

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS MARCADORES CD200, CD43, CD52 E CD123 NO  
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DAS DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS  
CRÔNICAS B**

ELISSANDRA MACHADO ARLINDO DE MATTOS

Porto Alegre

2015

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS MARCADORES CD200, CD43, CD52 E CD123 NO  
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DAS DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS  
CRÔNICAS B**

ELISSANDRA MACHADO ARLINDO DE MATTOS

Orientador: Prof. Dr. Gustavo A. M. Faulhaber

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2015

DE MATTOS, Elissandra Machado Arlindo  
AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS MARCADORES CD200, CD43,  
CD52 E CD123 NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DAS DOENÇAS  
LINFOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS B / Elissandra Machado  
Arlindo DE MATTOS. -- 2015.  
47 f.

Orientador: Gustavo Adolpho Moreira FAULHABER.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2015.

1. doenças linfoproliferativas crônicas B. 2.  
CD200. 3. CD123. 4. CD43. 5. CD52. I. FAULHABER,  
Gustavo Adolpho Moreira, orient. II. Título.

Àqueles que confiam suas vidas aos profissionais da saúde e que merecem toda a dedicação e todo o esmero: os pacientes.

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, Professor Gustavo Faulhaber, pela inestimável oportunidade de realizar este trabalho sob a sua orientação. Pelos ensinamentos e pelo exemplo de competência que se mantêm desde os meus tempos de faculdade.

A Natália e Adriana pelo auxílio e apoio em diversas etapas do trabalho.

Ao Dr. Flavo Fernandes pelos sábios conselhos.

Ao meu amado marido Felipe, pelo incondicional companheirismo e incentivo em todas as horas.

A Deus.

## Resumo

**Introdução:** as doenças linfoproliferativas de células B maduras correspondem a cerca de 80% das neoplasias linfoides, são caracterizadas pela proliferação clonal de uma célula B precursora em diferentes estágios de diferenciação. A semelhança imunofenotípica a um dado estágio maturativo é relevante para o diagnóstico diferencial através da imunofenotipagem por citometria de fluxo, embora a sobreposição de expressões possa dificultar a identificação correta de cada linfoproliferação. Alguns marcadores são pouco conhecidos nas diferentes linfoproliferações B e há pouca literatura analisando os dados quantitativamente, sendo grande parte qualitativa.

**Objetivos:** este trabalho avalia a expressão quantitativa em intensidade de fluorescência média (IFM) dos anticorpos CD200, CD43, CD52 and CD123 no diagnóstico diferencial das doenças linfoproliferativas B crônicas.

**Métodos:** estudo transversal, com 124 amostras de pacientes em investigação diagnóstica de doenças linfoproliferativas que realizaram imunofenotipagem em um centro de referência em neoplasias hematológicas no período de outubro de 2014 a junho de 2015. Foram analisadas as IFMs de cada marcador nas onze diferentes doenças diagnosticadas.

**Resultados:** as neoplasias dos 124 pacientes analisados foram: 81 leucemias linfocíticas crônicas (LLC), 17 linfomas de zona marginal (LZM), 9 linfomas linfoplasmocíticos (LLPL), 6 linfomas do manto (LM), 2 tricoleucemias (TRL), 2 tricoleucemias variantes (TRLv), 5 linfomas foliculares (LF), 1 linfoma de Burkitt e 1 linfoma difuso de grandes células B (LDGCB). A expressão mediana do CD200 foi de 46,8 (intervalo: 1,5-334). A expressão mediana de CD200 foi maior na TRL (incluindo a TRLv) e na LLC (85 e 61,2, respectivamente). A expressão de MFI do CD200 na TRLv diferiu quando comparado à TRL na sua forma clássica (mediana: 36,1 *versus* 220,3). A mesma diferença foi observada na expressão do CD123 quando comparada a TRL à TRLv. Verificamos, que casos de LZM demonstraram IFM medianas de CD43 de 7,1 (intervalo: 1,1-106), em comparação a casos de LM e LLC, nos quais as medianas de IFM do CD43 foram 90 e 176 respectivamente. A comparação da intensidade de CD52 entre amostras demonstrou diferença estatisticamente significativa entre LLC e LZM com medianas de IFM de 775,5 *versus* 1297,0 (P=0,04).

**Conclusões:** nossos resultados sugerem que a citometria de fluxo quantitativa desses marcadores pode ser uma ferramenta adicional útil na identificação de alguns tipos de DLPCBs

**Palavras-chave:** citometria de fluxo, linfoma B, diagnóstico diferencial, imunofenotipagem.

## Abstract

**Background:** lymphoproliferative disorders of mature B cells account for about 80% of the lymphoid malignancies. They are characterized by the clonal proliferation of a B cell precursor at different stages of differentiation. The similarity of a given phenotypical maturation stage is relevant for the differential diagnosis by immunophenotyping, however overlap in cell morphology and immunologic features may difficult the correct identification of each pathology. Some markers are not well known in different B lymphoproliferative neoplasms and there is little literature analyzing the data quantitatively.

**Objectives:** this study evaluated the expression of CD200, CD43, CD52 and CD123 by flow cytometry on B-cell chronic lymphoproliferative disorders (BCLDs) differential diagnosis.

**Methods:** cross-sectional study, of 124 samples from patients for diagnostic investigation of lymphoproliferative disorders who underwent immunophenotyping in a referral center for hematologic malignancies from October 2014 to June 2015. MFIs were analyzed for each marker in eleven different diagnosed pathologies.

**Results:** the diseases of the 124 patients investigated comprised: 81 chronic lymphocytic leukemia (CLL), 17 marginal zone lymphoma (MZL), 9 lymphoplasmacytic lymphoma (LPL), 6 mantle cell lymphoma (MCL), 2 hairy cell leukemia (HCL), 2 hairy cell leukemia variant (HCLv), 5 follicular lymphoma (FL), 1 Burkitt lymphoma (BL) e 1 diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). The CD200 median MFI expression was 46,8 (range: 1,5-334). CD200 was higher in HCL (including HCLv) and CLL cells (85 and 61,2 respectively). HCLv difference in CD200 MFI, when compared to classical HCL (median 36,1 *versus* 220,3). The same difference in CD123 expression was observed when comparing HCL *versus* HCLv. We found that cases of MZL exhibited CD43 median MFI of 7,1 (range: 1,1-106), in contrast to cases of mantle cell lymphoma (MCL) and CLL, which had median MFIs for CD43 of 90 and 176, respectively. The comparison of CD52 intensity between CLL and marginal zone lymphomas (MZL) samples showed statistically significant difference with a median MFI of 777,5 *versus* 1297,0 (P=0,04).

**Conclusion:** our results suggest that quantitative flow cytometry of these markers may be a useful additional tool to better identify some types of BCLDs.

**Key-terms:** flow cytometry, B cell neoplasm, immunophenotyping, differential diagnosis

## Lista de figuras

<b>Figura 1</b> Representação esquemática das células de origem dos linfomas de célula B. ....	14
<b>Figura 2</b> Fluxograma de estratégia de busca. ....	17
<b>Figura 3</b> Exemplo de estratégia de análise utilizando gate de células CD5+/CD19+ e análise de restrição de cadeias leve Kappa e Lambda. ....	24

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1</b> Classificação em português das doenças linfoproliferativas crônicas B .....	20
---	----

## Lista de siglas e abreviaturas

<b>DLPCB</b>	Doenças linfoproliferativas crônicas B
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>REAL</b>	Revised European American Classification of Lymphoid Neoplasm
<b>LLC</b>	Leucemia linfocítica crônica
<b>LP-B</b>	Leucemia prolinfocítica B
<b>LZME</b>	Linfoma B da zona marginal esplênica
<b>TRL</b>	Tricoleucemia
<b>TRL-V</b>	Tricoleucemia variante
<b>LEPV</b>	Linfoma esplênico da polpa vermelha
<b>LLPL</b>	Linfoma linfoplasmocítico
<b>MM</b>	Mieloma Múltiplo
<b>LMALT</b>	Linfoma da zona marginal extranodal do tecido linfoide associado à mucosa
<b>LZMN</b>	Linfoma da zona marginal nodal
<b>LF</b>	Linfoma folicular
<b>LCM</b>	Linfoma de células do manto
<b>LDGCB</b>	Linfoma difuso de grandes células B
<b>LGCB-RTH</b>	Linfoma de grandes células B rico em células T e histiócitos
<b>LDGCB-SNC</b>	Linfoma difuso de grandes células B do sistema nervoso central
<b>LDGCB-perna</b>	Linfoma difuso de grandes células B da pele, tipo “da perna”
<b>LDGCB-EBV+</b>	Linfoma de grandes células B EBV positivo
<b>LDGCB-IC</b>	Linfoma difuso de grandes células B associado à inflamação crônica
<b>GL</b>	Granulomatose linfomatoide (GL)
<b>LGCB-Med</b>	Linfoma de grandes células B do mediastino
<b>LGCB-IV</b>	Linfoma de grandes células B intravascular
<b>LGCB-ALK+</b>	Linfoma de grandes células B ALK-positivo
<b>LPb</b>	Linfoma plasmoblástico
<b>LGCB/DCM-HHV8+</b>	Linfoma de grandes células B com origem na doença de Castleman multicêntrica associada ao HHV-8
<b>LPE</b>	Linfoma primário de efusões
<b>LB</b>	Linfoma de Burkitt

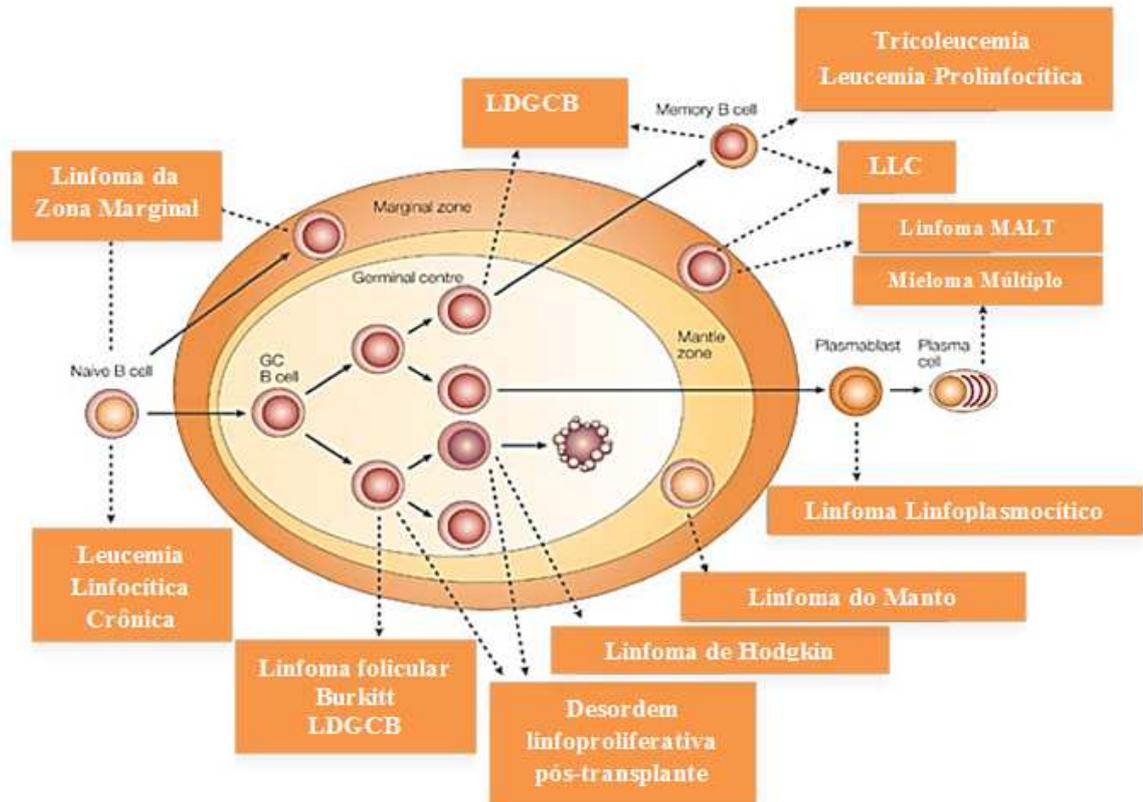
<b>LBI-LDGCB/LB</b>	Linfoma de células B inclassificável, com características intermediárias entre o LDGCB e o linfoma de Burkitt
<b>LBI-LDGCB/LH</b>	Linfoma de células B inclassificável, com características intermediárias entre o LDGCB e o linfoma de Hodgkin
<b>FITC</b>	Fluoresceína
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PerCP</b>	Proteína clorofila peridinina
<b>APC</b>	Aloficocianina
<b>CD</b>	Cluster of differentiation
<b>BCSH</b>	British Committee for Standards in Haematology
<b>NK</b>	Natural killers
<b>GPI</b>	Glicosil-fosfatidil-inositol
<b>IL</b>	Interleucina
<b>STAT</b>	Signal Transducer and Activator of Transcription
<b>JAK</b>	Janus Kinase
<b>IFM</b>	Intensidade de fluorescência média
<b>RAG</b>	Recombination activating gene

## Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO</b> .....	<b>16</b>
2.1	SISTEMATIZAÇÃO DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	16
2.2	EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS B .....	18
2.3	LINFOMAGÊNESE .....	18
2.4	CLASSIFICAÇÃO DOS LINFOMAS NÃO-HODGKIN .....	20
2.5	IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	22
2.6	FLUOROCROMOS .....	22
2.7	ESTRATÉGIAS DE ANÁLISE .....	23
2.8	MARCADORES ANALISADOS .....	25
2.8.1	CD200 .....	25
2.8.2	CD43 .....	26
2.8.3	CD52 .....	26
2.8.4	CD123 .....	26
2.9	IMUNOFENÓTIPO E CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DAS PRINCIPAIS LINFOPROLIFERAÇÕES B .....	27
2.9.1	<i>Leucemia Linfocítica Crônica/ Linfoma Linfocítico – LLC</i> .....	27
2.9.2	<i>Linfoma de Zona Marginal Esplênico – LZME</i> .....	29
2.9.3	<i>Linfoma da Zona Marginal Extranodal do Tecido Linfoide associado à Mucosa – LMALT</i> .....	30
2.9.4	<i>Linfoma de Zona Marginal Nodal – LZMN</i> .....	30
2.9.5	<i>Linfoma do Manto – LM</i> .....	31
2.9.6	<i>Linfoma Difuso de Grandes Células B – LDGCB</i> .....	32
2.9.7	<i>Linfoma de Burkitt – LB</i> .....	33
2.9.8	<i>Linfoma Linfoplasmocítico/ Macroglobulinemia de Waldenström – LLPL</i> .....	34
2.9.9	<i>Tricoleucemia (TL), Tricoleucemia variante (TLv) Linfoma Esplênico da Polpa Vermelha (LEPV)</i> ...	35
2.9.10	<i>Linfoma Folicular – LF</i> .....	35
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
4.1	OBJETIVO GERAL.....	38
4.2	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	38
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>ARTIGO</b> .....	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>61</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>62</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As neoplasias linfoproliferativas compõem um vasto espectro de diferentes doenças com morfologia, clínica, características de imunofenótipo e genética distintas. Contudo, têm em comum um progenitor linfoide mais maduro do que as neoplasias de precursores imaturos. [1] A classificação atual das linfoproliferações B crônicas permite a distinção entre dois principais grupos de células B: Linfoma de Hodgkin (LH) e não Hodgkin (LNH), que, apesar de terem origem em um mesmo tipo de célula, apresentam diferenças anatomopatológicas, fenotípicas, clínicas e terapêuticas, sendo estudadas separadamente.[2] Conforme a Organização Mundial de Saúde (OMS), o diagnóstico das doenças linfoproliferativas B é multifacetado e requer para o diagnóstico definitivo a combinação de achados clínicos, imunofenotípicos, morfológicos, imuno-histoquímicos e genéticos. Conforme ilustra a figura 1, o racional dessa classificação leva em consideração a semelhança fenotípica da célula clonal doente com células em estágios maturativos normais, colocando a citometria de fluxo multiparamétrica em um papel importante na classificação dessas neoplasias.



**Figura 1** Representação esquemática das células de origem dos linfomas de célula B.

Fonte: adaptado de Küppers R. Lymphoma pathogenesis. Nature Reviews Cancer; (Apr)2005;5:251-62.[9]

Entretanto, características clínicas e imunofenóticas podem sobrepor-se em alguns grupos de linfomas, tornando mais difícil o diagnóstico diferencial, como, por exemplo, em casos de linfoma folicular (LF) *versus* linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) ou de tricoleucemia (TRL) *versus* linfoma de zona marginal esplênico (LZME). Nesses casos, novos marcadores e diferentes estratégias de análise devem ser explorados a fim de melhorar a capacidade da citometria de fluxo multiparamétrica em distinguir essas doenças.

## **2 REVISÃO**

### **2.1 Sistematização da revisão bibliográfica**

A estratégia de busca envolveu a principal base de dados Pubmed no período de 2005 a 2015. Foram realizadas buscas utilizando-se os termos CD200, CD123, CD52, CD43, “lymphoma, B cell [MESH]”, “flow cytometry”, “lymphoma”, “lymphoproliferative b cell [review]” e suas combinações, conforme descrito no fluxograma da figura 3. Foram encontrados 903 artigos na base PubMed. Foram selecionados os trabalhos em inglês cujo enfoque fosse baseado no diagnóstico imunofenotípico, resumindo-se a 79 artigos.

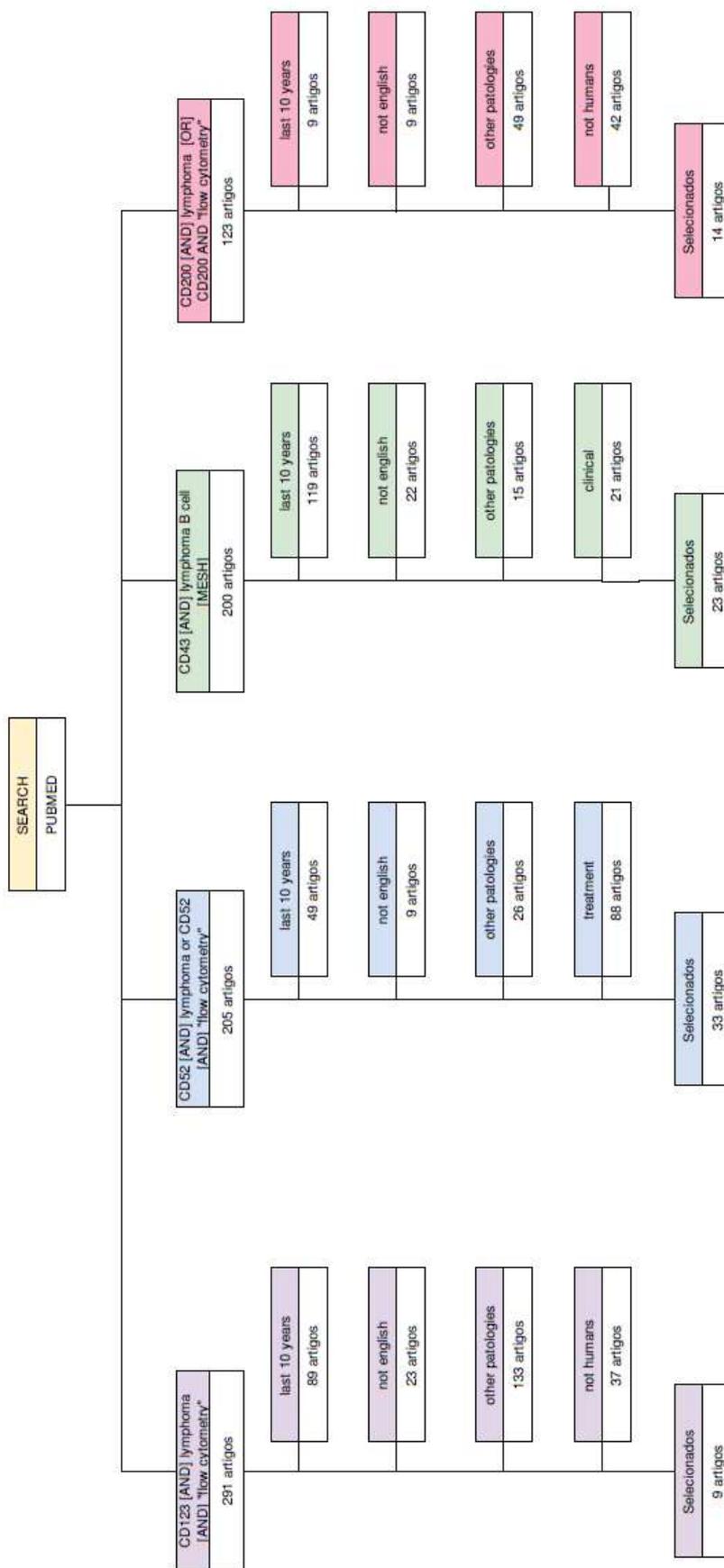


Figura 2 Fluxograma de estratégia de busca.

## **2.2 Epidemiologia das doenças linfoproliferativas crônicas B**

De acordo com dados da última estimativa publicada pelo INCA em 2014, foram previstos cerca de 9.900 novos casos de LNH no Brasil no último ano. Tais valores correspondem a um risco estimado de 5,04 novos casos a cada 100 mil homens e 4,77 a cada 100 mil mulheres. [3] Foram estimados cerca de 71.850 mil casos novos e 19.790 mil óbitos por LNH nos Estados Unidos no ano de 2015. América do Norte, Austrália e algumas localidades da Europa apresentam as mais altas taxas de incidência desse tipo de câncer. Em geral, essas taxas são baixas na África, com exceção do Linfoma de Burkitt (LB), que é causado pela infecção do vírus Epstein-Barr (EBV) em crianças. [4]

Além do EBV, outras infecções, como pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), estão associadas a um maior risco no desenvolvimento dos LNH. As suas taxas de incidência aumentaram em cerca de 4% ao ano na maior parte dos países desenvolvidos durante a década de 1990. [5] [6] Tal aumento deveu-se, provavelmente, à melhoria nos procedimentos diagnósticos e à epidemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), principalmente entre homens brancos. Como a maioria dos cânceres, o risco para o desenvolvimento do LNH aumenta com a idade, sendo cerca de duas vezes maior para os homens em relação às mulheres. O Rio Grande do Sul encontra-se entre os cinco estados do país com maior incidência no último ano, enquanto o estado de São Paulo situa-se em primeiro lugar (890 e 3.050 casos, respectivamente). [3]

## **2.3 Linfomagênese**

O objetivo do desenvolvimento das células B é produzir células capazes de expressar imunoglobulinas de superfície que reconhecerão eficientemente os antígenos. O desenvolvimento das células B começa ainda no fígado fetal e continua na medula óssea durante toda a vida. Progenitores linfoides recebem sinais de células estromais da medula óssea para iniciar o seu desenvolvimento. Citocinas induzem a expressão do gene desoxinucleotidiltransferase terminal (TdT) e dos genes ativadores da recombinação, RAG1 e RAG2, que comandam a recombinação gênica necessária para a produção de imunoglobulinas.

A montagem da cadeia pesada inicia-se com a combinação aleatória de um segmento D e um J que a seguir se unem a um segmento V, definindo a especificidade de reconhecimento do anticorpo que será formado. Independentemente da porção constante que fará parte da cadeia completa, a cadeia pesada é a primeira a sofrer rearranjo, e a célula capaz de produzir uma cadeia pesada m no citoplasma é denominada pré-B. A cadeia m associa-se a uma cadeia invariável e é expressa na superfície como um pré-BCR, juntamente com as moléculas acessórias Iga e Igb. Em seguida, ocorre o rearranjo da cadeia leve kappa e, na falha desta, da cadeia lambda. Cada linfócito B apresenta, portanto, um único tipo de cadeia leve associado à cadeia pesada. Após esse processo, a célula B madura sai da medula e desenvolve-se ao percorrer caminhos pelo centro germinativo, pela zona marginal e pelo manto, onde encontrará células apresentadoras de antígenos (APCs). [7]

Um artigo de revisão, recentemente publicado por Basso et al. [8] sobre os mecanismos de linfomagênese de células B, permite um melhor entendimento acerca da geração e seleção de células B que produzem anticorpos de alta afinidade no centro germinativo e acerca de seu envolvimento na malignidade. O trânsito entre a zona escura e a zona clara nessa região e a diferenciação pós-CG são controlados por uma complexa rede de sinais celulares que irão ativar ou suprimir programas transcricionais específicos. Algumas dessas vias estão modificadas por alterações genéticas na transformação maligna.

Análises de transcriptoma genômico permitiram a identificação de fatores de transcrição e vias de sinalização que determinam o fenótipo da célula B e sua função [7], consequentemente permitindo uma melhor compreensão da classificação das neoplasias B conforme o seu estágio de maturação. Os LNH B compreendem um grupo de cânceres geneticamente, fenotipicamente e clinicamente distintos. A maioria desses linfomas, incluindo o LB, o linfoma folicular (LF) e o linfoma difuso de grandes células (LDGCB), corresponde a cerca de 80% dos linfomas originados dos centros germinativos, conforme demonstrado pela presença de mutações somáticas no gene da imunoglobulina. [8] [9]

Assim como em diversas outras neoplasias, análises genômicas de LNH demonstraram a presença de alterações de amplificação, deleções e *point mutations* que estão associadas a ganhos e perdas de função, além de outros tipos de alterações genéticas, como translocações cromossômicas e HSM aberrantes, ambas dependentes de mecanismos de recombinações VDJ e de troca de classe. [7]

## 2.4 Classificação dos Linfomas não-Hodgkin

A classificação dessas doenças passou por muitas modificações nos últimos 50 anos. A abordagem atual é baseada na integração de aspectos morfológicos, imunofenotípicos, genéticos e clínicos, os quais permitem a identificação de entidades patológicas distintas. Essa abordagem foi inicialmente proposta em 1994 pelo International Lymphoma Study Group (ILSG) e formou a base do Revised European American Classification of Lymphoid Neoplasm (REAL).

Mais tarde, foi adotada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) na classificação das neoplasias hematopoiéticas e linfoides publicada em 2001 e atualizada em 2008. [1] A classificação da OMS representa o desenvolvimento em termos de cooperação e consenso entre patologistas, hematologistas e oncologistas especialistas na área. Além disso, reconhece que qualquer sistema de classificação deve incorporar novas tecnologias, como a inclusão de critérios moleculares, a exemplo da última edição. Esse trabalho levou à identificação de fatores prognósticos e novas categorias diagnósticas. [2] [5]

O constante desenvolvimento de novas tecnologias no campo do sequenciamento, da expressão gênica e do exoma, entre outras, e a correlação desses achados com desfechos clínicos podem sugerir novos alvos terapêuticos e novas classificações diagnósticas, que são aguardadas para a quinta edição da classificação das neoplasias hematológicas da OMS, prevista para setembro de 2016.

A classificação da OMS é uma das mais aceitas. Será utilizada a nomenclatura em português descrita na Tabela 1, sugerida por Zerbini et al. [10]

**Tabela 1** Classificação em português das doenças linfoproliferativas crônicas B

---

### **Neoplasias de células linfoides B maduras**

---

Leucemia linfoide crônica/linfoma linfocítico (LLC/LL) [9823/3]

Leucemia prolinfocítica B (LP-B) [9833/3]

Linfoma B da zona marginal esplênica (LZME)[9689/3]

Tricoleucemia (TRL) [9940/3]

Linfoma/leucemia esplênico de células B, inclassificável [9591/3]

Linfoma esplênico difuso da polpa vermelha, de linfócitos B pequenos [9591/3]

Tricoleucemia variante (TRL-V) [9591/3]

Linfoma linfoplasmocítico (LLPL) [9671/3]

---

Macroglobulinemia de Waldeström (MW) [9761/3]  
Doenças da cadeia pesada (DCP) [9762/3]  
Doença da cadeia pesada alfa [9762/3]  
Doença da cadeia pesada gama [9762/3]  
Doença da cadeia pesada mu [9762/3]  
Mieloma múltiplo (MM) [9732/3]  
Plasmocitoma solitário do osso [9731/3]  
Plasmocitoma extra ósseo [9734/3]  
Linfoma da zona marginal extranodal do tecido linfoide associado à mucosa (Linfoma MALT) [8688/3]  
Linfoma da zona marginal nodal (LZMN) [9699/3]  
Linfoma da zona marginal nodal pediátrico (LZMN-P) [9699/3]  
Linfoma folicular (LF) [9690/3]  
Linfoma folicular pediátrico (LF-P) [9690/3]  
Linfoma centrofolicular primário da pele (LF-Pele) [9597/3]  
Linfoma de células do manto (LCM) [9673/3]  
Linfoma difuso de grandes células B, SOE (LDGCB, SOE) [9680/3]  
Linfoma de grandes células B rico em células T e histiócitos (LGCB-RTH) [9688/3]  
Linfoma difuso de grandes células B do sistema nervoso central (LDGCB-SNC) [9680/3]  
Linfoma difuso de grandes células B da pele, tipo "da perna" (LDGCB-perna) [9680/3]  
Linfoma difuso de grandes células B EBV-positivo do idoso (LDGCB-EBV + idoso) [9680/3]  
Linfoma difuso de grandes células B associado à inflamação crônica (LDGCB-IC) [9680/3]  
Granulomatose linfomatoide (GL) [9766/1]  
Linfoma de grandes células B do mediastino (tímico) (LGCB-Med) [9679/3]  
Linfoma de grandes células B intravascular (LGCB-IV) [9712/3]  
Linfoma de grandes células B ALK-positivo (LGCB-ALK+) [9737/3]  
Linfoma plasmoblástico (LPb) [9735/3]  
Linfoma de grandes células B com origem na D. de Castleman multicêntrica associada ao HHV-8 (LGCB/DCM-HHV8+) [9738/3]  
Linfoma primário de efusões (LPE) [9678/3]  
Linfoma de Burkitt (LB) [9687/3]  
Linfoma de células B inclassificável, com características intermediárias entre o LDGCB e o Linfoma de Burkitt (LBI-LDGCB/LB) [9680/3]

---

Linfoma de células B inclassificável, com características intermediárias entre o LDGCB e o Linfoma de Hodgkin (LBI-LDGCB/LH) [9596/3]

---

As manifestações clínicas variam de acordo com a doença, sendo que algumas apresentam curso indolente, enquanto outras apresentam manifestações mais agressivas. Ambas, porém, costumam cursar inicialmente com emagrecimento, esplenomegalia, linfonomegalia, linfocitose, anemia, febre, sudorese noturna e anorexia. Os linfomas B podem envolver glândulas salivares e outros órgãos, como pulmões, rins, intestino, ossos, estômago e pele. [11]

## **2.5 Imunofenotipagem por citometria de fluxo**

A análise imunofenotípica por citometria de fluxo é uma poderosa técnica, rápida e custo-efetiva utilizada no diagnóstico e seguimento de diversas doenças hematológicas. A técnica consiste na injeção de uma suspensão de partículas através de um tubo capilar a uma velocidade constante. O fluido serve para manter as partículas no centro do fluxo que será iluminado por um laser. A dispersão da luz coletada pelos detectores posicionados em diversos ângulos diferentes fornece informações sobre o tamanho e a granularidade de cada partícula analisada. Além disso, a adição de fluorocromos permite uma análise multiparamétrica de cada partícula individualmente, de acordo com a quantidade de fluorocromos utilizados. [12]

A ligação de anticorpos marcados com fluorocromos a moléculas da superfície celular foi descrita inicialmente por Coons em 1941 e, desde então, tem exercido um importante papel no estudo do sistema imune. Sobretudo nas últimas décadas, técnicas tipo antígeno-anticorpo têm sido aprimoradas para uso na citometria de fluxo. [13]

## **2.6 Fluorocromos**

Os fluorocromos são essencialmente compostos fluorescentes que absorvem energia luminosa em determinado comprimento de onda e emitem luz em um comprimento de onda maior. Esses dois processos são chamados de excitação e emissão, respectivamente. O fluorocromo é conjugado a um anticorpo monoclonal, que se ligará a uma molécula celular de

interesse, emitindo determinada fluorescência quando excitado pelo laser. Entre os fluorocromos utilizados na citometria de fluxo, destacam-se a fluoresceína (FITC), a ficoeritrina (PE), a proteína clorofila peridina (PerCP) e a alofocianina (APC), entre outros. [13]

A utilização de anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos altamente específicos contra epítopos celulares tem permitido, além de realizar a separação celular com base na complexidade e no tamanho, a identificação de subconjuntos celulares utilizando um portfólio de centenas de anticorpos contra diferentes antígenos. Normalmente, os anticorpos marcados ligam-se a receptores na superfície celular, identificados pela nomenclatura “cluster of differentiation” proposta e estabelecida pelo International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens (HLDA). [11]

O citômetro de fluxo pode ser equipado com apenas um laser, permitindo análises mais simples e objetivas, como também permitir análise simultânea de inúmeros marcadores se adicionados tipos de laser com capacidades de excitação em diferentes comprimentos de onda. O tipo mais comum e usado em todos os citômetros é o laser iônico de argônio, que produz uma luz de 488nm. Esse comprimento de onda permite a excitação da maior parte dos fluorocromos utilizados rotineiramente. [12]

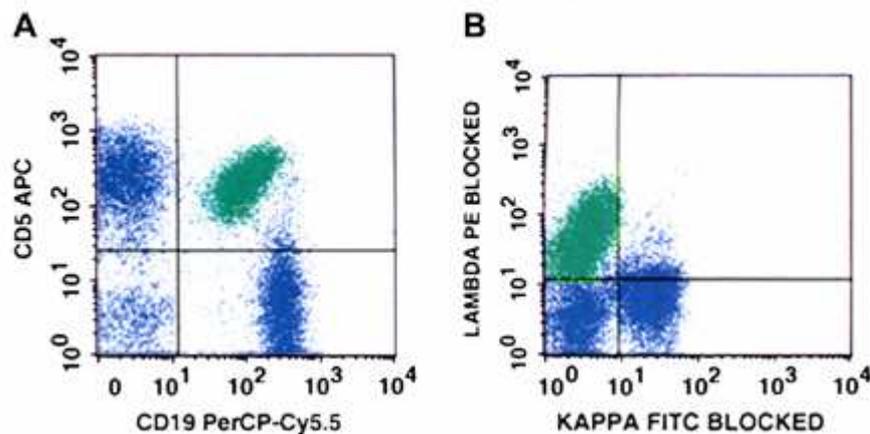
Os dados gerados pelo citômetro são apresentados na forma de histogramas e/ou dot plot. O gráfico dot plot é uma extensão bidimensional do histograma em que cada localização corresponde a um sinal medido em um foto sensor *versus* o sinal medido em um segundo foto sensor. A análise é realizada graficamente, definindo-se as regiões de interesse. Esquemas de análise em gates subsequentes podem ser usados adicionalmente para restringir determinadas populações, ou seja, com diferentes intensidades de fluorescência, tamanho e complexidade. [12]

## 2.7 Estratégias de análise

De acordo com o último *guideline* de diagnóstico das neoplasias hematológicas do British Committee for Standards in Haematology (BCSH), publicado em 2014, a análise por citometria de fluxo pode ser realizada através de estratégia de gates utilizando diferentes combinações de monoclonais. [14] Conforme sugerido pelo European Leukemia Net, no caso das DLPCB, deve-se ter como base os marcadores CD5, CD10 e CD19, assim como as cadeias leves kappa e lambda. [15]

A criação de painéis (combinações de diferentes monoclonais analisados em tubos diferentes) idealmente busca analisar com a maior sensibilidade e especificidade a presença de células B doentes, tentando ao mesmo tempo evitar repetições desnecessárias. Os linfócitos B maduros podem ser divididos conforme o seu compartimento de origem, como, por exemplo, as células foliculares do centro germinativo. A classificação das doenças, de modo geral, segue essa origem, e a citometria de fluxo procura analisar antígenos presentes em diferentes estágios de maturação, expressões aberrantes e, conseqüentemente, diferentes processos patológicos. [16]

Existem várias estratégias para a análise. Uma das primeiras, descrita por Craig et al., seria através da estratificação dos diagnósticos, utilizando-se um fluxograma de classificação de acordo com a expressão dos marcadores CD5 e CD10, analisando-se os demais marcadores a partir deles para se chegar ao diagnóstico. [16]



**Figura 3** Exemplo de estratégia de análise utilizando gate de células CD5+/CD19+ e análise de restrição de cadeias leve Kappa e Lambda.

Fonte: Craig FE. Flow cytometric evaluation of B-cell lymphoid neoplasms. Clin Lab Med 2007; 27(3): 487-512.

Mais recentemente, desde o surgimento do Consortium Euroflow, em 2006, e a partir da criação de softwares mais robustos para a análise das aquisições das células marcadas, as estratégias de gates com monoclonais chamados clássicos vêm sendo substituídas em alguns laboratórios pela utilização dos painéis que utilizam os chamados “backbone markers”. Essa técnica utiliza marcadores-chave que se repetem em diferentes tubos de análise em citômetros de três tipos de laser e mínimo de oito cores. Entre outros objetivos, esse grupo promove a padronização de técnicas que vão desde a marcação das células, estratégias de análise, painéis de marcadores, até compensações do citômetro, unificando as análises e permitindo comparações entre os resultados em diferentes laboratórios. [17]

Alguns grupos de pesquisa têm sugerido que, em substituição à padronização, fosse criada a chamada harmonização, ou seja, criação de painéis e protocolos semelhantes, porém com flexibilidades com relação ao citômetro de fluxo utilizado, à marca de monoclonais e ao conjunto de marcadores analisados. Essa harmonização procura minimizar de forma racional os riscos de restrição de mercado, os custos elevados e a dependência de apenas uma fonte fornecedora de reagentes, mantendo a qualidade e minimizando as diferenças de protocolos e estratégias de análise interlaboratoriais. [18]

## **2.8 Marcadores analisados**

Os painéis utilizados no diagnóstico das neoplasias B maduras costumam analisar a expressão dos seguintes marcadores: CD19, CD20, CD22, CD79a, CD79b, Bcl2, Bcl6, CD10, CD5, CD38, CD25, CD23 e CD43, entre outros. A presença de CD123 na tricoleucemia [19], de CD200 na leucemia linfocítica crônica [20], a coexpressão de CD43 nas células B doentes [21] e de CD52 no linfoma T do adulto [22] são bem conhecidas e constituem marcadores frequentemente presentes nos painéis de análise.

### *2.8.1 CD200*

Proteína codificada pelo gene MRC que tem cerca de 45 kDa. Trata-se de uma glicoproteína transmembrana também conhecida como OX2. O CD200 é expresso em células T e B, monócitos, granulócitos, plaquetas e carcinoma de pequenas células pulmonar. Interage com o receptor de CD200, um receptor inibitório da superfamília das imunoglobulinas, expresso principalmente em linhagens mieloides, e tem um efeito supressivo na resposta imunomediada por células T. Pode manifestar-se em células plasmáticas doentes, leucemias agudas, carcinomas e melanomas, estando associado a pior prognóstico nessas doenças, devido provavelmente ao seu mecanismo imunossupressivo. [23-25]

### 2.8.2 CD43

Também conhecida como sialoforina, foi identificada primeiramente por Brown et al. em 1981. É uma proteína transmembrana expressa na superfície da maior parte das células hematopoéticas, incluindo linfócitos T, leucemias e neoplasias sólidas. O papel fisiológico dessa proteína, apesar de bastante estudado, ainda é pouco compreendido. Está envolvida na ontogenia das células T e provavelmente em sua atividade nessas células após a maturação. O domínio extracelular de cerca de 235 aminoácidos pode regular adesão positivamente ou negativamente. [26]

Trabalhos recentes têm estudado a relação entre a expressão de CD43 e a tumorigênese particularmente de neoplasias hematológicas. Sua coexpressão em células CD5+/CD20+ está associada a preditor de malignidade e mau prognóstico em linfomas difusos de grande células B. [27]

### 2.8.3 CD52

Expresso por células do sistema imune, como linfócitos T e B, monócitos, macrófagos, eosinófilos e até em células epididimais do trato reprodutivo masculino. [28] Consiste em um glicopeptídeo cuja cadeia peptídica é composta por apenas 12 aminoácidos, com sua maior parte externa à membrana e ligada fracamente a uma ancora glicosil-fosfatidilinositol (GPI). Sua função no sistema imune não é bem conhecida, e sua expressão varia nas diferentes neoplasias hematológicas e linfócitos normais. Constitui uma importante molécula-alvo em tratamento para doenças hematológicas, através de anticorpos monoclonais humanizados direcionados contra o CD52 (Alemtuzumab). Seu mecanismo de ação está relacionado à lise das células dependente de anticorpos, à lise celular intermediada por complemento e à indução da apoptose. [29]

### 2.8.4 CD123

Também conhecido como subunidade alfa do receptor da interleucina 3 (IL-3) humana. É uma glicoproteína transmembrana que forma um heterodímero com CD131 e está

expressa em monócitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos e megacariócitos. Além das células hematopoiéticas, está expressa em células cerebrais, na placenta e no endotélio. Essa proteína de 70kDa, composta por 378 aminoácidos em conjunto com CD131, forma o receptor de IL-3, o qual, assim como outras interleucinas, estimula a progressão do ciclo celular e a diferenciação, além de estar envolvida em mecanismos de sinalização de morte celular programada. A IL-3 induz a fosforilação da tirosina, estimulação que resulta na ativação de proteínas JAK e, conseqüentemente, no recrutamento de diferentes STATs que induzirão a transcrição de genes regulatórios. Alguns dos genes induzidos pela STAT estimulam a proliferação, enquanto outros servem para inibir a sinalização JAK/STAT. [30]

Esse marcador é expresso em linfoproliferações de células B, em leucemias agudas e na neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas. Estudos prévios demonstraram que as leucemias linfocíticas crônicas, os linfomas do manto e os linfomas foliculares são, em sua maioria, CD123 negativos e constantemente positivos na tricoleucemia (HCL). [31]

## **2.9 Imunofenótipo e características moleculares das principais linfoproliferações B**

### *2.9.1 Leucemia Linfocítica Crônica/ Linfoma Linfocítico – LLC*

Neoplasia de células de tamanho pequeno que envolve o sangue periférico, a medula óssea e os linfonodos. Quando o componente tumoral é mais proeminente do que o leucêmico, é chamado de linfoma linfocítico. Constitui a leucemia mais frequente entre indivíduos caucasoides e corresponde a cerca de 30% das leucemias do adulto, sendo mais frequente em indivíduos do sexo masculino e idosos. [5]

As células tumorais expressam CD20 de fraca intensidade. Imunoglobulina de superfície de baixa intensidade comparativamente a células B normais e restrição de cadeias leves pode ou não estar presente. Observa-se CD23, CD43 e CD11c fraco, CD19 enquanto coexpressam CD5. Linfócitos B CD5+ são comuns no feto, mas indetectáveis na medula óssea após o nascimento. No entanto, essas células podem ser detectadas esporadicamente no sangue periférico e na periferia do centro germinativo. Outros marcadores fenotípicos associados a linfócitos T são observados em alguns casos de LLC, tais como CD7, CD8, CD9 e CD154. [32] [2]

Casos atípicos podem variar com imunoglobulina de superfície e CD20 de forte intensidade, FMC7+ ou CD11c+ e perda da expressão de CD23 e CD5. [33, 34] O marcador CD200 tem sido descrito em vários estudos como auxiliar no diagnóstico diferencial entre linfoma do manto (LM) e LLC, estando expresso na LLC e sendo negativo no LM. [35] [20] Mais recentemente, foi publicado estudo analisando a expressão de CD148 nessas células, sugerindo sua utilidade no diagnóstico. [36]

Alguns marcadores têm sido estudados com relação ao seu significado prognóstico na LLC. Por exemplo, Bulian et. al analisaram a expressão de CD49d em um grupo de 72 pacientes, usando um ponto de corte de 30% das células que expressavam esse marcador, e verificaram correlação com sobrevida global e sobrevida livre de tratamento em pacientes com LLC típica. [37] Outros dois marcadores, ZAP70 e CD38, também já foram descritos como relacionados a um pior prognóstico quando expressos em mais de 30% da população de células tumorais. [38]

Idealmente, no momento do diagnóstico, o imunofenótipo da LLC é bastante claro, baseado principalmente na expressão de CD20 distinta das células B normais. [38] Contudo, após tratamento com rituximabe, essa diferenciação torna-se mais difícil devido à baixa expressão dessa proteína na superfície das células doentes residuais em consequência do tratamento.

Análises alternativas foram sugeridas. por meio da combinação CD22/CD23/CD19/CD5 para pesquisa de doença residual mínima em 467 pacientes com DLPCB. Porém, nessa estratégia ainda poderiam ser incluídas células CD5/CD23 normais comuns após terapia, já que nessa população a expressão de CD22 é pouco específica. Em artigo original publicado em 2006, Rawstron et al. analisaram 66 diferentes monoclonais em populações de células tumorais LLC e sugeriram que, em populações LLC CD22 próximo à normalidade, a pesquisa das células tumorais fosse realizada através da expressão de CD81, a qual se mostrou diminuída em relação à população B normal. [39] [40]

Vale lembrar a definição da linfocitose B monoclonal, ou seja, quando a contagem de linfócitos doentes é menor do que  $5 \times 10^9$  cél/L no sangue periférico e menos de 30% das células nucleadas na medula óssea em indivíduos sem nenhuma alteração clínica ou laboratorial associada, não caracterizando LLC. [2]

Dois principais subtipos de LLC podem ser reconhecidos: cerca de 50% mostram genes da imunoglobulina não mutados, enquanto 50% demonstram hipermutações somáticas na região que codifica a imunoglobulina de cadeia pesada. [41]

Um artigo de revisão publicado por Mohammad Shahjahani et al., compilando as principais alterações genéticas envolvidas no desenvolvimento da LLC, descrevem: 11q-, 13q, 17p- e +12 mutações no gene de cadeia pesada da imunoglobulina e mutações em diversas vias de sinalização, como NOTCH1, BIRC3, SF3B1 e TP53, além de alterações no padrão de expressão de microRNA (padrões de metilação em genes desregulados na LLC, incluindo os genes BCL2, TCL1 e ZAP 70, que estão ligados a padrões clínicos distintos, detectáveis imunofenotipicamente). [42]

### 2.9.2 *Linfoma de Zona Marginal Esplênico – LZME*

Neoplasia de linfócitos pequenos que expandem a polpa branca esplênica, podendo acometer os linfonodos peri-hilares esplênicos, a medula óssea e, menos comumente, os linfonodos periféricos. Trata-se de uma doença rara, correspondendo a menos de 2% das neoplasias linfoides. Apresenta distribuição igual entre sexos, sendo que a maioria dos pacientes tem mais de 50 anos no momento do diagnóstico. [6] Distingue-se morfológicamente por apresentar pequenos vilos polares. [43]

O imunofenótipo mais comum é a expressão de marcadores pan B como CD19, CD20 e CD79a, além de IgM/IgD e negatividade para CD43, CD5, CD23 e CD10. [44] Um estudo que analisou a expressão de CD43 por imuno-histoquímica em 742 casos de LNH verificou a expressão desse marcador em menos de 1% dos linfomas de zona marginal esplênico. [45] Outros estudos demonstraram a presença desse marcador em cerca de 12% das células doentes. Apesar de pouco comum, 10% a 25% dos LZMEs podem expressar CD5, e nessa subpopulação a expressão de CD43 parece ser discretamente superior à subpopulação de LZME CD5- (12% *versus* 16%). [46]

Na maioria dos casos, IgM com ou sem IgD é fortemente expressa [47]. Conforme já descrito, uma parte das células pode expressar DBA.44 ou CD72 [45], CD11c, CD23, CD103 ou CD25. [48] Entretanto, muito importantes para o diagnóstico diferencial, as células neoplásicas do LZME nunca demonstram forte expressão de CD103, CD11c ou de CD25, o que é característico de outra neoplasia de células vilosas. [19]

O diagnóstico diferencial pode tornar-se difícil em casos de LLPL, LF CD10-, LLC CD5- e LM CD5-. Metcalf et al. descrevem a presença de NMDA por imuno-histoquímica em cerca de 61% dos LZM, enquanto no restante dos LNH B essa expressão variou de 0 a 6%, sugerindo que tal marcador seja útil na diferenciação dessas neoplasias. [49]

Ganhos de 3q e 18q são bastante comuns nos três subtipos de linfoma de zona marginal, embora o LZME esteja associado a del(7q31) e del(8p) e a mutações somáticas que afetam o gene NOTCH2. Também são descritos rearranjos e mutações de ponto no gene da imunoglobulina e em regiões 5' não codificantes do BCL6. [50]

### 2.9.3 *Linfoma da Zona Marginal Extranodal do Tecido Linfoide associado à Mucosa – LMALT*

Caracteriza-se por uma população heterogênea de pequenos linfócitos com núcleo clivado (tipo centrócito) e diferenciação plasmática. Essa neoplasia expande a zona marginal dos folículos, preservando as zonas do manto. Os locais mais acometidos são trato gastrointestinal, glândulas salivares, anexo oculares, pele, tireoide e mama. Corresponde a cerca de 8% dos LNH. [5]

As células tumorais expressam CD20, CD79a, IgM e, menos frequentemente, IgG ou IgA, restrição de cadeias leve e CD43 variável. Os marcadores CD5, BCL6 e CD10 são usualmente negativos, embora possam ser CD5 e CD10 positivos em raros casos. [2,51]

As alterações genéticas mais comuns incluem trissomia do cromossomo 3. Algumas das translocações que têm sido associadas a esses linfomas incluem t(11;18), t(14;18) e t(1;14), levando à produção de uma proteína quimérica (API2-MALT1), à superprodução de MALT1 e à superexpressão de BCL10, respectivamente. A t(11;18) é a mais frequentemente associada a linfomas gástricos e pulmonares, enquanto a t(14;18) é mais comum em linfomas de glândulas salivares e oculares. [52]

### 2.9.4 *Linfoma de Zona Marginal Nodal – LZMN*

Corresponde a cerca de 1,8% de todas as neoplasias linfoides. Tem maior prevalência em pacientes do sexo feminino. Conforme reportado pelo International Lymphoma Study Group classification of NHL, origina-se provavelmente de células B de

memória da zona marginal.

Em termos imunofenotípicos, expressam positividade para BCL2, CD20, CD19 e CD79a, imunoglobulina de superfície (IgM, IgA ou IgG), além de CD43 com positividade variável de 5 a 75%. São negativos para ciclina D1, BCL6 e CD10. [2,51]

A trissomia do cromossomo 3 tem sido identificada com frequência semelhante entre os três tipos de LZM, com resultados variáveis na literatura em estudos por FISH. Expressão aumentada da proteína BCL2 é vista em quase todos os casos de LZMN, mas não está relacionada a t(14,18) como no LF. [52]

### 2.9.5 *Linfoma do Manto – LM*

Representa 5 a 10% dos LNH e ocorre mais comumente em pacientes com 60 anos em média. Pode apresentar padrão de crescimento nodular, difuso ou de zona do manto, onde as células circulam em centros germinativos preservados. São linfócitos de pequeno a médio tamanho que lembram centrócitos, podendo ter envolvimento extranodal da medula óssea. Menos comumente, podem estar presentes ao diagnóstico as variantes blastoide e pleomórfica, que estão associadas a um curso mais agressivo da doença. [53]

Costuma expressar CD20 de forte intensidade. Imunoglobulina de superfície, CD43 e CD5 são usualmente positivos. Além disso, CD23, CD10 e BCL6 (marcadores do centro germinativos) são usualmente negativos. O SOX 11 é positivo em 90% dos casos. O CD200 é normalmente negativo ou de baixa expressão. [19, 34] Os marcadores CD200 e CD38 podem ser utilizados para diferenciar LM de linfocitose B monoclonal ciclina D1 positiva, a qual é caracterizada pela ausência de linfonodomegalias e esplenomegalia em pacientes que não necessitam de tratamento, já que o CD200 está expresso e o CD38 não está expresso nessa população de comportamento benigno. [54]

O diagnóstico pode não ser tão fácil na prática, conforme aponta o artigo publicado por Sander et al., o qual analisa 21 casos de LM com imunofenótipo e morfologia atípicos e descreve relatos de imunofenótipos aberrantes, como ausência de CD5, expressão de CD7, CD8 e CD2, expressão de CD10 e raramente de BCL6, além de um caso CD5-/CD10-, ciclina D1 negativo e SOX11+. [55]

O LM apresenta tipicamente a translocação (11;14), que afeta o gene CCND1, levando à expressão aumentada de ciclina D1. Casos de ciclina D1 negativos são raros, e o

diagnóstico requer correlação com achados morfológicos e imunofenotípicos. Esses casos frequentemente apresentam rearranjos *CCND2* com alta expressão de ciclina D2. O *SOX11*, um fator de transcrição comumente expresso no LM, também está expresso no LM ciclina D1 negativo. [56] Podem estar presentes aberrações como perda nos cromossomos 1p, 8p, 9p (*CDKN2A*, *CDKN2B*), 9q, 11q (*ATM*) e 17p (*TP53*) e ganhos no 3q, 8q (*MYC*), 10p (*BMI1*), 15q e 18q, situações que resultam em aumento proliferativo, diminuição na resposta de reparo do DNA e pior prognóstico. [57]

### 2.9.6 Linfoma Difuso de Grandes Células B – LDGCB

É um dos linfomas mais comuns, correspondendo a cerca de 30% dos casos de LNH entre adultos e até 58% dos LNH na Europa. Apresenta características clínicas, morfológicas, imunofenotípicas e alterações moleculares heterogêneas. É mais comum em pacientes com mais de 60 anos. [6] Como a maior parte dos LNHB, o LDGCB deriva de uma célula B madura que já passou pelo centro germinativo. Pode ser dividido em dois principais grupos baseado em sua célula de origem. São identificados cerca de 15% de casos pouco caracterizados como GCB (germinal center B-cell like) ou ABC (activated B cell) e permanecem inclassificáveis. [58] A célula de origem determinada pelo perfil de expressão gênica parece ser um importante fator prognóstico nessa neoplasia. Já se observou que pacientes com células tumorais com imunofenótipo de centro germinativo (GCB) têm desfechos clínicos significativamente melhores do que aqueles com imunofenótipo de células B ativadas (ABC). [59]

Esses linfomas são usualmente CD5 e CD23 negativos e, em geral, expressam marcadores do centro germinativos (*BCL6* e *CD10*), além de *BCL2* e *IRF4/MUM1*. Expressam os marcadores pan B, como *CD19*, *CD20*, *CD22*, *PAX5* e *CD79a*. Imunoglobulina de superfície ou citoplasmática (IgM, IgG ou IgA) pode ser identificada em 50 a 75% dos casos. O *CD30* tem expressão variável e pode identificar potenciais candidatos à terapia anti-*CD30* (Brentuximab). [60]

Aberrâncias dificultam o diagnóstico, já que 10% dos casos podem expressar CD5 e estar associados a um pior prognóstico. [61] O *CD43* já foi descrito como útil no diferencial das linfoproliferações B *CD5+/CD10+*, visto que essas situações costumam ser de difícil definição diagnóstica. [62]

Do ponto de vista genético, 20 a 30% dos LDGCB NOS apresentam t(14;18) com rearranjo do gene BCL2. Esses são os casos do tipo centro germinativo e normalmente expressam CD10. Rearranjos BCL6 podem ser identificados em cerca de 30% e translocações MYC em 10%. O rearranjo MYC pode ser resultado da transformação de um linfoma folicular, podendo nesse caso vir acompanhado de rearranjo BCL2 e ser chamado de linfoma “double hit”. Quando está presente o rearranjo BCL6 em associação a MYC e BCL2, é conhecido como “triple hit” linfoma. [63-64]

É possível suspeitar de um diagnóstico de DHL diante de imunofenótipo com características sobrepostas de LDGCB e LB, como, por exemplo, CD10+/CD38+/CD43+ e BCL2+. [65] A distinção entre células do CG e ABC ainda não levou a diferenças de tratamento, mas evidências demonstram que pacientes que falham ao primeiro tratamento podem ter abordagens terapêuticas distintas conforme a célula de origem. [66]

### 2.9.7 Linfoma de Burkitt – LB

Representa um dos principais tumores entre crianças e adultos jovens. Caracteriza-se por proliferação difusa monomórfica de células de tamanho médio com fenótipo de células maduras do centro germinativo. [56]

É endêmico na África equatorial e em outras regiões, estando associado à infecção por EBV em quase todos os casos. O LB esporádico ocorre em todas as regiões, com freqüente acometimento extranodal, ocorrendo principalmente massas abdominais, mandibulares e nos ossos da face. [2]

Caracteriza-se morfológicamente por linfoblastos tipo L3 e imunofenotipicamente expressam marcadores pan B como CD19, CD20, CD79a, IgM citoplasmática de forte intensidade e Ig de superfície com restrição de cadeia leve, além de CD10 e BCL6. Os marcadores BCL2, MUM1 e ciclina D1 costumam ser negativos. [67]

A t(8;14) é encontrada no contexto de um cariótipo simples, embora cerca de 10% dos LB não apresentem essa alteração pelo FISH. Portanto, a sua ausência não exclui o diagnóstico e sua presença não é exclusiva dessa doença, podendo estar presente em alguns LDGCB. [56]

### 2.9.8 *Linfoma Linfoplasmocítico/ Macroglobulinemia de Waldenström – LLPL*

Neoplasia composta por linfócitos, linfoplasmócitos e plasmócitos. Envolve a medula óssea e, por vezes, os linfonodos, o fígado e o baço. Apesar de ser comum a presença de paraproteína IgM, não é imprescindível para o diagnóstico. [68] Embora o conhecimento sobre a patogênese do LPL tenha avançado nos últimos anos, a célula de origem específica e os mecanismos envolvidos na transformação da MGUS para o linfoma ainda não são totalmente conhecidos. [69]

Trata-se de uma doença incomum, apresentando incidência de 3,4 casos por 1.000.000 de pessoas por ano nos Estados Unidos. [70] Parece haver influência genética, conforme evidência de estudo analisando 924 pacientes com LPL, em que 26% dos pacientes com esse diagnóstico tinham algum familiar de primeiro ou segundo grau com a doença ou outra linfoproliferação B. [71]

As células apresentam IgM de superfície e restrição de cadeias leves, marcadores pan B como CD19, CD20, CD22, CD79a, e CD25, CD43 e CD38) com positividade variável. Pode ocorrer uma subpopulação de plasmócitos com a mesma restrição de cadeias leve encontrada na população linfocítica. Cerca de 20% dos casos podem expressar CD5, CD23 ou CD10. [2] Nesses casos, deve-se realizar diagnóstico diferencial com LLC e LM, já que, por vezes, imunofenotipicamente não é possível separar com absoluta certeza. Os agregados linfoides podem vir acompanhados de um aumento no número de mastócitos, o que auxilia no diagnóstico diferencial de outros linfomas B. [72] Em casos mais difíceis, como na ausência de CD20 e CD19 ou na positividade para CD38 e CD138, o CD43 parece ser útil para a suspeita do diagnóstico. [73]

Deleção 6q está presente em cerca de 42% dos pacientes e está associada a pior prognóstico. [74] A simples troca de uma timina por uma citosina no gene MYD88, resultando em uma troca de uma leucina por uma prolina na posição 265, tem demonstrado boa correlação com a malignidade no LPL, estando presente em 90% desses, 10% dos pacientes com LZME e 4% dos pacientes com LLC. Entretanto, pode ser identificada em pacientes com gamopatia monoclonal IgM de significado incerto, sugerindo que a mutação seja um evento precursor. [75]

### 2.9.9 *Tricoleucemia (TL), Tricoleucemia variante (TLv) Linfoma Esplênico da Polpa Vermelha (LEPV)*

Linfoproliferações raras que acometem pacientes com média de 50 anos e que apresentam maior prevalência entre os homens. [2]

Caracterizam-se morfológicamente por serem células mononucleares com citoplasma abundante e projeções citoplasmáticas, nucléolo frequentemente ausente na TL, pequeno no LEPV e evidente na TLv. Projeções são visualizadas em mais de 90% das TLv e TL e em cerca de apenas 30% das células do LEPV. [76]

Caracterizam-se imunofenotipicamente pela forte expressão de marcadores pan B (CD20, CD19 e CD22). Os marcadores CD5 e CD10 são negativos. Porém, em uma série de 213 casos, foram identificados 2% dos casos CD5+, 12% CD10+ e 21% CD23+. A expressão aberrante de CD23 normalmente é fraca e não simultânea à expressão de CD5. O CD38 é incomum, mas pode estar expresso em cerca de 14% dos casos. [76,77]

Apesar de o CD103 ser positivo na TL e na TLv, é negativo no LEPV. O diagnóstico diferencial dessas doenças consiste principalmente na expressão de CD25, CD11c e CD123. Na TLv, o CD25 é negativo e o CD123 é expresso em cerca de 40 a 60% dos casos. [19,76]

A mutação no gene BRAF V600E tem sido identificada em inúmeras neoplasias, sendo exclusiva à TL entre todas as doenças linfoproliferativas B. [78]

### 2.9.10 *Linfoma Folicular – LF*

Representa cerca de 20% dos LNH nos Estados Unidos e na Europa. Tem predominância entre as mulheres e entre pacientes com mais de 60 anos. Costuma ser uma doença indolente considerada incurável, embora possa evoluir para curso mais agressivo em cerca de 2-3% dos casos. [79]

Caracteriza-se por células de tamanho pequeno em uma mistura de centrócitos e centroblastos com arquitetura de padrão folicular. Seu grau de classificação varia conforme o número de centroblastos por campo de maior aumento em 10 folículos. São células do centro germinativo com expressão de BCL6, CD10, CD19, CD20, CD22 e CD79. O BCL2 está presente em grande parte dos LF grau 1 e 2. Os marcadores CD5 e CD43 normalmente são negativos. [2,56]

A maior parte apresenta t(14, 18)(q32;q21), o que leva à expressão aberrante de BCL2, e 70% ou mais apresentam alterações MLL2 e EPHA7. [80] A transformação para LDGCB pode apresentar alterações envolvendo inativação TP53 e ativação c-MYC. [56]

Diversas alterações genéticas parecem estar envolvidas e influenciar a estratificação de risco desses pacientes. Em estudo publicado recentemente, analisando sete genes (EZH2, ARID1A, MEF2B, EP300, FOXO1, CREBBP e CARD11), demonstrou que mutações no gene EZH2 parecem estar envolvidas na transformação das células B. A mutação nesse gene esteve inesperadamente associada a baixo risco. [81]

### 3 JUSTIFICATIVA

A revisão de dados da literatura a respeito do uso de diferentes marcadores em associação apresenta lacunas a serem preenchidas. De acordo com nossa experiência em citometria de fluxo no diagnóstico de neoplasias hematológicas, os marcadores CD200, CD123, CD43 e CD52, em associação com os demais marcadores do painel padrão, são úteis na diferenciação dessas doenças. Devido à grande variação interlaboratorial e à difícil padronização da técnica de imunofenotipagem, a presença de múltiplos fatores cooperadores para um diagnóstico acurado são importantes para a segurança dos pacientes.

A maior parte dos estudos concentra-se na população europeia e existem poucos dados a respeito da população no Brasil. Além disso, esses marcadores são bem conhecidos nas linfoproliferações mais comuns, principalmente na LLC, mas pouco se sabe a respeito do seu comportamento nas linfoproliferações mais raras. [34] Também existem poucos trabalhos utilizando o recurso de análise quantitativo, descrevendo os dados por intensidade média de fluorescência (IFM). Grande parte da literatura dispõe os dados através de descrição qualitativa, sendo possível que a análise do dado em IFM forneça informações adicionais para o diagnóstico diferencial. [28]

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Verificar se os marcadores CD43, CD52, CD123 e CD200 em conjunto auxiliam no diagnóstico diferencial das neoplasias de células B maduras.

### **4.2 Objetivos secundários**

Avaliar a intensidade de fluorescência média de CD52 nas diferentes linfoproliferações B.

Avaliar a intensidade de fluorescência média de CD200 nas diferentes linfoproliferações B.

Avaliar a intensidade de fluorescência média de CD123 nas diferentes linfoproliferações B.

Avaliar a intensidade de fluorescência média de CD43 nas diferentes linfoproliferações B.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kaushansky K, Williams W. Williams hematology. 8th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2010.
2. Swerdlow SH. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.
3. INCA. Estimate/2014 – Cancer Incidence in Brazil. 2014.
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *Cancer J Clin* 2015;65(1):5-29.
5. Hoffman R. Hematology: basic principles and practice. 6th ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2013.
6. Muller AM, et al. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): trends, geographic distribution, and etiology. *Ann Hematol* 2005;84(1):1-12.
7. Catelan TTT, Mesquita Jr D, Araújo JAP, Silva de Souza AW, Andrade LEC, Silva NP, Cruvinel WM. Linfócitos B: da imunobiologia aos imunobiológicos. *Revista Brasileira de Medicina* 2009;08-10(2):35-57.
8. Basso K, Dalla-Favera R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat Rev Immunol* 2015;15(3):172-84.
9. Kuppers R, et al. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 1999; 341(20):1520-9.
10. Zerbini MCN, Soares FA, Morais JC, Vassallo J, Velloso EDRP, Chauffaille MLLF, et al. Classificação dos tumores hematopoéticos e linfóides de acordo com a OMS: padronização da nomenclatura em língua portuguesa. *J Bras Patol Med Lab* 2011;47(6): 643-8.
11. McPherson RA, Henry JB. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods. 22nd ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2011.
12. Duarte A, Sales MM, Vasconcelos, DM. Citometria de fluxo: aplicações no laboratório clínico e de pesquisa. São Paulo: Atheneu; 2013.

13. Bauer KD, Duque RE, Shankey TV. Clinical flow cytometry: principles and application. Baltimore: Williams & Wilkins; 1993.
14. Johansson U, et al. Guidelines on the use of multicolour flow cytometry in the diagnosis of haematological neoplasms. British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol* 2014;165(4):455-88.
15. Bene MC, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European Leukemia Net Work Package 10. *Leukemia* 2011;25(4):567-74.
16. Craig FE. Flow cytometric evaluation of B-cell lymphoid neoplasms. *Clin Lab Med* 2007;27(3):487-512, vi.
17. van Dongen JJ, Orfao A. EuroFlow: Resetting leukemia and lymphoma immunophenotyping. Basis for companion diagnostics and personalized medicine. *Leukemia* 2012;26(9):1899-907.
18. Preijers FW, et al. Establishment of harmonization in immunophenotyping: A comparative study of a standardized one-tube lymphocyte-screening panel. *Cytometry B Clin Cytom* 2014;86(6): 418-25.
19. Venkataraman G, et al. Characteristic CD103 and CD123 expression pattern defines hairy cell leukemia: usefulness of CD123 and CD103 in the diagnosis of mature B-cell lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol* 2011;136(4):625-30.
20. Palumbo GA, et al. CD200 expression may help in differential diagnosis between mantle cell lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2009;33(9):1212-6.
21. Mitrovic Z, et al. CD43 expression is an adverse prognostic factor in diffuse large B-Cell lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma* 2009;9(2):133-7.
22. Piccaluga PP, et al. Expression of CD52 in peripheral T-cell lymphoma. *Haematologica* 2007;92(4):566-7.
23. Moreaux J, et al. CD200 is a new prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 2006;108(13):4194-7.
24. Tonks A, et al. CD200 as a prognostic factor in acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 2007;21(3):566-8.

25. Moreaux J, et al. CD200: a putative therapeutic target in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;366(1):117-22.
26. Shelley CS, et al. Molecular characterization of sialophorin (CD43), the lymphocyte surface sialoglycoprotein defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989;86(8):2819-23.
27. Ma XB, et al. CD43 expression in diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified: CD43 is a marker of adverse prognosis. *Hum Pathol* 2015;46(4):593-9.
28. Pevna M, et al. Residual cancer lymphocytes in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy show increased expression of surface antigen CD52 detected using quantitative fluorescence cytometry. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2014;14(5):411-8.
29. Golay J, et al. Effect of alemtuzumab on neoplastic B cells. *Haematologica* 2004;89(12):1476-83.
30. Munoz L, et al. Interleukin-3 receptor alpha chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies. *Haematologica* 2001;86(12):261-9.
31. Del Giudice I, et al. The diagnostic value of CD123 in B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. *Haematologica* 2004;89(3):303-8.
32. Caligaris-Cappio F, Ghia P. The nature and origin of the B-chronic lymphocytic leukemia cell: a tentative model. *Hematol Oncol Clin North Am* 2004;18(4):849-62, viii.
33. Criel A, et al. Further characterization of morphologically defined typical and atypical CLL: a clinical, immunophenotypic, cytogenetic and prognostic study on 390 cases. *Br J Haematol* 1997;97(2):383-91.
34. Matutes E, et al. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol* 1996;92(2):382-8.
35. Dorfman DM, Shahsafaie A. CD200 (OX-2 membrane glycoprotein) expression in b cell-derived neoplasms. *Am J Clin Pathol* 2010;134(5):726-33.
36. Fan L, et al. Expression patterns of CD200 and CD148 in leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders and their potential value in differential diagnosis. *Leuk Lymphoma* 2015;19:1-7.

37. Bulian P, et al. CD49d is the strongest flow cytometry-based predictor of overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2014;32(9):897-904.
38. Chiorazzi N. Implications of new prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:76-87.
39. Rawstron AC, Hillmen P. Assessing minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep* 2008;3(1):47-53.
40. Rawstron AC, et al. Flow cytometric protein expression profiling as a systematic approach for developing disease-specific assays: identification of a chronic lymphocytic leukaemia-specific assay for use in rituximab-containing regimens. *Leukemia* 2006;20(12):2102-10.
41. Schnaiter A, Mertens D, Stilgenbauer S. Genetics of chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lab Med* 2011;31(4):649-58, ix.
42. Shahjehani M, et al. Molecular basis of chronic lymphocytic leukemia diagnosis and prognosis. *Cell Oncol (Dordr)* 2015;38(2):93-109.
43. Iannitto E, Tripodo C. How I diagnose and treat splenic lymphomas. *Blood* 2011;117(9):2585-95.
44. Savilo E, et al. Absence of cyclin D1 protein expression in splenic marginal zone lymphoma. *Mod Pathol* 1998;11(7):601-6.
45. Lai R, et al. Frequency of CD43 expression in non-Hodgkin lymphoma. A survey of 742 cases and further characterization of rare CD43+ follicular lymphomas. *Am J Clin Pathol* 1999;111(4):488-94.
46. Baseggio L, et al. CD5 expression identifies a subset of splenic marginal zone lymphomas with higher lymphocytosis: a clinico-pathological, cytogenetic and molecular study of 24 cases. *Haematologica* 2010;95(4):604-12.
47. Matutes E., et al. The immunophenotype of splenic lymphoma with villous lymphocytes and its relevance to the differential diagnosis with other B-cell disorders. *Blood* 1994;3(6):1558-62.
48. Matutes E, et al. Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia* 2008;22(3):487-95.

49. Metcalf RA, et al. Myeloid cell nuclear differentiation antigen is expressed in a subset of marginal zone lymphomas and is useful in the differential diagnosis with follicular lymphoma. *Hum Pathol* 2014;45(8):1730-6.
50. Arribas AJ, et al. DNA methylation profiling identifies two splenic marginal zone lymphoma subgroups with different clinical and genetic features. *Blood*, 2015;125(12):1922-31.
51. Boveri E, et al. Bone marrow histology in marginal zone B-cell lymphomas: correlation with clinical parameters and flow cytometry in 120 patients. *Ann Oncol* 2009; 20(1):129-36.
52. Dierlamm J. Genetic abnormalities in marginal zone B-cell lymphoma. *Haematologica* 2003;88(1):8-12.
53. Sander B. Mantle cell lymphoma: recent insights into pathogenesis, clinical variability, and new diagnostic markers. *Semin Diagn Pathol* 2011;28(3):245-55.
54. Espinet B, et al. Distinction between asymptomatic monoclonal B-cell lymphocytosis with cyclin D1 overexpression and mantle cell lymphoma: from molecular profiling to flow cytometry. *Clin Cancer Res* 2014;20(4):1007-19.
55. Sander B, et al. Mantle cell lymphoma-a spectrum from indolent to aggressive disease. *Virchows Arch*, 2015.
56. Ondrejka SL, Hsi ED. Pathology of B-cell lymphomas: diagnosis and biomarker discovery. *Cancer Treat Res* 2015;165:27-50.
57. Royo C, et al. The complex landscape of genetic alterations in mantle cell lymphoma. *Semin Cancer Biol* 2011;21(5):322-34.
58. Alizadeh AA, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403(6769):503-11.
59. Wright G, et al. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003;100(17): 9991-6.
60. Jacobsen ED, et al. Brentuximab vedotin demonstrates objective responses in a phase 2 study of relapsed/refractory DLBCL with variable CD30 expression. *Blood* 2015;125(9):1394-402.

61. Miyazaki K. CD5-positive DLBCL: molecular basis and treatment strategies. *Rinsho Ketsueki* 2015;56(8):1038-44.
62. Dong HY, et al. B-cell lymphomas with coexpression of CD5 and CD10. *Am J Clin Pathol* 2003;119(2):218-30.
63. Hummel M, et al. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med* 2006;354(23):2419-30.
64. Johnson NA, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol* 2012;30(28):3452-9.
65. Cordoba R, et al. The utility of multiparametric seven-color flow cytometry in the detection of double hit lymphoma in ascitic fluid samples. *Cytometry B Clin Cytom* 2015 [online].
66. Sehn LH, Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood* 2015;125(1):22-32.
67. Said JW. Aggressive B-cell lymphomas: how many categories do we need? *Mod Pathol* 2013;26 Suppl 1: S42-56.
68. Dimopoulos MA, Anagnostopoulos A. Waldenstrom's macroglobulinemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005;18(4):747-65.
69. Paiva B, et al. The cellular origin and malignant transformation of Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood* 2015;125(15):2370-80.
70. Wang H, et al. Temporal and geographic variations of Waldenstrom macroglobulinemia incidence: a large population-based study. *Cancer* 2012;118(15):3793-800.
71. Hanzis C, et al. Associated malignancies in patients with Waldenstrom's macroglobulinemia and their kin. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2011;11(1):88-92.
72. Morice WG, et al. Novel immunophenotypic features of marrow lymphoplasmacytic lymphoma and correlation with Waldenstrom's macroglobulinemia. *Mod Pathol* 2009;22(6):807-16.

73. Tabata R, et al. CD20-negative low-grade B cell lymphoma showing immunophenotypic and genotypic features resembling plasma cell myeloma. *Pathol Res Pract* 2013;209(7):459-62.
74. Chang H, et al. Prognostic relevance of 6q deletion in Waldenstrom's macroglobulinemia: a multicenter study. *Clin Lymphoma Myeloma* 2009;9(1):36-8.
75. Xu L, et al. Detection of MYD88 L265P in peripheral blood of patients with Waldenstrom's Macroglobulinemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leukemia* 2014;28(8):1698-704.
76. Shao H. et al. Distinguishing hairy cell leukemia variant from hairy cell leukemia: development and validation of diagnostic criteria. *Leuk Res* 2013;37(4):401-9.
77. Cornet E, et al. Recommendations of the SFH (French Society of Haematology) for the diagnosis, treatment and follow-up of hairy cell leukaemia. *Ann Hematol* 2014;93(12):1977-83.
78. Tiacci E, et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med* 2011;364(24):2305-15.
79. Johnson PW, et al. Patterns of survival in patients with recurrent follicular lymphoma: a 20-year study from a single center. *J Clin Oncol* 1995;13(1):140-7.
80. Kridel R, Sehn LH, Gascoyne RD. Pathogenesis of follicular lymphoma. *J Clin Invest* 2012;122(10):3424-31.
81. Pastore A, et al. Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *Lancet Oncol* 2015;16(9):1111-22.

## 6 ARTIGO

Original article

Quantitative flow cytometric evaluation of CD200, CD123, CD43 and CD52 as a tool for the differential diagnosis of B-cell chronic lymphoproliferative disorders.

De Mattos, E.M.A.<sup>1</sup>; Marcondes, N.A.<sup>1</sup>; Fernandes, F.B.<sup>2</sup>; Faulhaber, G.A.M.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup> Laboratório de Hematologia Zanol, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup> Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Corresponding author

Elissandra Machado Arlindo de Mattos

Rua Ramiro Barcelos, 2350. CEP 90 035-903. Porto Alegre, RS, Brazil.

Telephone/fax: 55 51 3359-8315

E-mail: earlindo@hcpa.edu.br

Key-terms: B-cell neoplasm, flow cytometry, differential diagnosis, immunophenotyping

## Abstract

**Background:** Distinction between B-cell chronic lymphoproliferative disorders (BCLDs) can be difficult due to the overlap of cell morphology and immunologic features. We investigated whether adding four monoclonal antibodies to a quantitative flow cytometry panel is useful for differential diagnosis and characterization of these disorders.

**Methods:** We analyzed the expression of CD52, CD200, CD123 and CD43 from 124 patients with BCLDs. The quantitative estimation of these antigens per cell was assessed in mean fluorescence intensity (MFI).

**Results:** The diseases of the 124 patients investigated comprised: 81(65%) chronic lymphocytic leukemia (CLL), 17 (13%) marginal zone lymphoma (MZL), 9 (7,2%) lymphoplasmacytic lymphoma (LPL), 6 (4,8%) mantle cell lymphoma (MCL), 2 (1,6%) hairy cell leukemia (HCL), 2 (1,6%) hairy cell leukemia variant (HCLv), 5 (4,0%) follicular lymphoma (FL), 1 (0,8%) Burkitt lymphoma (BL) and 1(0,8%) diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). CD200 median MFI expression was 46.8 (range: 1.5-334). CD200 was higher in HCL (including HCLv) and CLL cells (85 and 61.2 respectively). HCLv was different in CD200 MFI, when compared to classical HCL (median 36.1 versus 220.3). The same difference in CD123 expression was observed when comparing HCL versus HCLv. We found that cases of MZL exhibited a median MFI of 7.1 for CD43 (range: 1.1-106), in contrast to cases of mantle cell lymphoma (MCL) and CLL, which had median MFIs for CD43 of 90 and 176, respectively. The comparison of CD52 intensity between CLL and marginal zone lymphoma (MZL) samples showed a statistically significant difference with a median MFI of 777.5 versus 1297.0 (P=0.04).

**Conclusion:** Our results suggest that these markers may be a useful additional tool to better identify some types of BCLDs.

## Background

Chronic lymphoproliferative neoplasms comprise a broad spectrum of disorders with different morphology, clinical aspects, genetics and immunophenotypes. However, they show in common a more mature lymphoid progenitor than immature precursor neoplasms.[1] B-cell chronic lymphoproliferative diseases (BCLPD) account for around 80% of all lymphoid neoplasms. According to WHO, the immunophenotypic similarity of these cells at a certain stage of maturation differentiation in conjunction with morphological, genetic and clinical findings allows these diseases to be classified and diagnosed.

Immunophenotyping by flow cytometry is fast and cost-effective technique widely used for the diagnosis and management of many hematologic disorders. Particularly in BCLPDs, multiparametric flow cytometry (MFC) has become increasingly complex due to the availability of many markers and large panels, in addition to the high number of entities according to the WHO. Usually, the analysis is performed separately for each aliquot labeled with four to eight monoclonal antibodies, an expert interprets the immunophenotypic profile of neoplastic B cells and specifies a diagnosis. The markers that are most commonly used are those able to differentiate B lymphocytes from other cells, in addition to identifying aberrations and markers present in certain specific maturation stages. Among them are the pan B-markers CD19, CD20, and those used for differential diagnosis, CD10, CD5, CD103, CD43, CD23, CD49d, CD81, CD200, CXCR5, IgM, Kappa, Lambda, etc. Although widely studied, a differential diagnosis can be challenging, due to overlapping immunophenotypic features and similar clinical manifestations, such as cases of differentiation between lymphoplasmacytic lymphoma and marginal zone lymphoma or diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma.

Some markers are known for their expression in B-cell chronic lymphoproliferation, as the positivity of CD52 [2], negativity of CD43 in LZM [3], the usefulness of CD200 in the differential diagnosis between LLC and LM [4], and the role of CD123 in the diagnosis of hairy cell leukemia. [5, 6] However, the quantitative analysis of these markers in different BCLPDs is seldom discussed, and its expression may be involved not only in differential diagnosis, but also in prognostic and potentially therapeutic factors, given the existence of target drugs against some of these markers.

## Methods

All mature types of B-cell lymphoproliferative disease diagnosed in a reference laboratory in the south of Brazil were consecutively included in the project. Specimens sent to reassessment were excluded. The study was approved by the local ethics committee.

Samples of 50 to 100µl were incubated for 20 minutes in the dark at room temperature with 5 µl of each monoclonal antibody, according to the recommendations of the manufacturer. The panel with the four markers under study was distributed in the following fluorescences, CD123FITC, CD52PE, CD43 APC and CD200 PerCP-Cy5.5, all from Becton Dickinson Biosciences (BDB, San Jose, CA, USA).

Immediately after preparation, the data were acquired on a FACS Calibur flow cytometer using the Cell Quest software (BDB, San Jose CA, USA). About 100,000 events per sample were obtained. To analyze the data, the Infinicity™ Flow Cytometry version 1.7 software (Cytognos, SL, Salamanca, Spain) was used. For gating strategy, debris were removed, based on forward-scatter (FSC) and side-scatter (SSC) distribution. Neoplastic cells were initially identified through the positivity for CD19 and CD20, and then in accordance with the expression of other panel markers for BCLPD. The MFIs of diseased cells were expressed in arbitrary units from 0 to 10<sup>4</sup>.

The reproducibility of the fluorescence intensities was preserved by calibration and quality control of cytometers used during the study. Calibrite beads (BDB, San Jose CA, USA) were used in order to ensure standardization. The diagnosis was established in accordance with the immunophenotypic pattern, in conjunction with clinical data. Cases with inconclusive immunophenotypes were confirmed by reviewing immunohistochemical and pathological findings.

## Statistical analysis

Medians and interquartile ranges for each MFI of monoclonal antibodies were calculated. The nonparametric Kruskal-Wallis test was used to calculate the statistical

significance of differences observed between groups. P values <0.05 were considered significant. All statistical analyses were performed using SPSS 18.0 (SPSS, Chicago, IL).

## Results

Phenotypic analysis was performed on a total of 124 samples, 67 of peripheral blood and 57 of bone marrow in EDTA anticoagulant from 124 patients diagnosed with B-cell chronic lymphoproliferative disease from October 2014 to June 2015.

Patient mean age was 71 years old (range: 26-94 years old), 52% were men and 48%, women. The rate of neoplastic B cells amid the total of cells per sample ranged from 4% to 97%, averaging 52%. The distribution of different diagnoses of BCLPDs is described in Table 2. The most common diagnosis, as expected, was chronic lymphocytic leukemia (CLL), due to its high prevalence, and the rarest were Burkitt's lymphoma (BL) and diffuse large B cell lymphoma (DLBCL).

The median MFI for each monoclonal antibody (MoAb) between different groups of lymphomas, as classified by WHO, is shown in Table 1.

In assessing the CD200 marker expression, we can highlight the high fluorescence intensities in CLL and HCL as can be seen in Graph 1. A statistical difference was found between the expression in MCL *versus* CLL (median MFI: 61.2 vs. 3.5; P <0.001). A difference was also identified between the lowest expressions of this marker in MCL compared to HCL (median MFI: 3.5 vs. 85.0; P = 0.016). The median expression of CD200 in MCL (median MFI: 3.5; range: 1.5 - 11.8), in MZL (median MFI: 7.6, range: 2.3 - 42.9) and in LPL (median MFI: 14, range: 6.2 - 50) was significantly lower when compared to HCL and CLL. Although no statistical power was shown to differentiate between these two conditions, the median MFI for hairy cell leukemia (220.3; range: 105.9 to 334.7) proved to be about 6 times higher when compared to HCLv. (36.1; range: 8.1 - 64.1), as shown in Figure 1. Lymphoproliferative disorders that were usually positive for CD10 (BCLPD, FL, BL) showed much lower MFIs for this marker than CD10-negative BCLPDs.

CD123 analysis allowed greater MIFs to be identified in HCL, as shown in graph 2. A statistical difference was observed when comparing CLL and MZL (median MFI: 7.9;

range: 2.5 - 16.4 *versus* median MFI: 12.3; range: 6.1 - 22.2,  $P = 0.009$ ). The MFI of CD123 was lower in LPL when compared to that of MZL (9 *versus* 12.3), but this difference was not significant. Similarly to CD200, the MFI of CD123 was shown to be higher in the comparison between HCL and HCL-v.

Graph 3 illustrates the expression of CD43 in which it was possible to verify that the highest MFI values were identified in CLL (MFI: 176.9; range: 3.4 - 472.7) and in MCL (median MFI: 90 0; range: 12.4 - 442.3). However, one case of CLL and one case of mantle cell lymphoma had very low expression when compared to other cases of these neoplasms. All FL cases showed expressions below 15 (median MFI: 6.6), as shown in Figure 2. The MFIs of SMZL (median: 7.1) and LPL (median: 20.7) were significantly lower when compared to CLL and MCL.

CD52 expression was consistently positive among all BCLPDs, as shown in Graph 4. Only one MFI value was lower than 100. The highest MFIs values were identified in HCL (median MFI: 956.4; range: 421-1559) and SMZL (median MFI: 1297.6; range: 358-2368), and no statistical difference was identified between SMZL and MZL. MZL seems to have higher values than LPL (897.0 *versus* 1297.6), but 2 cases of LPL had an MFI above 1200 and 3 MZL cases MFIs had values below 1200. The MFI in CLL (777.5; range: 68-1938) was significantly lower than in MZL (median MFI: 1297.6; range: 358-2368).

## **Discussion**

CD52 is a cell surface glycoprotein whose function is poorly known and is expressed in lymphocytes, monocytes, macrophages and a few dendritic cells. [7] Its expression has been described in several BCLPDs, its presence involves specific treatments for diseases such as CLL and LPL.[2, 8, 9] This study identified the expression of this marker in 100% of analyzed neoplasms. Although our results seem to be in contrast with those identified by other studies, such as Rodig et al., who found negativity for some diseases such as BL and DLBCL, the lowest MFIs in our sample were exactly in BL and DLBCL. In agreement with other studies, diseased cells with plasmacytic differentiation, as in LPL, show far lower fluorescence intensities when compared with

other neoplasms. [2] Unlike what was identified by a study analyzing the quantitative expression of CD52 in BCLPDs, our results showed lower values in CLL than in MCL, possibly explained by the high variability of this marker in MCL and the low frequency of this neoplasm in our sample. [10] Another study analyzing 21 MCL cases identified that only 60% were positive for CD52, but the difference in the immunohistochemical technique used by that study may explain the difference in results.

According to a previous study, CD43 expression showed no difference between CD10-positive lymphoproliferative disorders (FL, BL and DLBCL), one of the most complicated differential diagnoses; however, the analysis of this group was impaired by its low frequency [11]. All 5 cases of FL had extremely low expressions when compared to CLL and MCL. The only case of DLBCL expressed this marker in intermediate intensity, and the presence of this marker is associated with poor prognosis, as described by previous studies. [12]

During the ontogeny of B cells, CD43 is expressed in early stages and is lost in intermediate stages, being expressed once again in plasma cells and activated B cells. [13] In agreement with the literature, our results showed higher expression in CLL and MCL, and low expression in MZL, probably owing to clonality in the intermediate stage of the disease. However, caution should be taken in the interpretation of these data with respect to the differential diagnosis of MCL *versus* CD5 +MZL, since one MCL case (16%) showed low expression of this marker, similar to MZL, and one MZL case (5.8%) showed intermediate expression similar to that in MCL.

CD200 is a membrane glycoprotein of the immunoglobulin superfamily, expressed in dendritic cells, neurons, and T lymphocytes. [14] Different research groups have identified the usefulness of this marker in the differential diagnosis of CLL *versus* MCL, including one of them in the Brazilian population. [15] Similar results were confirmed in the analyzed sample, and although a CLL case showed low expressions of this marker, 100% of MCL cases had significantly lower expressions than CLL. As previously described in the immunohistochemical analysis by Pillai et. al., this marker can be extremely helpful in the differential diagnosis between HCL and HCLv, which is in agreement with the results found in this work, and adding flow cytometry data, as, in our sample, HCL cases had higher expression than its variant form. [16] Due to the low frequency of atypical CLL, it was not possible to identify a significant difference in the

expression of this marker when compared to CLL, although in 3 atypical CLL cases the CD200 expression was lower than in CLL in one case only, although not at intensities as low as in MCL.

CD200 appears to be useful in the differential diagnosis between CD5 + LPL and CLL, as it was lower in the former than in the latter; however, if analyzed qualitatively, this difference could not have been noted, since 30% of cases showed intermediate positivity, in agreement with what was described in a previous study analyzing the expression of this marker by immunohistochemistry. [17] CD200 has also been described as useful to differentiate between CLL and MZL, our results confirm these findings described by immunohistochemistry, due to the lower expression of this marker in MZL and SMZL. [14]

CD123 is a subunit of the interleukin-3 receptor. [18] It has been described in several hematological neoplasms, and recently its expression was studied quantitatively in MFI by Garcia-Dabrio et. al correlating its implication in prognostic factors in de novo AML. [19] The results showed agreement with previous studies investigating the higher expression of this marker in HCL compared to HCLv. [20] A study analyzing 114 HCL cases and 20 HCLv cases found strong uniform positivity for 100% of HCL cases and lower or negative expressions in HCLv [5] Comparing the results of that study with ours, we can see higher prevalence of positivity for CD123 in MCL, since 33% of those cases had weak positivity, and in this study the expression of MFI was slightly higher than in other lymphoproliferative disorders in only 11% of cases. Our results identified higher expression of this marker in MZL compared to CLL and LPL, no quantitative data were found in the literature that could allow comparisons, though a study analyzing 9 cases of SMZL found only one case with weak positivity for this marker and negativity in others. If we converted our data into qualitative data, we would be able to note intermediate positivity in 5 of 17 cases of MZL and MFIs 50% higher than in CLL.

Because fluorescence intensity measures are important determinants in the analysis of leukemias and lymphomas [21], reliable methods for measuring MFI are important for the correct data interpretation, and, consequently, correct classification of hematological malignancies. For this reason, terms as “weak” and “strong” are useful, but, as Henderson et al. suggested, perhaps quantitative terms could be used in order to further explore the information provided. [22]

However, there are numerous variables involved in the quantitative determination of fluorescence intensity, some related to the specificity in the chosen antibody, sample type, anticoagulant employed, auto fluorescence, type of fixation, cytometer compensation and unit of measure used to report the data, among others. And even when all these variables are well controlled, some caution in interpreting the data should be taken, but given the increasing universal standardization in the field of immunophenotyping, this type of analysis may gain ground, allowing for comparative figures with greater safety over time.

Until then, each center can develop the use of data in MFI according to their case series, in addition to using the data available in the literature from other laboratories comparatively, as long as critically and understanding the limitations to this type of analysis.

We conclude that our results allow us to verify the usefulness of already known markers in mature lymphoproliferation disorders such as CD200 in the differential diagnosis of CLL and MCL, and CD123 in HCL *versus* HCLv, and suggest the usefulness of more complex analyzes by quantifying MFI, in the differential diagnosis of BCLPDs for some lymphoproliferative disorders as in CD52 expression in MZL *versus* LPL, and CD43 expression in MZL and LPL compared to MCL and CLL. Nevertheless, these results should be further explored in analyses using a larger sample of these neoplasms.

### Literature cited

1. Swerdlow SH. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.
2. Rodig SJ, et al. Heterogeneous CD52 expression among hematologic neoplasms: implications for the use of alemtuzumab (CAMPATH-1H). *Clin Cancer Res*, 2006. 12(23): p. 7174-9.
3. Berger F, et al. Non-MALT marginal zone B-cell lymphomas: a description of clinical presentation and outcome in 124 patients. *Blood*, 2000. 95(6): p. 1950-6.
4. Palumbo GA, et al. CD200 expression may help in differential diagnosis between mantle cell lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*, 2009. 33(9): p. 1212-6.
5. Venkataraman G, et al. Characteristic CD103 and CD123 expression pattern defines hairy cell leukemia: usefulness of CD123 and CD103 in the diagnosis of mature B-cell lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol*, 2011. 136(4): p. 625-30.
6. Del Giudice I, et al. The diagnostic value of CD123 in B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. *Haematologica*, 2004. 89(3): p. 303-8.
7. Hale, G, et al. The CAMPATH-1 antigen (CDw52). *Tissue Antigens*, 1990. 35(3): p. 118-27.
8. Rossmann, ED, et al. Variability in B-cell antigen expression: implications for the treatment of B-cell lymphomas and leukemias with monoclonal antibodies. *Hematol J*, 2001. 2(5): p. 300-6.
9. Owen RG, Hillmen P, Rawstron AC. CD52 expression in Waldenstrom's macroglobulinemia: implications for alemtuzumab therapy and response assessment. *Clin Lymphoma*, 2005. 5(4): p. 278-81.
10. Klabusay M, et al. Different levels of CD52 antigen expression evaluated by quantitative fluorescence cytometry are detected on B-lymphocytes, CD 34+ cells and tumor cells of patients with chronic B-cell lymphoproliferative diseases. *Cytometry B Clin Cytom*, 2007. 72(5): p. 363-70.
11. Schniederjan SD, et al. A novel flow cytometric antibody panel for distinguishing Burkitt lymphoma from CD10+ diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*, 2010. 133(5): p. 718-26.

12. Ma XB, et al. CD43 expression in diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified: CD43 is a marker of adverse prognosis. *Hum Pathol*, 2015. 46(4): p. 593-9.
13. Wiken M, et al. Induction of CD43 expression during activation and terminal differentiation of human B cells. *Scand J Immunol*, 1988. 28(4): p. 457-64.
14. Dorfman DM , Shamsafaei A. CD200 (OX-2 membrane glycoprotein) expression in b cell-derived neoplasms. *Am J Clin Pathol*, 2010. 134(5): p. 726-33.
15. Sandes AF, et al. CD200 has an important role in the differential diagnosis of mature B-cell neoplasms by multiparameter flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*, 2013.
16. Pillai V, et al. CD200 flow cytometric assessment and semiquantitative immunohistochemical staining distinguishes hairy cell leukemia from hairy cell leukemia-variant and other B-cell lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol*, 2013. 140(4): p. 536-43.
17. Alapat D, et al. Diagnostic usefulness and prognostic impact of CD200 expression in lymphoid malignancies and plasma cell myeloma. *Am J Clin Pathol*, 2012. 137(1): p. 93-100.
18. Moretti S, et al. CD123 (interleukin 3 receptor alpha chain). *J Biol Regul Homeost Agents*, 2001. 15(1): p. 98-100.
19. Garcia-Dabrio MC, et al. Complex measurements may be required to establish the prognostic impact of immunophenotypic markers in AML. *Am J Clin Pathol*, 2015. 144(3): p. 484-92.
20. Stetler-Stevenson M, Tembhare PR. Diagnosis of hairy cell leukemia by flow cytometry. *Leuk Lymphoma*, 2011. 52 Suppl 2: p. 11-3.
21. Borowitz MJ, et al. U.S.-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: data analysis and interpretation. *Cytometry*, 1997. 30(5): p. 236-44.
22. Henderson LO, et al. Terminology and nomenclature for standardization in quantitative fluorescence cytometry. *Cytometry*, 1998. 33(2): p. 97-105.

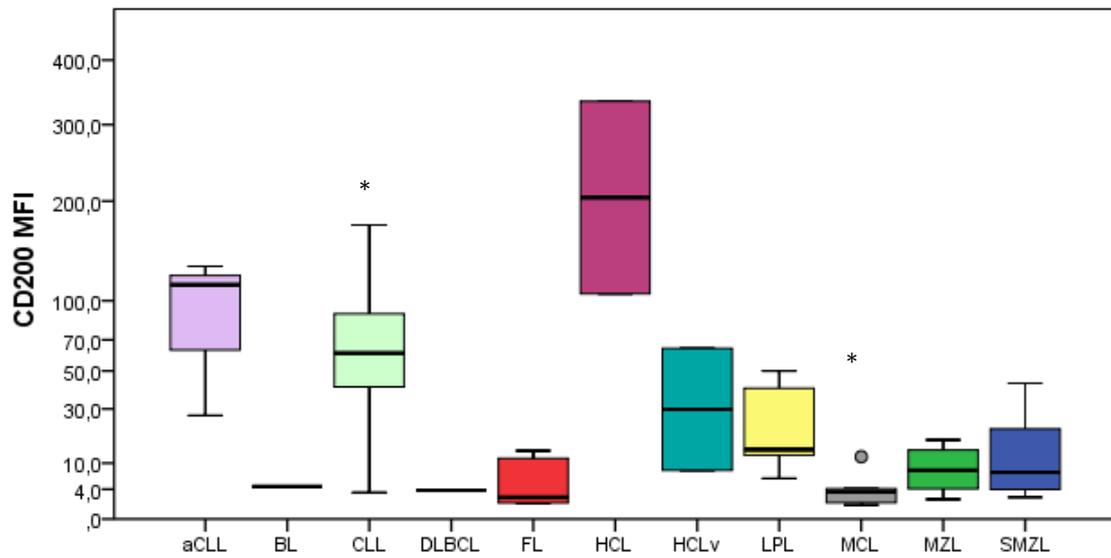
**Table 1.** Median MFI values per disease category.

B cell neoplasm									
	MZL	CLL	BL	DLBCL	FL	HCL	HCLv	LPL	MCL
Marker									
<b>CD123</b>	12,3	7,9	5,8	6,1	6,3	83,1	21,9	9,0	13,8
<b>CD52</b>	1297,6	777,5	142,9	549,5	686,0	956,4	990,3	697,0	704,5
<b>CD200</b>	7,6	61,2	4,5	3,8	2,6	220,3	36,1	14,0	3,5
<b>CD43</b>	7,1	176,9	56,9	160,9	6,7	79,0	14,5	20,7	90,0

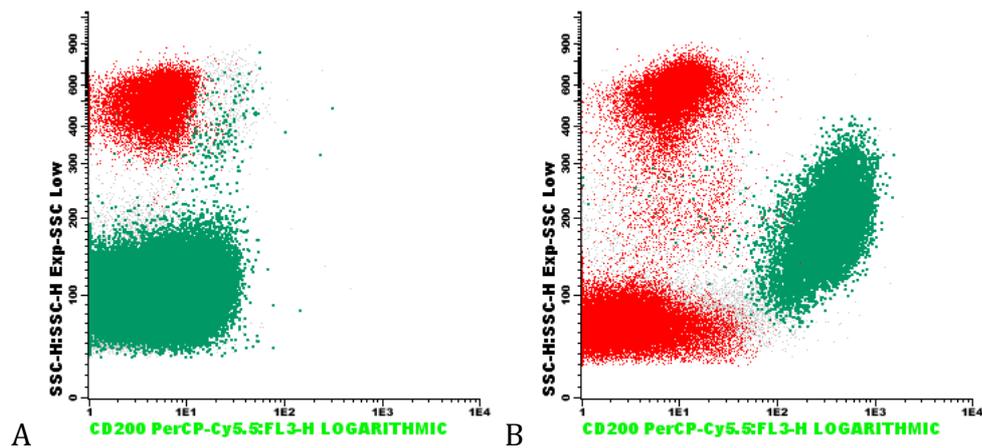
**Table 2.** Percent distribution of B-cell lymphoproliferative disorders.

Diagnosis	Number of cases	(%)
aCLL	3	2,4
CLL	79	63,2
BL	1	0,8
DLBCL	1	0,8
FL	4	3,2
HCL	2	1,6
HCLv	2	1,6
LPL	9	7,2
MCL	6	4,8
MZL	17	13,6

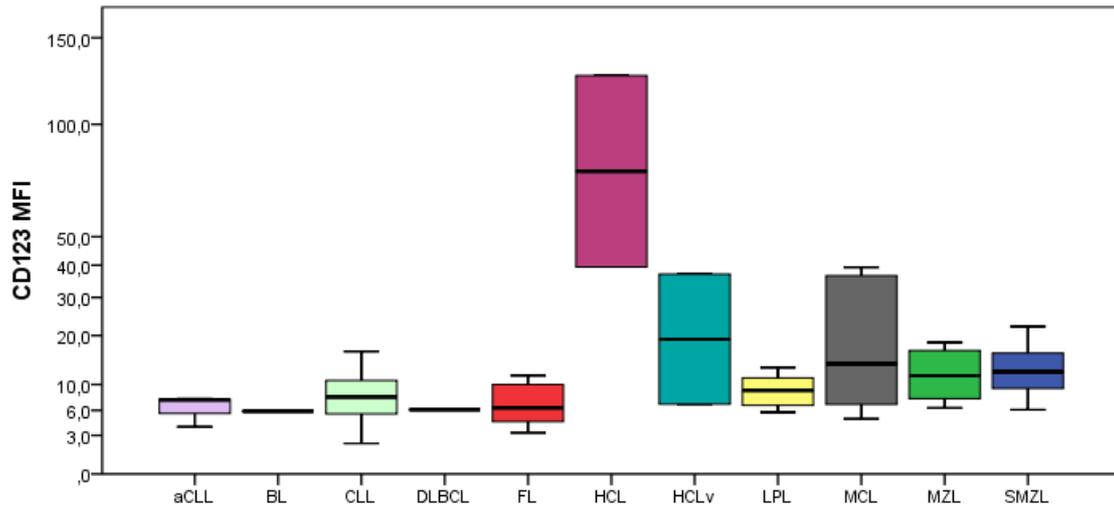
Abbreviations: BL: Burkitt lymphoma, aCLL: atypical chronic lymphocytic leukemia, CLL: chronic lymphocytic leukemia, DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma, FL: follicular lymphoma, HCL: hairy cell leukemia, HCLv: hairy cell leukemia variant, LPL: lymphoplasmacytic lymphoma, MCL: mantle cell lymphoma, MZL: marginal zone lymphoma, SMZL splenic marginal zone lymphoma.



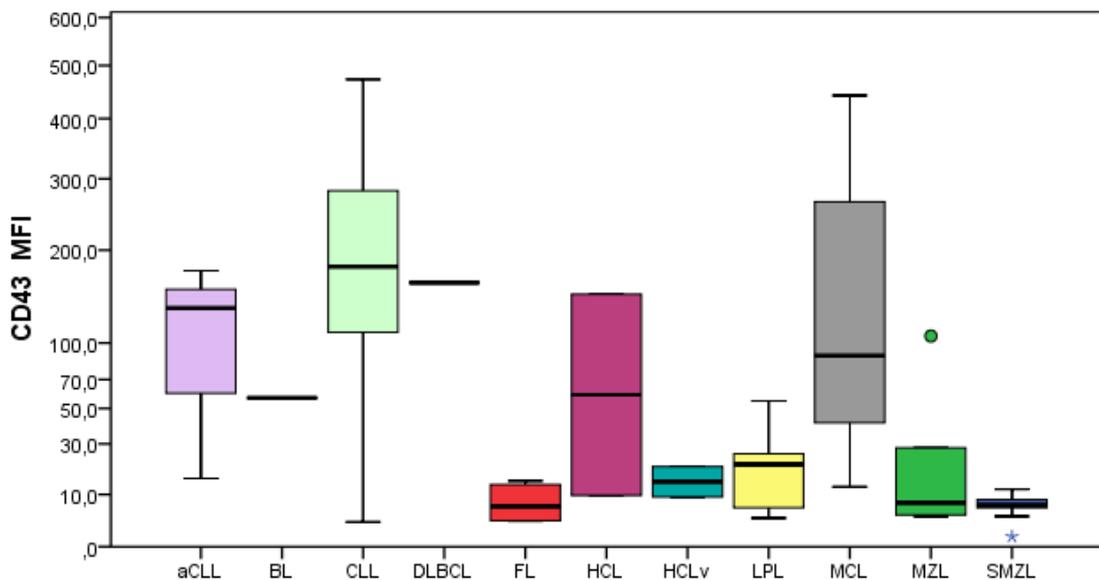
**Graph 1.** A boxplot illustrates the MFI of CD200 on 124 cases of B-cell lymphomas. Abbreviations: BL: Burkitt lymphoma, aCLL: atypical chronic lymphocytic leukemia, CLL: chronic lymphocytic leukemia, DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma, FL: follicular lymphoma, HCL: hairy cell leukemia, HCLv: hairy cell leukemia variant, LPL: lymphoplasmacytic lymphoma, MCL: mantle cell lymphoma, MZL: marginal zone lymphoma, SMZL splenic marginal zone lymphoma.



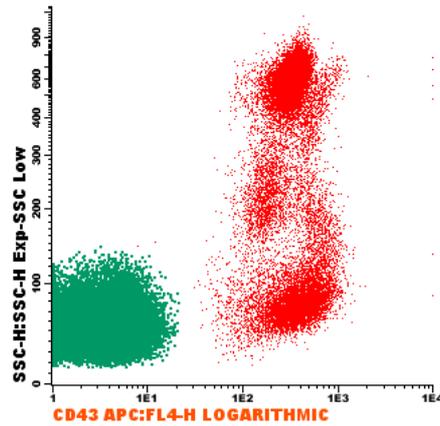
**Figure 1.** Flow cytometric immunophenotypic detection of CD200 expression (green population). A. Hairy cell leukemia variant (HCLv). B. Hairy cell leukemia (HCL).



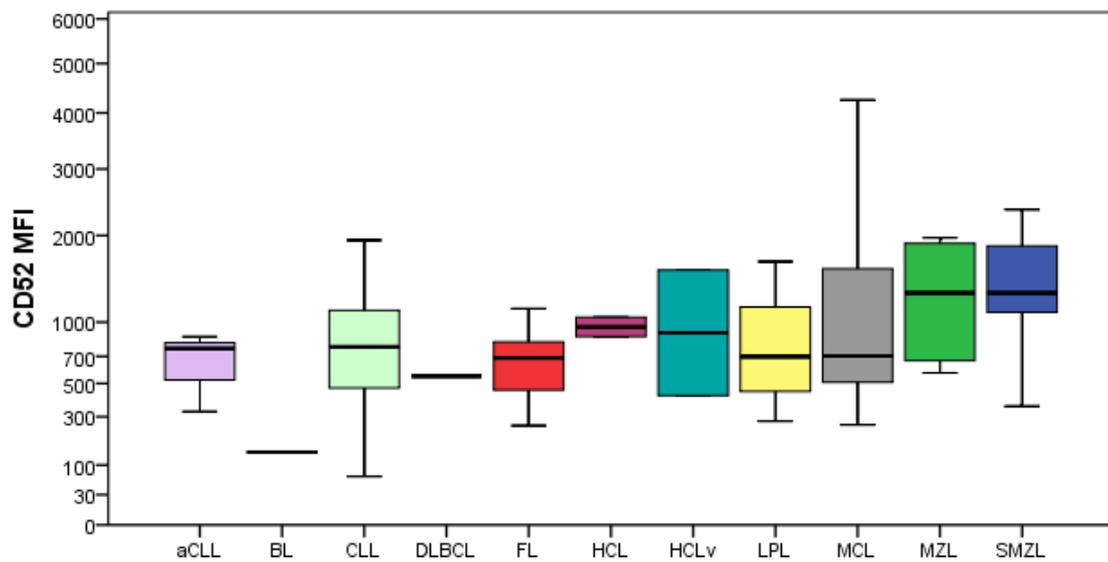
**Graph 2.** A boxplot illustrates the MFI of CD123 on 124 cases of B-cell lymphomas. Abbreviations: BL: Burkitt lymphoma, aCLL: atypical chronic lymphocytic leukemia, CLL: chronic lymphocytic leukemia, DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma, FL: follicular lymphoma, HCL: hairy cell leukemia, HCLv: hairy cell leukemia variant, LPL: lymphoplasmacytic lymphoma, MCL: mantle cell lymphoma, MZL: marginal zone lymphoma, SMZL splenic marginal zone lymphoma.



**Graph 3.** A boxplot illustrates the MFI of CD43 on 124 cases of B-cell lymphomas. Abbreviations: BL: Burkitt lymphoma, aCLL: atypical chronic lymphocytic leukemia, CLL: chronic lymphocytic leukemia, DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma, FL: follicular lymphoma, HCL: hairy cell leukemia, HCLv: hairy cell leukemia variant, LPL: lymphoplasmacytic lymphoma, MCL: mantle cell lymphoma, MZL: marginal zone lymphoma, SMZL splenic marginal zone lymphoma.



**Figure 2.** CD43 expression on follicular lymphoma (green population).



**Graph 4.** A boxplot illustrates the MFI of CD52 on 124 cases of B-cell lymphomas. Abbreviations: BL: Burkitt lymphoma, aCLL: atypical chronic lymphocytic leukemia, CLL: chronic lymphocytic leukemia, DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma, FL: follicular lymphoma, HCL: hairy cell leukemia, HCLv: hairy cell leukemia variant, LPL: lymphoplasmacytic lymphoma, MCL: mantle cell lymphoma, MZL: marginal zone lymphoma, SMZL splenic marginal zone lymphoma.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo permitiu formular as seguintes conclusões:

1. CD200 é útil no diagnóstico diferencial entre duas linfoproliferações com imunofenótipo semelhantes, o linfoma do manto e a leucemia linfocítica crônica, esse marcador é expresso em intensidades maiores na primeira com relação à segunda doença.

2. CD200 parece ser diferentemente expresso da tricoleucemia e na tricoleucemia variante, podendo ser utilizado em conjunto com achados dos marcadores CD103, CD11c e CD25.

3. O marcador CD52 quando analisado de forma quantitativa, permitiu verificar diferença na expressão entre leucemia linfocítica crônica e linfoma de zona marginal. Esse marcador pouco é utilizado em painéis de linfoproliferações B, e pode ser útil no diferencial entre leucemia linfocítica crônica atípica e linfoma de zona marginal, neoplasias com imunofenótipos semelhantes e de difícil classificação.

4. CD123 mostrou-se um marcador útil no diagnóstico diferencial da tricoleucemia com relação as demais doenças linfoproliferativas B crônicas.

5. CD43 apresenta intensidades de fluorescência menores nos linfomas linfoplasmocítico e no linfoma de zona marginal com relação ao linfoma do manto e a leucemia linfocítica crônica, e pode ser utilizado como ferramenta adicional no diagnóstico diferencial dessas doenças em sua apresentação atípica, por exemplo, leucemia linfocítica crônica atípica *versus* linfoma de zona marginal, ou linfoma linfoplasmocítico *versus* leucemia linfocítica crônica.

## 8 ANEXOS

### Anexo A

#### Instrumento de coleta de dados

Nome: \_\_\_\_\_ Número: \_\_\_\_\_

Prontuário: \_\_\_\_\_ Data de Nascimento: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Procedência: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_

Diagnóstico: \_\_\_\_\_

#### Marcadores:

População clonal \_\_\_\_\_ %

CD43 \_\_\_\_\_

CD52 \_\_\_\_\_

CD200 \_\_\_\_\_

CD123 \_\_\_\_\_

#### Informações clínicas:

---

---

---

---

---

---