomas. *Cancer.* 2000;89(3):647-52.
86. Siebert JD, Weeks LM, List LW, Kugler JW, Knost JA, Fishkin PA, et al. Utility of flow cytometry immunophenotyping for the diagnosis and classification of lymphoma in community hospital clinical needle aspiration/biopsies. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124(12):1792-9.

87. Williams SA, Moench LE, Khan F, Vercellotti G, Linden MA. Clonal Lymphoproliferations in a Patient With Common Variable Immunodeficiency. *Lab Med*. 2016;47(4):318-25.
88. Cozzolino I, Vigliar E, Sosa Fernandez LV, Selleri C, Pepe S, Vitale M, et al. Non lymphomatous clonal B-Cell populations in enlarged lymph nodes in acquired immunodeficiency syndrome. *Infez Med*. 2012;20 Suppl 2:35-42.
89. Saxena A, Alport EC, Moshynska O, Kanthan R, Boctor MA. Clonal B cell populations in a minority of patients with Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Pathol*. 2004;57(12):1258-63.
90. Stockelberg D, Hou M, Jacobsson S, Kutti J, Wadenvik H. Light chain-restricted autoantibodies in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura, but no evidence for circulating clone B-lymphocytes. *Ann Hematol*. 1996;72(1):29-34.
91. Orphanos V, Anagnostou D, Papadaki T, Maniatis GM, Athanassiadou A. Detection of gene rearrangements in reactive lymphoid processes. *Leuk Lymphoma*. 1993;9(1-2):103-6.
92. van der Harst D, de Jong D, Limpens J, Kluin PM, Rozier Y, van Ommen GJ, et al. Clonal B-cell populations in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 1990;76(11):2321-6.
93. Agid R, Sklair-Levy M, Bloom AI, Lieberman S, Polliack A, Ben-Yehuda D, et al. CT-guided biopsy with cutting-edge needle for the diagnosis of malignant lymphoma: experience of 267 biopsies. *Clin Radiol*. 2003;58(2):143-7.
94. Loubeyre P, McKee TA, Copercini M, Rosset A, Dietrich PY. Diagnostic precision of image-guided multisampling core needle biopsy of suspected lymphomas in a primary care hospital. *Br J Cancer*. 2009;100(11):1771-6.

95. Gupta S, Long SR, Natkunam Y, Kong CS, Gupta NK, Gratzinger D. Role of FNA with core biopsy or cell block in patients with nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Cancer Cytopathol.* 2020;128(8):570-9.
96. 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.
97. Fromm JR, Thomas A, Wood BL. Characterization and Purification of Neoplastic Cells of Nodular Lymphocyte Predominant Hodgkin Lymphoma from Lymph Nodes by Flow Cytometry and Flow Cytometric Cell Sorting. *Am J Pathol.* 2017;187(2):304-17.
98. Fromm JR, Wood BL. Strategies for immunophenotyping and purifying classical Hodgkin lymphoma cells from lymph nodes by flow cytometry and flow cytometric cell sorting. *Methods.* 2012;57(3):368-75.
99. Jevremovic D, Olteanu H. Flow Cytometry Applications in the Diagnosis of T/NK-Cell Lymphoproliferative Disorders. *Cytometry B Clin Cytom.* 2019;96(2):99-115.
100. Berg H, Otteson GE, Corley H, Shi M, Horna P, Jevremovic D, et al. Flow cytometric evaluation of TRBC1 expression in tissue specimens and body fluids is a novel and specific method for assessment of T-cell clonality and diagnosis of T-cell neoplasms. *Cytometry B Clin Cytom.* 2021;100(3):361-9.
101. Dvorak P, Hoffmann P, Simkovic M, Jandura J, Nova M. Is percutaneous computed tomography-guided biopsy sufficient to establish indolent lymphoma transformation? *Arch Med Sci.* 2019;15(6):1443-53.
102. Gallamini A, Borra A. FDG-PET Scan: a new Paradigm for Follicular Lymphoma Management. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2017;9(1):e2017029.

103. Krarup Sigaard R, Wennervaldt K, Munksgaard L, Rahbek Gjerdrum LM, Homøe P. Core needle biopsy is an inferior tool for diagnosing cervical lymphoma compared to lymph node excision. *Acta Oncol.* 2021;60(7):904-10.
104. Dunphy CH. Contribution of flow cytometric immunophenotyping to the evaluation of tissues with suspected lymphoma? *Cytometry.* 2000;42(5):296-306.

## APÊNDICE

USP - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - FMUSP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** A biópsia por agulha (core) no diagnóstico em Hematopatologia: um estudo crítico sobre acurácia e o papel da abordagem multidisciplinar e dos exames complementares na otimização dos resultados

**Pesquisador:** Maria Claudia Nogueira Zerbini

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 93116818.8.0000.0065

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.786.656

#### Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa apresentado de forma adequada e com finalidade de obtenção de título acadêmico de doutorado.

#### Objetivo da Pesquisa:

A pesquisa tem como objetivo avaliar a acurácia de amostra de tecido obtida por biópsia por agulha grossa (core biopsy com amostras obtidas por biópsia cirúrgica no diagnóstico de proliferações benignas e malignas.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisa não apresenta riscos para os sujeitos de pesquisa dado que será estudo retrospectivo e sem intervenções.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo relevante para estabelecer a acurácia diagnóstica de lesões suspeitas de linfoproliferação benigna e maligna amostras obtidas por agulha grossa (core) e biópsias cirúrgicas. Com o avanço das tecnologias de imagem e a concomitante disseminação da realização de biópsia obtida por agulha há necessidade de verificar sua real acurácia em relação ao padrão ouro de obtenção de amostras obtidas cirurgicamente, em especial nas doenças linfoproliferativas benignas e malignas. Os pesquisadores propõem efetuar revisão centralizada

**Endereço:** DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

**Bairro:** PACAEMBU

**CEP:** 01.246-903

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3893-4401

**E-mail:** cep.fm@usp.br

**USP - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - FMUSP**



Continuação do Parecer: 2.786.656

por dois patologistas de amostras de banco de dados de um grande laboratório de Patologia privado do período de 2013 a 2016.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresentação adequada, contendo anuência do Hospital coparticipante do estudo. Porém os pesquisadores solicitam dispensa do TCLE por tratar-se de estudo retrospectivo e garantem o sigilo dos sujeitos de pesquisa que serão estudados e a confidencialidade dos dados.

**Recomendações:**

Nenhuma no momento.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_805022.pdf	04/07/2018 17:49:59		Aceito
Outros	formulariocep.pdf	04/07/2018 17:49:19	Marianne de Castro Gonçalves	Aceito
Outros	autorizacaoarea.pdf	29/05/2018 18:16:59	Marianne de Castro Gonçalves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	dispensaTCLE.pdf	29/05/2018 17:57:11	Marianne de Castro Gonçalves	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	aceitecoparticip.pdf	29/05/2018 17:53:48	Marianne de Castro Gonçalves	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	29/05/2018 17:44:10	Marianne de Castro Gonçalves	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_core1.docx	01/03/2018 17:25:01	Marianne de Castro Gonçalves	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

**Endereço:** DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36  
**Bairro:** PACAEMBU **CEP:** 01.246-903  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 2.786.656

Não

SAO PAULO, 26 de Julho de 2018

---

**Assinado por:**

**Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira  
(Coordenador)**



<b>Título</b> A biópsia por agulha (core) no diagnóstico em Hematopatologia: um estudo crítico sobre acurácia e o papel da abordagem multidisciplinar e dos exames complementares na otimização dos resultados	
<b>Id do Projeto</b> 715	<b>Pesquisador Principal</b> Marianne de Castro Gonçalves
<b>Comissão Responsável pelo Parecer</b> Comitê de Ética em Pesquisa	<b>Tipo de Parecer</b> Parecer Inicial CEP
<b>Data da Solicitação do Parecer</b> 27/07/2018	<b>Data do Parecer</b> 14/08/2018

### Documentos Aprovados pelo CEP

N.DOC	Categoria do documento	Nome do arquivo
2915	Projeto de pesquisa	<a href="#">Projeto_core1.pdf</a>

### Parecer

Número CEP

HSL 2018-55

Número CAAE

93116818.8.3001.5461

Data da decisão pelo Colegiado ou relator

13/08/2018

Data da conclusão do parecer consubstanciado na Plataforma Brasil

14/08/2018

Decisão

Aprovado



### SOLICITAÇÃO DE DISPENSA DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, Profa. Dra. Maria Claudia Nogueira Zerbini, pesquisadora responsável pelo projeto "A biópsia por agulha (core) no diagnóstico em Hematopatologia: um estudo crítico sobre acurácia e o papel da abordagem multidisciplinar e dos exames complementares na otimização dos resultados" solicito perante este Comitê de ética em Pesquisa a dispensa da utilização do TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO para realização deste projeto tendo em vista que o mesmo será um estudo retrospectivo que utilizará dados de prontuário e lâminas histológicas de arquivo, havendo sigilo e confidencialidade dos dados obtidos em prontuários de pacientes. Os dados obtidos na pesquisa serão usados exclusivamente para finalidade prevista no protocolo, e não implicarão em nenhuma conduta incidente sobre os indivíduos da amostra do estudo. O material dos pacientes que está arquivado no laboratório será apenas consultado.

Nenhum dado que permita a identificação do participante do estudo será divulgado. Assim, comprometemo-nos a cumprir o disposto na Resolução CNS 466/12.

São Paulo, 09 de abril de 2018.

---

Profa. Dra. Maria Claudia Nogueira Zerbini  
Pesquisador responsável

---

Dra. Marianne de Castro Gonçalves  
Pesquisador executante



**HOSPITAL  
SÍRIO-LIBANÊS**  
ENSINO E PESQUISA

São Paulo, 29 de maio de 2018

**Ilmo Sr. Coordenador**  
**Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Sírio Libanês**

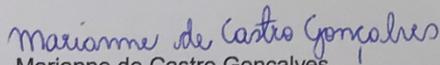
**Projeto:** “A biópsia por agulha (core) no diagnóstico em Hematopatologia: um estudo crítico sobre acurácia e o papel da abordagem multidisciplinar e dos exames complementares na otimização dos resultados”

**Pesquisador:** Marianne de Castro Gonçalves

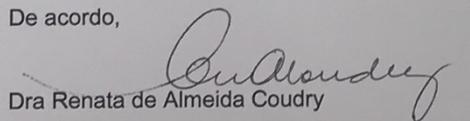
**Assunto:** Autorização para realização de pesquisa clínica no Laboratório de Patologia do Hospital Sírio Libanês

Solicito sua autorização para realização do projeto: “A biópsia por agulha (core) no diagnóstico em Hematopatologia: um estudo crítico sobre acurácia e o papel da abordagem multidisciplinar e dos exames complementares na otimização dos resultados”, na Unidade Bela Vista do Hospital Sírio Libanês, com objetivo de obtenção do título de doutorado. Esse projeto será primeiramente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEPesq) para obtenção do parecer substanciado.

Atenciosamente,

  
Marianne de Castro Gonçalves  
Pesquisador Principal

De acordo,

  
Dra Renata de Almeida Coudry  
Chefe do Laboratório de Patologia do Hospital Sírio-Libanês



**HOSPITAL  
SÍRIO-LIBANÊS  
ENSINO E PESQUISA**

São Paulo, 01 de março de 2018

**Declaração de Aceite e Comprometimento como Instituição Coparticipante**

**Projeto:** "A biópsia por agulha (core) no diagnóstico em Hematopatologia: um estudo crítico sobre acurácia e o papel da abordagem multidisciplinar e dos exames complementares na otimização dos resultados".

**Pesquisador Principal:** Marianne de Castro Gonçalves

Declaro para os devidos fins, que a Sociedade Beneficente de Senhoras Hospital Sírio-Libanês CNPJ: 61.590.410/0001-24 manifesta o total interesse em participar do projeto de pesquisa supracitado.

Eu, Marianne de Castro Gonçalves, registro profissional N° CRM 141.957 pesquisadora responsável institucional pelo projeto de pesquisa supracitado, declaro ter lido e concordo com o delineamento do estudo. Declaro conhecer e cumprir as resoluções éticas brasileiras, em especial a resolução CNS 466/2012.

Esta instituição está ciente de suas corresponsabilidades como instituição coparticipante do presente projeto de pesquisa, e de seu compromisso no resguardo da confidencialidade dos participantes de pesquisa, dispondo de infraestrutura necessária para realização do projeto.

Atenciosamente,

*Marianne de Castro Gonçalves*

Marianne de Castro Gonçalves  
Responsável Institucional

Dr. Luiz Fernando Lima Reis  
Diretor de Ensino e Pesquisa

Dr. Luiz Fernando Lima Reis  
Diretor de Ensino e Pesquisa  
Instituto Sírio-Libanês  
de Ensino e Pesquisa