

ACADEMIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
PÓS GRADUAÇÃO EM HEMATOLOGIA

LUANA BOJKO

RELATO DE CASO: CITOMETRIA DE FLUXO NO DIAGNÓSTICO DE LINFOMA
DE HOGDKIN EM AMOSTRA DE LINFONODO

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2022

INTRODUÇÃO

O Linfoma de Hodgkin (LH) é uma neoplasia linfoide monoclonal derivada na maioria dos casos das células B, composta por células de Hodgkin mononucleares e Hodgkin Reed-Sternberg (RS) multinucleadas. Tais células estão presentes em infiltrados contendo uma mistura variável de pequenos linfócitos não neoplásicos, eosinófilos, neutrófilos, histiócitos, células plasmáticas, fibroblastos e fibras de colágeno¹.

O LH pode ser subdividido em clássico e nodular de predomínio linfocitário baseando-se na morfologia e imuno-histoquímica.

O LH clássico é a forma mais comum da doença (mais de 90% dos casos), caracteriza-se pela presença das células RS e pode ser subdividido em quatro subtipos histológicos com base nas proporções relativas de células RS, linfócitos e fibrose, sendo elas: esclerose nodular, celularidade mista, rico em linfócitos e depleção linfocitária, sendo a esclerose nodular o subtipo mais frequente². A forma clássica caracteriza-se pela expressão de CD15, CD30, PAX-5 (fraco), MUM1/IRF4, CD20 (fraco) e negatividade para CD45³.

O LH nodular de predomínio linfocitário é mais raro e caracteriza-se por células neoplásicas maiores com núcleos lobulados dobrados conhecidas como células linfocíticas e histiocíticas. Não são evidenciadas as células típicas de RS. Os pacientes geralmente apresentam doença nodal limitada, tendo um curso indolente com tendência de recorrências tardias. Ao contrário do LH clássico, essas células são geralmente CD20 positivo e CD30 negativo⁴.

A maioria dos pacientes com LH é diagnosticado entre os 15-30 anos, seguido por outro pico de incidência em adultos de 55 anos. O subtipo esclerose nodular é o mais comum em adultos jovens e o tipo celularidade mista mais frequente em adultos acima de 55 anos. Há maior incidência no sexo masculino em todas as faixas etárias⁵.

A manifestação clínica mais comum é linfadenopatia na parte superior do corpo, geralmente indolor e progressiva lentamente. A minoria dos pacientes apresenta sintomas, os quais podem ser sistêmicos (suores noturnos, perda de peso e febre persistente) ou localizados que resultam da compressão de estruturas próximas (tosse, dor no peito, dor nas costas e limitação de movimento)⁶.

O padrão ouro para o diagnóstico da doença é o estudo anatomopatológico do linfonodo acometido, o qual pode ser realizado por biópsia excisional ou biópsia por agulha grossa¹. O raio X de tórax deve ser realizado no diagnóstico para avaliar massa

mediastinal e o PET-CT também é uma ferramenta útil, uma vez que auxilia no estadiamento da doença, além de apresentar grande sensibilidade e especificidade⁵.

A citometria de fluxo não se mostrava uma ferramenta muito útil para o diagnóstico do LH devido à dificuldade de se isolar as células RS. No entanto, com o passar dos anos tem se demonstrado que a imunofenotipagem pode complementar os achados do estudo anatomopatológico/imunoistoquímico, permitindo um diagnóstico rápido e preciso do LH^{7,8}.

A sensibilidade para detecção das células de RS por citometria de fluxo em amostras de linfonodo é de 85%, com especificidade de 99,7%. As células são classificadas por meio dos seguintes critérios: dispersão de luz elevada (FSC x SSC), expressão de CD30, CD15, CD40+++ e CD95+++; ausência de expressão de CD64, ausência de expressão de CD20 ou expressão de baixa intensidade, exclusão de agregados celulares grosseiros (FCS-A x FCS-H) e um cluster mínimo de 30 eventos⁴.

A seguir descreve-se um relato de caso de um paciente diagnosticado com LH, demonstrando-se a importância da associação dos dados clínicos, estudo anatomopatológico/imunoistoquímico e imunofenotipagem por citometria de fluxo.

RELATO DE CASO

Paciente sexo masculino, 30 anos, procurou serviço de oncologia referindo linfonodomegalia cervical há aproximadamente 1 ano, com acentuada progressão nos últimos 2 meses e dor em região de ouvido esquerdo. Queixava-se de prurido difuso, perda ponderal de 20kg, sudorese noturna e febre eventual.

O exame físico mostrou conglomerado linfonodal bilateral medindo aproximadamente 10 cm, além de múltiplas pápulas e lesões de escoriação decorrente do prurido. Dois dias após a consulta, o paciente internou para realizar exames de imagem e laboratoriais, os quais demonstraram discreta anemia, leucócitos e plaquetas normais, LDH aumentada, função hepática e renal normais. A tomografia evidenciou a presença de linfonodomegalias mediastinais em diversas cadeias e linfonodomegalias cervicais bilaterais, sugerindo a possibilidade de doença linfoproliferativa. Em seguida o paciente foi submetido à procedimento cirúrgico para coleta de biópsia de linfonodo. O material foi separado em dois frascos e encaminhado em formol para anatomia patológica e salina para o setor de citometria de fluxo.

A imunofenotipagem por citometria de fluxo foi realizada no mesmo dia da coleta e mostrou 0,33% de células de tamanho e complexidade muito altos, com forte

expressão para os antígenos de membrana CD3, CD15, CD30, CD40, CD45, CD95 e fraca expressão de CD20 (figura 1), fenótipo sugestivo de LH. A relação de linfócitos T CD4/CD8 foi de 6,6 e os linfócitos B policlonais com relação kappa/lambda de 1,7 (figura 2). Além disso, a análise morfológica da lâmina da biópsia do linfonodo demonstrou a presença de células de grande tamanho e citoplasma basofílico (figura 3).

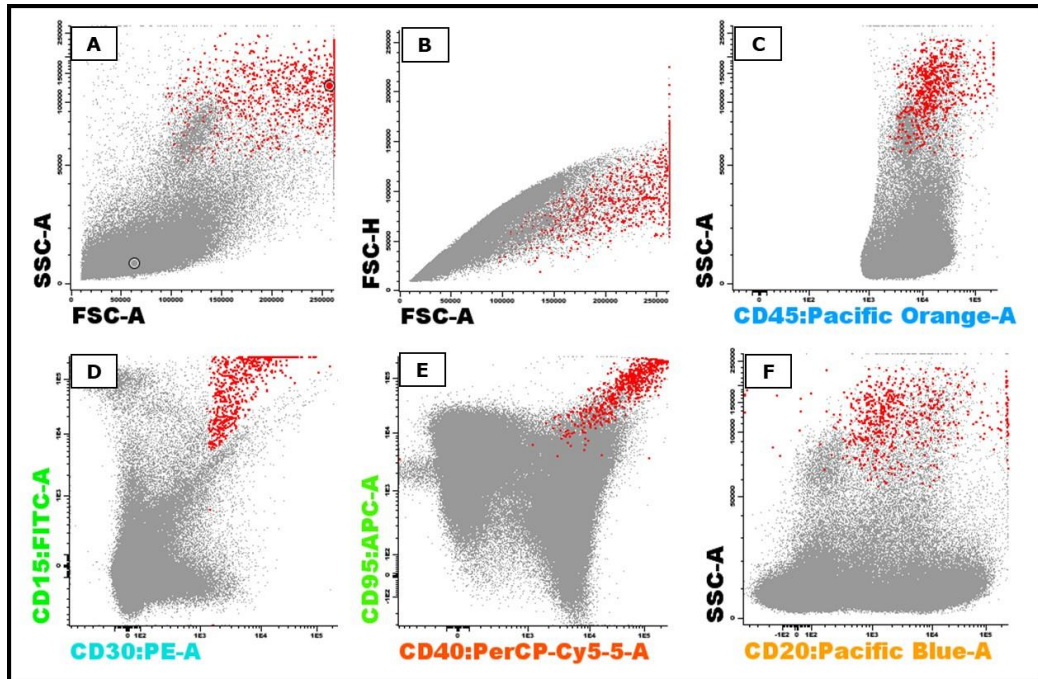


Figura 1: Amostra de biópsia de linfonodo cervical. Destaca-se em vermelho as células de Hodgkin; E) FSC (tamanho) x SSC (complexidade) muito altos; F) FSC-H x FSC-A (sem exclusão dos *doublets* para pesquisa de LH); G-J) Células de Hodgkin (CD15+CD30+CD40+CD95+CD20+).

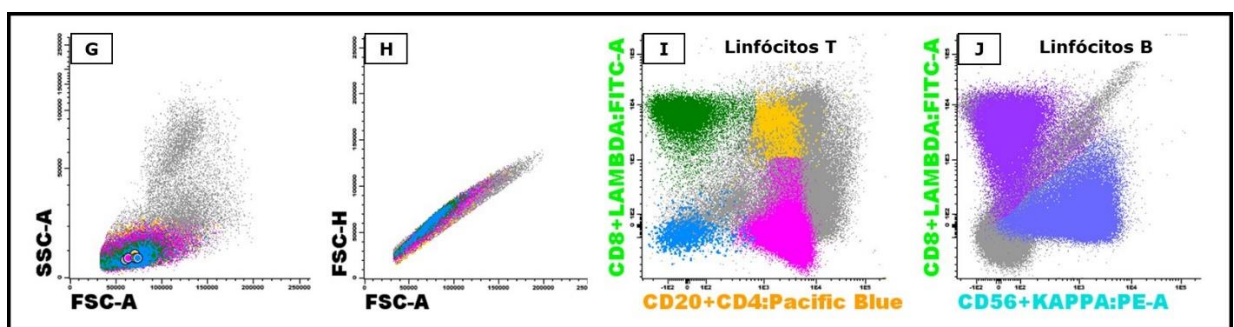


Figura 2: Amostra de biópsia de linfonodo cervical; A) FSC (tamanho) x SSC (complexidade); B) FSC-H x FSC-A (exclusão de *doublets*); C) Linfócitos T Totais/CD3+ (CD4: rosa; CD8: verde; CD4-CD8-: azul, CD4+CD8+: amarelo); D) Linfócitos B Totais policlonais/CD19+CD20+ (Kappa: azul; Lambda: lilás).

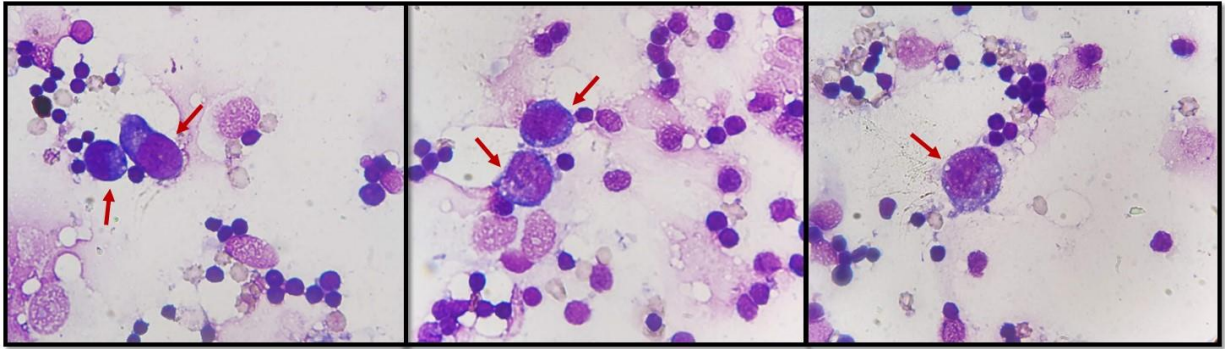


Figura 3: Células de Hodgkin (seta vermelha) em lâmina da biópsia de linfonodo cervical realizada por *imprint* (coloração de *May-Grunwald-Giemsa*).

A análise do linfonodo pela anatomia patológica evidenciou a presença de células de RS (Figura 4 – O). Para confirmação do diagnóstico foi realizada a imunohistoquímica do material, a qual demonstrou a presença de células atípicas com positividade para CD15, CD30, PAX5 (fraco), Ki67 (40%) e negatividade para EBV, fenótipo característico de LH.

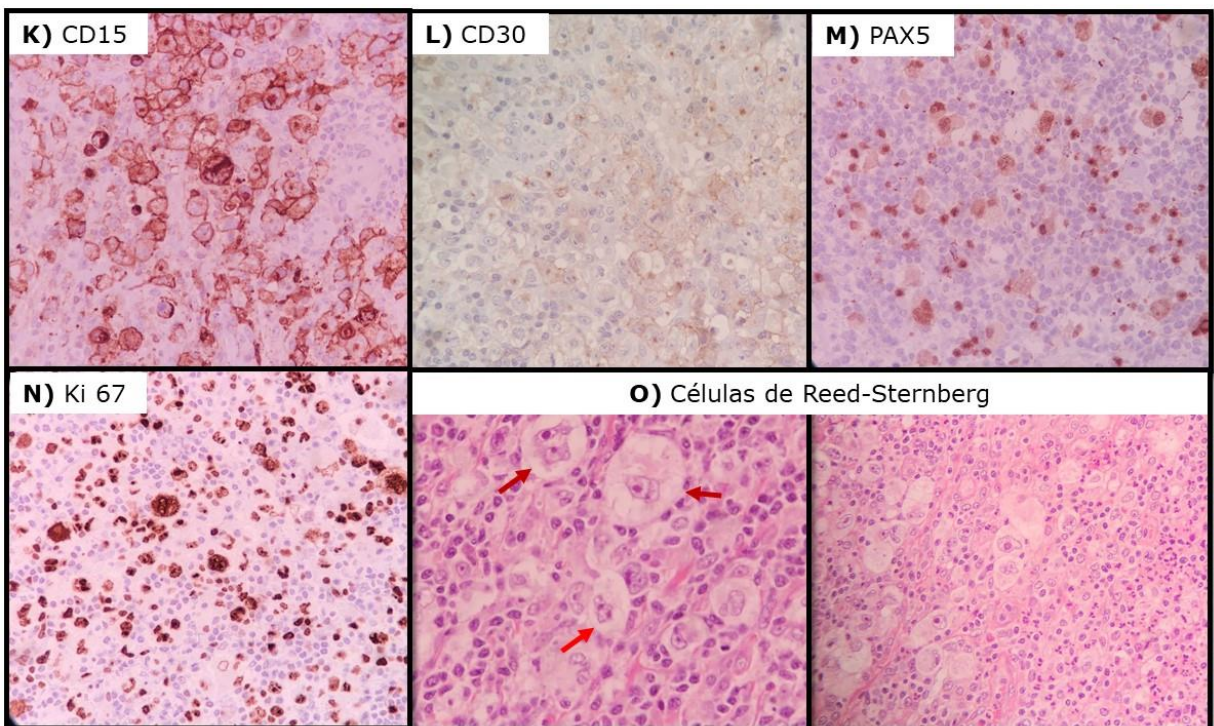


Figura 4: Amostra de biópsia de linfonodo cervical. K) CD15 positivo nas células Reed-Sternberg (RS); L) CD30 positivo nas células RS; M) PAX5 positivo fraco nas células RS; N) Ki67 positivo em aproximadamente 40% nas células RS; O) Células RS na coloração de hematoxilina e eosina em menor e maior aumento.

Portanto, os resultados obtidos apresentaram quadro histológico e perfil imunofenotípico compatíveis com LH, subtipo esclerose nodular.

Após a realização dos exames o paciente foi encaminhado para o serviço de hematologia, onde recebeu o diagnóstico e foi orientado sobre o prognóstico e

importância do tratamento. Realizou alguns exames complementares e de estadiamento, os quais mostraram sorologias negativas (HIV, hepatite B e C) e PET que evidenciou linfonodos supra e infradiafragmáticos compatível com neoplasia linfoproliferativa.

Na sequência o paciente iniciou o primeiro ciclo de quimioterapia (protocolo ABVD). Retornou para consulta após 25 dias referindo melhora significativa e boa tolerância ao tratamento, sem sintomas B e demais queixas. Recebeu prescrição de dois novos ciclos de quimioterapia e segue em acompanhamento.

CONCLUSÃO

A partir do relato descrito foi possível concluir que a associação da citometria de fluxo, análise morfológica e imunohistoquímica possibilitou o diagnóstico de LH em amostra de biópsia de linfonodo.

Embora a anatomia patológica e imuno-histoquímica sejam o padrão ouro para tal finalidade, a imunofenotipagem por citometria de fluxo tem se mostrado uma ferramenta importante, a qual possibilita um diagnóstico rápido e consistente, auxiliando o clínico na avaliação dos pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Swerdlow SH et al. WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Revised 4th edition). IARC: Lyon 2017.
2. Shanbhag S, Ambinder R. Hodgkin Lymphoma: a review and update on recent progress. *CA Cancer J Clin.* 2018 March; 68(2): 116–132.
3. Medeiros LJ, Miranda RN. Diagnostic pathology: lymph nodes and extranodal lymphomas. 2.ed. Philadelphia, PA: Elsevier, 2017.
4. Ansel SM. Hodgkin lymphoma: A 2020 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2020; 1-12.
5. Sandes AF et al. Diagnósticos em hematologia. 2ª edição. Manole: Barueri (SP), 2021.
6. Connors JM et al. Hodgkin lymphoma. *Nature Reviews Disease Primers.* 2020; 6:61.
7. Bezerra AMPS et al. Correlation between flow cytometry and histologic findings: ten year experience in the investigation of lymphoproliferative diseases. *Einstein,* 2011; 9(2 Pt 1):151-9.

8. Fromm JR. Immunophenotyping of classical Hodgkin's lymphoma by flow cytometry. *Ann Hematol*, 2013; 92:569.