Ana Cláudia Frota Machado de Melo Lopes

O microambiente no linfoma de Hodgkin: um estudo sobre as subpopulações
de células T e macrófagos em neoplasias EBV positivas e negativas

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

Programa de Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cláudia Nogueira Zerbini

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011.

A versão original encontra-se na biblioteca da FMUSP.

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Lopes, Ana Claudia Frota Machado de Melo
O microambiente no linfoma de Hodgkin : um
estudo sobre as subpopulações de células T e
macrófagos em neoplasias EBV positivas e negativas /
Ana Claudia Frota Machado de Melo Lopes. -- São
Paulo, 2021.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.
Orientadora: Maria Cláudia Nogueira Zerbini.

Descritores: 1.Linfoma de Hodgkin
2.Microambiente tumoral 3.Macrófagos 4.Linfócitos T
5.Vírus Epstein Baar 6.Prognóstico

USP/FM/DBD-058/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista a Deus em primeiro lugar, sempre, a Maria minha mãe e ao meu anjo da guarda que não me deixaram cair, iluminaram meu caminho, me deram forças e me levaram até o final.

Aos meus pais, obrigada pelo dom da vida, por todo o carinho, cuidado e amor (que é muito), por acreditarem em mim mais do que eu mesma e por tentarem entender que eu sou um passarinho, um canarinho amarelo, que gosta de voar... Mas que mesmo assim tenta fazer de tudo para deixá-los orgulhosos. Obrigada por tudo! Obrigada por tanto!

Minha irmã Maria Cecília, o maior amor que mora em meu coração, a melhor parte da minha vida, obrigada por ser meu porto seguro, por se preocupar tanto comigo e por olhar para mim como se eu fosse a pessoa mais especial do universo; ao meu cunhado, Alisson, a quem amo como irmão, obrigada pelo carinho e cuidado ao longo de todos esses anos. Amo muito vocês dois!

Luciana, Júlia e Elysa, as grandes parceiras desta conquista, que cuidaram de mim, se preocuparam em me ajudar mesmo quando não podiam fazer nada, estiveram ao meu lado o tempo todo; tantas e tantas coisas passamos juntas. Espero que vocês saibam que sem vocês isso aqui não estaria acontecendo, esta vitória é muito de vocês também. Não tenho nem palavras para expressar minha gratidão por ter cruzado meu caminho com o de vocês. Obrigada, Obrigada, Obrigada!

Meus padrinhos, Lúcia e Michael, que foram os maiores incentivadores desta trajetória, que sempre me estimularam a crescer, ir pra frente e pra cima e, mais que isso, estiveram ao meu lado e me estenderam a mão sempre que precisei. Agradeço muito a Deus por ter me dado vocês como segundo lar. Nunca serei capaz de agradecer por tudo. Muito obrigada!

Ao meu afilhado Dominic e sua irmã Juliana (minha afilhada no coração), que chegaram para encher meus dias de sorrisos e meu coração de amor. Amo muito vocês!

Aos meus avós agradeço o carinho, amor e orações, obrigada por se fazerem tão presentes e pelo exemplo de vida e família que são. Agradeço também aos tios e primos que torceram pelo meu sucesso.

Ao Prof. Dr. Hercílio Martelli Júnior, que abriu as portas da iniciação científica (e da docência) e me ensinou a ter amor pela pesquisa e pela ciência. Com seus ensinamentos, meu mundo ficou diferente, maior, mais interessante. Muito obrigada pelo incentivo e pelo exemplo!

Aos meus alunos, àqueles que já tive e aos que virão, obrigada pelo incentivo à busca do conhecimento, por me desafiar e me estimularem a ser melhor a cada dia.

Aos meus pacientes, a quem dedico boa parte do meu tempo e atenção, mesmo que muitos de vocês não saibam quem sou, estarei sempre atrás do microscópio ou de algum livro tentando fazer o melhor por vocês, obrigada por confiarem em mim.

À Dra. Sheila Siqueira, pelo exemplo de dedicação e de profissional, por todo o cuidado e pela oportunidade de poder trabalhar perto e aprender com sua sabedoria e inteligência. À Dra. Vera Aldred, obrigada pelo carinho e por me dar minha primeira oportunidade.

Aos amigos que participaram da caminhada, principalmente às garotas da residência: Alice, Lorena, Daniela e Christiana. Obrigada pela compreensão, companheirismo e paciência.

Dra. Maria Cláudia, faltam-me palavras para lhe agradecer por tudo, por toda paciência, dedicação, conhecimento; além de ter o prazer de conviver com a senhora por todos esses anos, pude vivenciar, mais do que conhecimentos em patologia, o trato que a senhora tem com as pessoas que convive, como faz todos se sentirem bem quando estão interagindo com você. Foi um privilégio poder tê-la como mentora e me orgulho muito disso. Sempre vou tentar me inspirar na grande profissional e pessoa maravilhosa que você é. A senhora terá, para sempre, um lugar no meu coração! Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não teria sido possível sem a ajuda de diversas pessoas que emprestaram seu tempo para permitir que ele acontecesse. Segue aqui o meu muito obrigada a todos que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste projeto.

Ao Thiago, da secretaria da pós-graduação, que presta um trabalho inestimável para o caminhar do trabalho, sempre com atenção e carinho;

Às meninas do laboratório de Imuno-histoquímica, Ângela, Sandra e Esmeralda que, com excelência e um sorriso no rosto, foram fundamentais para a realização das reações e desenvolvimento da tese;

Aline Assato do LIM-14, pelo cuidado, precisão e diligência na preparação dos TMA's;

Aos funcionários do arquivo, pela ajuda no resgate do material;

Ao Dr. Tomás Barrese pela contribuição com insumos para o trabalho;

À prof. Dra. Vera Luiza Capelozzi pela orientação com as tabelas e pela disponibilização de insumos para o trabalho;

À Dra. Sheila Siqueira e ao laboratório do Hospital das Clínicas que disponibilizaram materiais para o projeto;

Luciana e Reginaldo que contribuíram grandemente com o escaneamento e digitalização das lâminas;

Ao Prof. Dr. Raymundo Azevedo Neto pelo trabalho estatístico;

Aos colegas Mário Piubelli e Jackson Barbosa pela valiosa contribuição no trabalho com os TMA's;

À Profa. Dra. Valéria Buccheri pelo apoio, orientações e por disponibilizar o banco de dados para a realização deste projeto;

Meu muito obrigada às examinadoras da banca do exame de qualificação, Dra. Yara de Menezes, Dra. Vera Capelozzi e Dra. Maria Irma Seixas Duarte pela análise crítica e sugestões valiosas;

Não posso deixar de agradecer à Universidade de São Paulo e ao Hospital das Clínicas. O período que passei nessas instituições foi o de maior aprendizado em minha vida; além de aprender a profissão que amo, pude vivenciar um processo de desconstrução e reconstrução que só foi possível graças às pessoas que ali estavam e que ali conheci, ao propósito de trabalho e energia que respiramos e, também, à vontade de ser grande, de fazer mais, de viver mais, que está presente em pessoas que fazem parte de algo grande como a USP. Obrigada por me dar a oportunidade de viver alguns dos melhores anos de minha vida (até então!).

*“Mire e veja: o mais importante e bonito, do mundo, é isto: que as
pessoas não estão sempre iguais, ainda não foram terminadas –
mas que elas vão sempre mudando”*

João Guimarães Rosa – Grande Sertão: Veredas

Normatização adotada

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

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Quadros

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Linfoma de Hodgkin.....	2
1.2.	Microambiente no LH.....	10
1.3.	Célula T auxiliar folicular.....	13
1.4.	Macrófagos M1 e M2.....	19
1.5.	Outras células inflamatórias e a fibrose no LH	21
1.6.	Infecção pelo EBV no LHC	23
1.7.	Justificativa do estudo	28
2.	OBJETIVOS	29
2.1.	Objetivo geral.....	30
2.2.	Objetivos específicos.....	30
3.	CASUÍSTICA E MÉTODOS	31
3.1	Casuística.....	32
3.2.	Métodos.....	33
3.2.1.	Protocolo clínico	33
3.2.2.	Avaliação de representatividade do material de biópsia de linfonodo, revisão do diagnóstico e classificação histológica	33
3.2.3.	Seleção das áreas de interesse e preparo do TMA.....	33
3.2.4.	Técnica imuno-histoquímica	37
3.2.5.	Análise da imunoexpressão para os diferentes anticorpos	40
3.2.6.	Análise das demais populações de células inflamatórias e fibrose.....	41
3.2.7.	Análise estatística.....	42
3.2.8.	Aspectos éticos.....	43
4.	RESULTADOS	44
4.1.	Avaliação dos dados clínicos e classificação histológica e sua associação com o status do EBV na neoplasia	45
4.2.	Distribuição topográfica da Imunomarcagem para células T (CD3) e subpopulações: T auxiliares (CD4), T citotóxicas (CD8) e T regulatórias (FOXP3) e sua associação com o status do EBV e os dados clínicos.....	47

4.3	Distribuição topográfica da imunomarcagem para células T auxiliares-foliculares (TFH) (CXCR 5 e PD-1) e sua associação com o status do EBV e os dados clínicos	51
4.4.	Estudo dos linfócitos B (CD20) e macrófagos (CD163 e CD68) no microambiente do linfoma de Hodgkin clássico	54
4.5.	Avaliação de outras populações de células inflamatórias (eosinófilos, neutrófilos e plasmócitos)e fibrose e sua associação com variáveis clínicas e status EBV no tumor	58
4.6.	Associação entre as células inflamatórias não linfoides e fibrose com as subpopulações de células linfoides e histiócitos em áreas próximas e distantes das células HRS	60
5.	DISCUSSÃO	62
5.1.	Desenho do estudo.....	63
5.2.	Características clínicas, subtipos histológicos e o status EBV da neoplasia	64
5.3.	Demais células do microambiente	65
5.4.	Perspectivas futuras frente aos novos conhecimentos	74
6.	CONCLUSÕES	75
7.	ANEXOS	78
	Anexo A - Parecer consubstanciado do CEP	79
8.	REFERÊNCIAS	82

Lista de abreviaturas

AD	Áreas distantes
Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
AP	Áreas próximas
Bcl-6	<i>B-cell lymphoma 6 protein</i>
BcR	Receptor de célula B
CCR-4	<i>C-C chemokine receptor type 4</i>
CDF	Célula dendrítica folicular
CG	Centro germinativo
CI	Célula inflamatória
CN	Célula neoplásica
CM	Celularidade mista
CMF	Citometria de fluxo
CXCR-5	<i>C-X-C chemokine receptor type 5</i>
EBER	<i>Epstein-Baar Enconding Region</i>
EBNA-1	<i>Epstein-Baar nuclear antigen 1</i>
EBNA-2	<i>Epstein-Baar nuclear antigen 2</i>
EBNA-3	<i>Epstein-Baar nuclear antigen 3</i>
EBV	Vírus <i>Epstein-Baar</i>
EC	Estádio clínico
EN	Esclerose nodular
HRS	Hodgkin e Reed Sternberg
ICOS	<i>Inductible T cell costimulator</i>
IL	Interleucina
IHQ	Imuno-histoquímica
JAK-STAT	<i>Janus kinases-signal transducer and activator of transcription proteins</i>
LH	Linfoma de Hodgkin
LHC	Linfoma de Hodgkin clássico
LHC-EBV-	Linfoma de Hodgkin clássico EBV negativo
LHC-EBV+	Linfoma de Hodgkin clássico EBV positivo
LHCM	Linfoma de Hodgkin clássico do tipo celularidade mista

LHDL	Linfoma de Hodgkin clássico do tipo depleção linfocitária
LHEN	Linfoma de Hodgkin clássico do tipo esclerose nodular
LHPLN	Linfoma de Hodgkin do tipo predominância linfocitária nodular
LHRL	Linfoma de Hodgkin clássico do tipo rico em linfócitos
LMP-1	<i>Latent membrane protein 1</i>
LMP-2	<i>Latent membrane protein 2</i>
MAT	Microambiente tumoral
MF	Macrófagos
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> - Complexo principal de histocompatibilidade
MI	Mononucleose infecciosa
NFκβ	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	<i>Natural killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PD-1	<i>Programmed cell death 1</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death ligand 1</i>
REAL	<i>Revised European American Classification of Lymphoid Neoplasms</i>
RL	Rico em linfócitos
T _{FH}	T <i>follicular helper</i> – T auxiliar folicular
T _{H1}	<i>T helper 1</i>
T _{H2}	<i>T helper 2</i>
T _{H17}	<i>T helper 17</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i> – Fator de transformação do crescimento
TMA	<i>Tissue microarray</i> – Microarranjos teciduais
TME	Tumor Microenvironment
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> – Fator de necrose tumoral
T _{REG}	Células T regulatórias
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i> - Fator inibidor da apoptose ligado ao X

Lista de Figuras

Figura 1 -	Mecanismos antiapoptóticos da célula HRS	3
Figura 2 -	A célula HRS em seu microambiente mostrando a diversidade de células que compõem o microambiente celular no LH	10
Figura 3 -	Representação esquemática de interação entre as células HRS e o microambiente tumoral no LHC.....	12
Figura 4 -	Diferenciação da célula T _{FH}	14
Figura 5 -	Blocos de parafina para seleção de <i>spots</i> de TMA	34
Figura 6:	Bloco de parafina final do TMA	36
Figura 7 -	Fotografia panorâmica de corte histológico do bloco de TMA.....	36
Figura 8 -	Planilha do excel com mapa mostrando correspondência de cada caso com o <i>spots</i> do TMA	39
Figura 9 -	<i>Spot</i> do TMA representando imunomarcacão do CD8.....	49
Figura 10 -	<i>Spot</i> do TMA mostrando imunomarcacão do CXCR-5. (Aumento de 2000x)	52
Figura 11 -	<i>Spot</i> do TMA mostrando imunomarcacão para PD-1 (aumento 2000x)	53

Lista de Quadros

Quadro 1 - Sistema de estadiamento revisado para os linfomas nodais primários	6
Quadro 2 - Padrões de latência do EBV e neoplasias relacionadas.....	27
Quadro 3 - Especificações relativas aos anticorpos primários	37

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Características clínicas e subtipo histológico nos diferentes status EBV	46
Tabela 2 - Associação entre variáveis clínicas e imunomarcadores de células T (CD3), células T Helper (CD4), células T citotóxicas (CD8) e células T Regulatórias (FoxP3)	50
Tabela 3 - Relação entre variáveis clínicas, EBV e subtipo histológico, e imunomarcadores de células status T _{FH} (CXCR-5 e PD-1)	51
Tabela 4 - Associação entre as variáveis clínicas e as populações de células B (CD20) e macrófagos (CD163 e CD68)	56
Tabela 5 - Associação entre variáveis clínicas e status EBV, e células inflamatórias não linfoides (eosinófilos, plasmócitos e neutrófilos), fibrose e necrose - Mean Rank	59
Tabela 6 - Associação entre a fibrose e células inflamatórias não linfoides (eosinófilos, plasmócitos e neutrófilos) e as subpopulações celulares de linfócitos T (CD3), linfócitos B (CD20), Macrófagos (CD68 e CD163), linfócitos T _{fh} (CXCR5 e PD-1) e linfócitos T _{REG} (FoxP3), em áreas próximas e distantes das células HRS	61

Resumo

Lopes ACFMM. *O microambiente no linfoma de Hodgkin: um estudo sobre as subpopulações de células T e macrófagos em neoplasias EBV positivas e negativas* [tese] Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2021.

Introdução e justificativa - O linfoma de Hodgkin (LH) é uma neoplasia de células B peculiar por ser composta por apenas 1% de células neoplásicas (CN), com um microambiente tumoral (MAT) rico em células inflamatórias (CI). No contexto da oncologia atual, onde novas propostas terapêuticas se voltam para a modulação do sistema imune do hospedeiro, o LH se constitui em um excelente modelo para esse tipo de investigação. Dois aspectos merecem destaque na abordagem do MAT nessa doença: os mecanismos imunes que possam operar de forma diferente nos casos de LH-EBV positivos e negativos, e possíveis diferenças no MAT imediatamente vizinho às CN, e aquele das áreas distantes das mesmas, onde CI passam a interagir entre si. **Objetivos:** Este estudo se propõe a avaliar as subpopulações de linfócitos T, com especial interesse nas células T_{FH} e T_{REG}, linfócitos B e macrófagos, além de outras CI (eosinófilos, neutrófilos e plasmócitos), em áreas próximas e distantes às CN de pacientes portadores de Linfoma de Hodgkin clássico (LHC) EBV positivos (EBV+) e negativos (EBV-) e sua relação com o comportamento clínico da doença. **Casuística e métodos:** Foram avaliadas biópsias de linfonodos ao diagnóstico de 146 pacientes portadores de LHC diagnosticados e tratados no HC-FMUSP/ICESP (2004 a 2014). Três áreas próximas (AP) e três áreas distantes (AD) das células de Hodgkin e/ou Reed Sternberg (HRS) de cada caso foram representadas em microarranjos teciduais (TMA). As subpopulações de linfócitos e macrófagos foram identificadas através de marcadores imuno-histoquímicos (anti-CD20, CD3, CD4, CD8, CXCR-5, Bcl-6, PD-1, FoxP-3, CD163 e CD68), e as demais populações celulares, fibrose e necrose, avaliados na coloração de H&E. A pesquisa do EBV nas CN foi realizada pela Hibridização in situ (EBER) e imuno-histoquímica (anti-LMP1). As áreas imunomarcadas para os seguintes anticorpos - anti-CD20, CD3, CD4, CD8, CD163 e CD68 - foram quantificadas através de análise de imagens e expressas como % da área total avaliada; os anticorpos CXCR-5, PD-1 e FoxP-3 foram quantificados por número de células

positivas em 10 campos de grande aumento (x400). As demais populações de CI (neutrófilos, eosinófilos e plasmócitos), assim como a fibrose, foram semi-quantificadas visualmente (0-3+). Testes estatísticos foram aplicados para avaliar a associação dos resultados obtidos entre os marcadores estudados e os seguintes parâmetros: status EBV, idade, sexo, subtipo histológico do LH, estágio ao diagnóstico, sintomas B, refratariedade, recidiva e óbito pela doença.

Resultados: Os principais resultados mostraram que: **1)** Pacientes com LHC-EBV+ são em média uma década mais velhos do que os EBV-, apresentam-se mais frequentemente em estádios avançados, e constituem cerca de $\frac{3}{4}$ dos casos do subtipo histológico celularidade mista (CM). **2)** A presença do EBV no LH está associada a mudanças na composição do MAT. **3)** A presença do EBV no LHC se acompanhou da presença de maior contingente de células T citotóxicas (CD8+) e menor contingente de células T auxiliares (CD4+) e de sua subpopulação de células T_{REG} (FoxP-3) e T_{FH} (CXCR-5). **4)** Por sua vez a maior proporção de células T_{REG} associou-se a variáveis clínicas de doença menos agressiva (estádios precoces e ausência de sintomas B). **5)** As populações globais de células T (CD3) e B (CD20) parecem exercer um papel protetor do sistema imune do hospedeiro, enquanto a maior população de histiócitos (CD163 e/ou CD68+, AP e AD) associou-se a presença do EBV e a estádios mais avançados da doença. **6)** Menor proporção de eosinófilos e neutrófilos foi observada nos casos EBV-. **7)** A fibrose foi mais acentuada nos casos EBV negativos e nos estádios precoces da doença. **Com base nos achados acima, conclui-se que o microambiente do LH associado ao EBV se caracteriza por uma resposta predominantemente histiocitária e T citotóxica, em detrimento da resposta T auxiliar e seus componentes (células T_{REG} e T_{FH}). Essas informações podem ser relevantes no desenho de estratégias terapêuticas dirigidas ao MAT, considerando-se o status do EBV associado a doença.**

Descritores: Linfoma de Hodgkin; Microambiente tumoral; Macrófagos; Linfócitos T; células T_{FH}, células T_{REG}, Virus Epstein-Baar, Prognóstico.

Abstract

Lopes ACFMM. *The microenvironment in Hodgkin's lymphoma: a study on the subpopulations of T-cells and macrophages in positive and negative EBV neoplasms* [thesis]. "Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo"; 2021.

Introduction and justification: Hodgkin's lymphoma (LH) is a peculiar B-cell neoplasm as it is composed of only 1% of neoplastic cells (NC), with a tumor microenvironment (TME) rich in inflammatory cells (IC). In the context of current oncology, where new therapeutic proposals focus on the modulation of the host immune system, LH is an excellent model for this type of investigation. Two aspects deserve to be highlighted in the TME approach in this disease: the immune mechanisms that can operate differently in cases of positive and negative LH-EBV, and possible differences in the TME immediately adjacent to the NC, and those far away, where IC begin to interact with each other.

Objectives: This study aims to evaluate the subpopulations of T lymphocytes, with special interest in T_{FH} and T_{REG} cells, B lymphocytes and macrophages, in addition to other IC (eosinophils, neutrophils and plasmocytes), in areas close to and distant to the NC of patients with positive (EBV+) and negative (EBV-) Classical Hodgkin Lymphoma and their relationship with the clinical behavior of the disease. **Material and methods:** Lymph node biopsies were evaluated for the diagnosis of 146 patients with CHL diagnosed and treated at HC-FMUSP/ICESP (2004 to 2014). Three samples were collected from close (CA) and distant (DA) areas to Hodgkin's and/or Reed Sternberg (HRS) cells in each case and were represented in tissue microarrangements (TMA). The subpopulations of lymphocytes and macrophages were identified by immunohistochemical markers (anti-CD20, CD3, CD4, CD8, CXCR-5, PD-1, FoxP-3, CD163 and CD68), and the other cell populations, fibrosis and necrosis, evaluated in H&E staining. The EBV status evaluation in the NC was performed by in situ hybridization (EBER) and immunohistochemistry (anti-LMP1). The immunolabeled areas for the following antibodies - anti-CD20, CD3, CD4, CD8, CD163 and CD68 - were quantified through image analysis and expressed as % of the total area evaluated; Antibodies CXCR-5, PD-1, and FoxP-3 were

quantified by number of positive cells in 10 High Power fields (x400). The other populations of IC (neutrophils, eosinophils and plasmacytes), as well as fibrosis, were semi-quantified visually (0-3+). Statistical tests were applied to evaluate the association of the results obtained between the markers studied and the following parameters: EBV status, age, gender, histological subtype of HL, stage to diagnosis, B symptoms, refractoriness, recurrence and death. **Results:** The main results showed that: **1)** Patients with CHL-EBV+ are on average one decade older than EBV-, present more often in advanced stages, and constitute about 3/4 of the cases of mixed cellular histological subtype (MC). **2)** The presence of EBV in LH is associated with changes in the composition of TME. **3)** The presence of EBV in the LHC was accompanied by the presence of a larger contingent of cytotoxic T cells (CD8+) and a smaller contingent of T Helper cells (CD4+) and its subpopulation of Treg cells (FoxP-3) and T_{FH} (CXCR-5). **4)** In turn, the higher proportion of Treg cells was associated with less aggressive clinical variables of disease (early stages and absence of B symptoms). **5)** The global populations of T cells (CD3) and B (CD20) seem to play a protective role of the host immune system, while the largest population of histiocytes (CD163 and/or CD68+, PA and DA) was associated with the presence of EBV and more advanced stages of the disease. **6)** A lower proportion of eosinophils and neutrophils was observed in EBV-cases. **7)** Fibrosis was more pronounced in negative EBV cases and early stages of the disease. Based on the above findings, it is concluded that the microenvironment of HL associated with EBV is characterized by a predominantly histiocytic response and cytotoxic T, unfavouring T Helper response and its components (T_{REG} and T_{FH} cells). This information may be relevant in the design of therapeutic strategies directed to TME, considering the status of the EBV associated with the disease.

Descriptors: Hodgkin linfoma, Tumor microenvironment, Macrophages, T-lymphocytes, Tfh cells, Treg cells, Epstein-Baar virus, Prognosis.

1. INTRODUÇÃO

O estudo de neoplasias hoje não envolve apenas a célula tumoral, mas engloba todo o microambiente de células e substâncias que compõem a biologia do tumor. Ao observar as neoplasias linfoides, o linfoma de Hodgkin é categorizado separadamente por suas características peculiares, que fazem dele o protótipo de neoplasia para o estudo do microambiente tumoral e das células que constituem este nicho biológico.

1.1. Linfoma de Hodgkin

O **linfoma de Hodgkin** (LH) é uma neoplasia maligna monoclonal originada de células B do centro germinativo^{1,2}. É uma doença linfoproliferativa de características únicas pois, ao contrário de outras neoplasias, o linfoma de Hodgkin é composto por células tumorais grandes, esparsas, chamadas de células de Hodgkin e Reed Sternberg (HRS), e perfazem cerca de 1 a 5% das células que compõem a massa tumoral³. Os principais aspectos que caracterizam essas células são o tamanho aumentado, com um ou mais núcleos grandes com nucléolos eosinofílicos proeminentes e um complexo de Golgi desenvolvido, além de citoplasma abundante⁴. Essa morfologia é característica, e indica que esta célula é ativada e produz grande quantidade de proteínas⁵.

A binucleação da célula tumoral se dá como um artefato de indentações profundas e dobras da membrana nuclear. Esta célula está localizada em meio a células inflamatórias que compõem o microambiente da doença, atraídas devido às citocinas secretadas pela célula neoplásica. O microambiente deste linfoma é composto por diversas células como linfócitos, eosinófilos, plasmócitos, neutrófilos, macrófagos/histiócitos e fibroblastos³. Estas células são essenciais para a sobrevivência da célula neoplásica⁵.

Devido ao peculiar imunofenótipo da célula HRS a sua linhagem permaneceu controversa por muito tempo; a detecção de rearranjo de genes que codificam a imunoglobulina com evidências de mutação somática em células neoplásicas microdissecadas, foi evidência conclusiva para determinar sua origem na célula B do centro germinativo⁶. Porém, ao diagnóstico, a célula não

apresenta expressão de receptor de célula B (BcR), além de pouca, ou nenhuma expressão de marcadores ou fatores de transcrição de célula B⁷. A partir desses achados, conclui-se que ela é uma célula B profundamente anormal, do centro germinativo ou pós centro germinativo^{8, 9}, incapaz de sintetizar a molécula de imunoglobulina (BcR). Essas mutações incapacitantes no centro germinativo deveriam ativar os mecanismos de apoptose celular; porém, a célula HRS adquiriu a capacidade de evadir-se do suicídio e continuar a se proliferar. A falta de BcR funcional faz com que as células HRS e seus precursores sejam dependentes de sinais antiapoptóticos e outros que estimulem a sobrevivência, provenientes do microambiente tumoral⁵.

A capacidade de evasão da apoptose é determinada por vários mecanismos, dentre eles a ativação do fator de transcrição NFκB, seja pelas células T, seja pelo EBV ou pela inativação dos seus inibidores como IκB¹⁰⁻¹⁴, inativação da via de morte através da mutação no gene do receptor CD95¹⁵, inibição dos executores da apoptose por expressão do fator inibidor da apoptose ligado ao X (XIAP)^{16, 17}, regulação alterada das proteínas da família Bcl-2^{18, 19} e a proteção da morte celular Fas induzida pela expressão da molécula da proteína inibitória FLICE-like, um inibidor potente da morte celular Fas induzida²⁰ (Figura 1).

Figura 1 - Mecanismos antiapoptóticos da célula HRS. Alguns exemplos dos diversos mecanismos que presumivelmente contribuem para a atividade constitucional do fator de transcrição NFκB, que é um importante fator antiapoptótico na célula HRS. Adaptado de: *Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma*. Brauningner A, et al. *Int. J. Cancer* 2006,118(8):1853-61¹

Ainda sobre o escape da apoptose, para exemplificar um dos diversos mecanismos utilizados pela neoplasia para garantir que esse processo seja efetivo, observa-se a superexpressão das moléculas de superfície, com a finalidade de manter a tolerância periférica, como a superexpressão do sistema receptor/ligante do CD95, que foi descrito em praticamente todas as células HRS estudadas e nas células T que circundam as células HRS em roseta, induzindo a apoptose em células T citotóxicas específicas para tumor^{21, 22}.

Um regulador importante do fenótipo B do centro germinativo é o fator de transcrição Bcl-6^{23, 24}. Nas células B, o Bcl-6 está superexpresso na fase de centro germinativo^{25, 26} e a falta de Bcl-6 em ratos, os torna incapaz de gerar centros germinativos ou anticorpos de alta afinidade^{27, 28}. Para gerar o fenótipo de células B do centro germinativo, o Bcl-6 atua em 4 momentos: primeiramente, ele silencia a molécula antiapoptótica Bcl-2 no centro germinativo^{29, 30}; mantendo, desta forma, o estado proapoptótico, importante na seleção de células com alta afinidade e na prevenção de reações autoimunes que poderiam surgir da hipermutação somática. O segundo momento seria quando o Bcl-6 reprime a expressão de fatores, com os genes p53 e o ATR (regulador master da detecção de mutações genômicas lesivas à célula), e contribui para a habilidade da célula B do centro germinativo de tolerar o dano no DNA induzido pela alta taxa proliferativa^{31, 32}. Em terceiro lugar, o Bcl-6 tem um importante papel em preservar a identidade do centro germinativo ao silenciar o principal regulador da diferenciação dos plasmócitos, o Blimp-1, regulando, assim, a saída do centro germinativo para o destino final de plasmócito³³. Finalmente, o Bcl-6 diminui a expressão de mediadores chave para o receptor de células B e sinalização do CD40, possivelmente fazendo o ajuste fino da responsividade do centro germinativos a sinais seletivos^{33, 34}. Esses sinais são os mais compreendidos até o momento, outros genes que estariam envolvidos no processo ainda estão em estudo³⁴. É reconhecida a importância do papel do Bcl-6 na formação do centro germinativo e na maturação da célula B. A relação deste fator de transcrição com o LH será discutida mais adiante neste trabalho.

Sobre as **manifestações clínicas**, pensou-se por muito tempo que esta doença afetava cadeias linfonodais de forma aleatória e imprevisível; hoje, após

uma detalhada pesquisa feita por Vera Peters e Henry Kaplan na década de 1950, sabe-se que inicialmente os mais acometidos são os linfonodos cervicais, de onde se dissemina por contiguidade de forma gradativa para outros grupos de linfonodos contíguos, acometendo um grupo por vez, sendo as cadeias cervicais e supraclaviculares mais frequentemente acometidas^{35, 36}. Pesquisas recentes, que contam com o benefício do diagnóstico precoce, mostraram que o LH pode começar unifocalmente e atingir um único linfonodo ou um único grupo de linfonodos, que são geralmente aumentados e firmes, principalmente na variante esclerose nodular. É importante lembrar também que o linfonodo pode ser focalmente envolvido pela neoplasia e permanecer com áreas livres de acometimento neoplásico^{36, 37}. O estadiamento do LH utilizado no momento deriva do sistema de estadiamento de Ann Arbor, criado em 1971 com as modificações propostas em Cotwalds (1989) e de Lugano em 2014. O último critério de estadiamento está apresentado no Quadro 1³⁸.

A **síndrome clínica** se inicia quando após perceber, ao acaso, linfonodos aumentados e geralmente indolores, o paciente procura auxílio médico. Posteriormente, esses linfonodos crescem em velocidade variável, e o paciente pode apresentar sintomas B – febre ($>38^{\circ}\text{C}$ na ausência de infecção), sudorese noturna e perda de peso (mais de 10% do peso corporal dos últimos 6 meses). Outros sintomas como prurido e dor no local do tumor após ingestão de bebida alcoólica, bem como astenia, podem estar presentes; a presença e intensidade dos sintomas geralmente se correlaciona com o estágio clínico (EC). É comum também, a ocorrência de graus variáveis de imunodeficiência nesses pacientes, principalmente devido a linfocitopenia e linfócitos T disfuncionais, o que deixa os pacientes mais susceptíveis a alguns tipos de infecções virais, bacterianas e fúngicas³⁹.

Quadro 1. Sistema de estadiamento revisado para os linfomas nodais primários ³⁸		
ESTÁDIO	ENVOLVIMENTO	STATUS EXTRANODAL (E)
Doença limitada		
I	Envolvimento de uma única região nodal (ex.: cervical, axilar, inguinal, mediastinal) ou estruturas linfóides como o baço, timo ou anel de Waldeyer.	Lesão extranodal única, sem envolvimento nodal
II	Dois ou mais grupos nodais do mesmo lado do diafragma	Estádio I ou II por extensão nodal, associada a envolvimento extranodal contíguo limitado
II bulky	Como acima, com doença "bulky"	Não se aplica
Doença avançada		
III	Envolvimento nodal dos 2 lados do diafragma; doença nodal acima do diafragma com comprometimento do baço	Não se aplica
IV	Envolvimento extralinfático não contíguo adicional	Não se aplica
A extensão da doença é determinada por PET-CT para linfomas ávidos e CT para não ávidos. Tonsilas, anel de Waldeyer e baço são considerados órgãos nodais. Doença "bulky" deve ser considerada como massa nodal única $\geq 10\text{cm}$ ou $\geq 1/3$ do diâmetro transtorácico medido por CT. Pacientes podem ser estadiados clinicamente ou anátomo patologicamente (AP). O estadiamento AP requer esplenectomia, biópsia hepática, biópsia de LN e/ou biópsia de medula óssea.		

A primeira tentativa de classificação histológica do LH remonta a 1944 quando Jackson e Parker dividiram a doença em paragranuloma, granuloma e sarcoma. No início dos anos 60, Lukes e Butler introduziram uma classificação mais elaborada que foi simplificada em 4 subtipos (predominância linfocitária, esclerose nodular e celularidade mista e depleção linfocitária) na conferência de Rye (1966). Esta última classificação que foi bastante aceita pela comunidade médica por ter correlação com a sobrevida⁴⁰, e só foi modificada cerca de 30 anos depois, com o advento da imunofenotipagem, que mostrou que o subtipo predominância linfocitária nodular (LHPLN) era diferente dos demais e representava uma entidade distinta, originando a nova versão proposta na classificação R.E.A.L. em 1994⁴¹. Com posteriores modificações, hoje temos a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), que subdivide a doença nas formas predominância linfocitária nodular e forma clássica (LHC)³.

Neste estudo vamos abordar o LHC, que por sua vez, é subdividido histologicamente em esclerose nodular (LHEN), celularidade mista (LHCM), depleção linfocitária (LHDL) e rico em linfócitos (LHRL), de acordo com as características do microambiente e presença de fibrose³. Há alguns anos, o diagnóstico desta doença baseava-se apenas em dados morfológicos, mas hoje é indispensável a realização de exame imuno-histoquímico que mostra, no LHC, células de Hodgkin/Reed Sternberg positivas para CD30 e CD15, com negatividade para CD45, CD20 e para outros marcadores de linhagem linfóide B como o CD79a^{3, 4}.

Dados epidemiológicos mostram que o LH é o diagnóstico em cerca de 15 a 25% dos casos de linfoma maligno, sendo cerca de 90% LHC, e 10% LHPLN³. Os dados do *National Institute of Cancer* (NIH) mostram que a incidência anual é de aproximadamente 2,7 casos por 100.000 pessoas entre os anos de 2011 e 2015, com uma prevalência de 208.805 pessoas convivendo com o LH no ano de 2015 nos Estados Unidos⁴².

Nos países industrializados, a incidência do LH é bimodal; o primeiro e mais alto pico ocorre dos 15 aos 35 anos, com um segundo pico nos pacientes com mais de 55 anos, é raro em crianças e ocorre excepcionalmente em menores de 3 anos. O subtipo LHEN é mais frequente nestes países, e predomina em adultos jovens, principalmente mulheres. Já os subtipos LHCM e LHDL predominam em países em desenvolvimento, e a maior incidência ocorre em crianças e no sexo masculino⁴³. A distribuição dos subtipos histológicos varia com a idade, e a incidência do LHCM também é bimodal, com um pico na infância e outro acima dos 50 anos, o que espelha os padrões de infecção pelo EBV que ocorre quando o paciente é bem jovem ou idoso⁴⁴.

Alguns estudos brasileiros pesquisaram a epidemiologia do LH no país. Um dos trabalhos foi realizado no estado de São Paulo e avaliou casos de 5 instituições, diagnosticados entre os anos 1990 e 2000. Os resultados mostraram que 60% dos pacientes acometidos eram homens, e a distribuição de faixa etária foi a seguinte: 8,5% na primeira década de vida, 22,9% na segunda, 26,9% na terceira, 15,5% na quarta, 10,2% na quinta, 6,8% na sexta,

4,5% na sétima e 4,3% na oitava década ou acima. A classificação pelo subtipo histológico mostrou que 69,2% dos casos eram LHEN, 21,1% LHCM, 4,8% eram LHRL e os casos de LHDL foram responsáveis por 4,6% da casuística. Uma associação significativa entre gênero e tipo histológico foi encontrada, sendo que o subtipo esclerose nodular foi mais comum em mulheres. Os resultados são semelhantes aos apresentados previamente referente a países industrializados, como afirma a conclusão do trabalho⁴⁵. Outro estudo nacional de menor porte, foi feito no estado do Pará com 65 casos com diagnóstico histopatológico realizado entre 1996 e 2005 que apresentou resultados similares com o trabalho citado anteriormente. A maioria dos casos – 64,6%- acometeu o sexo masculino, com a mediana da idade se situando em 25 anos; o sexo feminino foi responsável por 35,4% com a mediana situada aos 20 anos de idade, o que mostra maior prevalência do LH nas primeira e segunda década de vida. A distribuição dos subtipos histológicos neste estudo apresentou 50,8% dos casos com LHEN, celularidade mista com 26,2%, LHDL com 15,4% dos casos e o subtipo rico em linfócitos com 7,6% dos casos. Um fato curioso desse estudo foi a maior incidência de LHEN em pacientes com menos de 15 anos⁴⁶.

As diferenças epidemiológicas entre os subtipos de LH são perceptíveis e importantes, e chegam a sugerir que os subtipos tenham etiologias diferentes⁴⁷. Aspectos importantes são a diminuição da incidência do LHEN em pacientes HIV positivos com queda de contagem de CD4, o que levanta a hipótese da necessidade de um sistema imune intacto para seu desenvolvimento⁴⁸, e a menor associação com o EBV do que em outros subtipos⁴³. O LHEN acomete o mediastino com maior frequência, enquanto os padrões LHCM e LHDL poupam mediastino e região de timo, são bastante associados com a infecção pelo EBV e são frequentes no cenário de HIV positivo⁴³. Já o subtipo LHRL apresenta raro envolvimento mediastinal, é mais frequente em idosos e tem um excelente prognóstico^{43, 49}.

Pacientes HIV+ tem até 10 vezes mais chance de desenvolverem LH e, no contexto de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), há predomínio de subtipos histológicos menos favoráveis, como celularidade mista e depleção linfocitária, além de doença avançada quase sempre associada ao EBV⁴³.

Sobre a **etiologia** da doença, sabe-se que provavelmente não é unifatorial; vários agentes etiológicos infecciosos já foram pesquisados e relacionados a neoplasia e não foi possível comprovar nenhum deles como causa única^{37, 50}. A relação do LH e a infecção pelo EBV está bem estabelecida^{51, 52}, e será discutida com mais profundidade em tópicos seguintes. O aumento da incidência com altos títulos de herpes vírus 6 também foi relatado⁵³, bem como associação com sarampo, porém sem evidências conclusivas no momento⁵⁴.

Os **esquemas de tratamento** de primeira linha mais utilizados para pacientes com LH são o ABVD (doxorrubicina, bleomicina, vimblastina e dacarbazina) com definição do número de ciclos a depender do estágio do paciente, e o BEACOPP (bleomicina, etoposide, doxorrubicina, ciclofosfamida, vincristina, procarbazina e prednisona) que é usado em estádios mais avançados. Outro tratamento de primeira linha é a radioterapia, em combinação com a quimioterapia (terapia combinada) particularmente nos estádios clínicos iniciais. Para terapia em pacientes recidivados ou refratários existem algumas opções de esquemas de resgate, como o ICE (ifosfamida, carboplatina e etoposide), DHAP (citarabina de alta dose, cisplatina e dexametasona), IGEV (ifosfamida, gemcitabina, vinorelbina e prednisona) e GIV - esquema utilizado no Serviço de Hematologia/Hemoterapia e Terapia Celular do HC-FMUSP – com doses mais altas de vinorelbina. Esta terapia de resgate deve ser seguida de quimioterapia em altas doses e resgate com células tronco-hematopoéticas autólogas. Mais recentemente, foi introduzido como opção para os casos nos quais houve falha ao transplante autólogo de células tronco, o Brentuximabe Vedotim⁵⁵, um anticorpo anti-CD30 conjugado a uma droga, a monometil auristatina E, um potente agressor dos microtubulos, liberada no citoplasma das células CD30+. Também está disponível para tratamento de doença refratária ou recidivada após ATMO agentes anti-PD-1 como Nivolumabe e Pembrolizumabe.

O **prognóstico** do LH melhorou bastante com a implantação dos protocolos de terapia combinada, e chega a atingir 90% de cura em pacientes em estádios precoces (EC I/II), o que diminuiu a importância do subtipo histológico nesses casos, atingindo altos índices de cura⁴³. Atualmente, os

critérios de pior prognóstico são estágio avançado (EC III/IV) da doença ao diagnóstico, presença de sintomas B e presença de fatores de risco como HIV positivo⁵⁶⁻⁵⁸. Ainda assim, os subtipos LHCM e LHDL apresentam pior prognóstico mesmo com a terapia utilizada atualmente⁵⁹.

1.2. Microambiente no LH

O LH é uma neoplasia já conhecida pela escassez de células neoplásicas e com um microambiente rico, composto por diversos tipos celulares como linfócitos, eosinófilos, plasmócitos, neutrófilos, macrófagos/histiócitos e fibroblastos³ (Figura 2) que são atraídos pela célula HRS ao modular o microambiente tumoral, ao mesmo tempo que estimula a diferenciação de outras células para criar um habitat favorável para a sobrevivência da célula neoplásica⁵. Essa particularidade na composição do tumor justifica o comportamento peculiar desta neoplasia. As células mais abundantes geralmente são os CD4+ infiltrantes⁶⁰, em que predomina o fenótipo T Helper 2 (T_{H2}) e T regulatório (T_{REG}), principalmente em vizinhança com as células HRS^{61, 62}.

Figura 2 - A célula HRS em seu microambiente mostrando a diversidade de células que compõe o microambiente celular no LH. Aldinucci D, *et al.* The classical Hodgkin's lymphoma microenvironment and its role in promoting tumour growth and immune escape. *J. Pathol.* 2010;221(3):248-63⁶³

As características clínicas e patológicas do LH refletem uma resposta imune anormal que seria o resultado da secreção de várias citocinas e quimiocinas pelas células HRS que alteram a composição e função das células que constituem o microambiente modelando, desta forma, as características histopatológicas do linfonodo⁶⁴⁻⁶⁶. Posteriormente, as próprias células do microambiente produzem citocinas e quimiocinas que ajudam a manter e até a amplificar a resposta inflamatória⁶⁷. A célula HRS tem a capacidade de modular o microambiente ativamente ao atrair certos tipos celulares e estimular outras células a se diferenciarem em tipos celulares que favoreçam a sobrevivência da célula HRS⁵.

Algumas das quimiocinas secretadas por células HRS após ativação são CCL5, CCL17 e CCL22, que atraem células com perfil fenotípico T_H2 e T_{REG} que expressam CCR4^{68, 69}. Dentre as substâncias sintetizadas no microambiente, o interferon gamma, produzido pelas células HRS e T_H1 , é um importante potencializador da função macrófaga⁷⁰. Substâncias que estimulam ativação e proliferação de fibroblastos como IL-13, TNF- α e TGF também são expressas pelas células HRS^{71, 72}. Além disso, IL-5 e CCL28 secretado pelas células HRS podem contribuir para a eosinofilia do tecido^{73, 74} (Figura 3).

Sobre a distribuição de células B, ainda permanece em aberto a questão se elas são atraídas para o microambiente, e como aconteceria esse processo, ou se as células B presentes são remanescentes dos linfonodos normais⁶⁶.

Apesar da vantagem evolutiva que permite a sobrevivência, adquirida pela célula HRS ao desregular redes de fatores de transcrição e ao possuir lesões genéticas que alteram a sinalização intrínseca, o perfil fenotípico antiapoptótico e proliferativo característico da célula HRS tem uma dependência crítica de sua interação com o microambiente⁶. As interações mais evidentes e bem estudadas que se tem neste perfil gênico desestabilizado é a ativação do NF κ B (fator nuclear) e da via de sinalização JAK-STAT. Diversas mutações e alterações estruturais nos genes envolvidos nessas vias incluindo ganho cromossômico, superexpressão de genes e inativação de genes supressores de tumor, levam a ativação constitucional das mesmas⁷⁵⁻⁷⁹. Além disso, o

microambiente ainda provê sinalização via receptores de superfície, chamados receptores IL⁸⁰, membros da família do receptor TNF⁸¹ e receptores de tirosina cinase⁸². Claramente, estamos olhando para uma doença que tem em sua gênese múltiplos fatores que culminam na formação da neoplasia, com uma complexa interdependência de células tumorais e não neoplásicas, juntamente com as substâncias secretadas neste meio; assim, vamos construindo a mentalidade de olhar não apenas para a célula neoplásica, mas também para as células inflamatórias que a circundam e a ajudam a construir o tumor.

Figura 3 - Representação esquemática de interação entre as células HRS e o microambiente tumoral no LHC. Ao centro, a célula HRS expressa moléculas de superfície características bem como as citocinas e quimiocinas secretadas. Ao redor da célula HRS, estão os tipos celulares não neoplásicos atraídos e ativados por essas moléculas. As próprias células do microambiente secretam uma variedade de quimiocinas e citocinas que ajudam a modelar o infiltrado reativo e a enviar sinais para a célula HRS. Adaptado de: Christian Steidl JMC, *et al.* Molecular pathogenesis of Hodgkin's Lymphoma: increasing evidence of the importance of the microenvironment. *J Clin Oncol.* 2011;29(14):1812-26⁶⁶

A importância do microambiente tumoral no comportamento biológico do LH foi o estímulo inicial para a realização desse trabalho. Entender melhor suas nuances ao olhar para os grupos de melhor e pior prognóstico é um dos desafios

do momento, ao tentar diferenciar a composição celular do tumor e sua relação com o comportamento biológico da doença.

1.3. Célula T auxiliar folicular (T_{FH})

Uma das células mais estudadas na última década é a célula T auxiliar folicular (T_{FH}). O grande interesse da neste tipo celular começou, nesta neoplasia especificamente, quando se identificou o Bcl-6 como fator de transcrição da célula T CD4 para diferenciação em célula T_{FH} e desenvolvimento do centro germinativo⁸³. O processo de diferenciação desta célula é bastante complexo. Ao contrário da diferenciação da célula em T_{H1} que é totalmente induzida pelo estímulo da IL-12, a diferenciação da célula T_{FH} é multifatorial, e acontece em diversos estágios, envolvendo diferentes sinais em um processo heterogêneo que culmina na formação deste importante tipo celular⁸⁴.

A célula T CD4 passa por um momento crucial em sua formação nas primeiras etapas do processo de divisão celular; se o receptor de quimiocina CXCR-5 é expresso, a célula será denominada T_{FH} inicial e irá migrar para a borda do folículo de célula B e prosseguir com sua diferenciação. Se, ao invés da expressão do CXCR-5, a célula receber sinais T_{H1} , T_{H2} ou T_{H17} , o programa de diferenciação celular será diferente, e a célula seguirá outros caminhos que incluem a migração para sítios de inflamação⁸⁴.

A diferenciação da célula T_{FH} é um processo multifatorial, ocorrendo em múltiplas etapas, conforme ilustrado na Figura 4. Esse processo é mais bem entendido em camundongos, e é regulado em sua fase precoce pela interação entre IL-6, coestimulador indutível (ICOS), IL-2 e pela força do sinal do receptor de célula T (TCR)⁸⁴. A sinalização da IL-6 é feita pelo receptor de IL-6, e que transitoriamente induz a expressão do Bcl-6 nas células T CD4+ recém ativadas⁸⁵; em vários modelos experimentais, o Bcl-6 é necessário para a expressão precoce do CXCR-5⁸⁶⁻⁸⁸. A IL-6 também está envolvida na diferenciação das células T_{H17} em ratos, porém a interação com outros fatores irá determinar qual o caminho esta célula irá seguir. O ICOS é importante nas

etapas de diferenciação e migração de células T_{FH} e sua regulação na célula é feita por diversos fatores. Já o IL-2 é um potente inibidor da diferenciação em T_{FH} , e pode agir em fases precoces para impedir a diferenciação deste tipo celular⁸⁹.

Figura 4 - Diferenciação da célula T_{FH} . A: Estágios da diferenciação da célula T_{FH} , com destaque para as moléculas associadas à migração; B: Sinais na diferenciação da célula CD4, mostrando os caminhos de diferenciação de forma simplificada com destaque para os principais fatores de transcrição para cada tipo celular. O esquema evidencia as principais diferenças entre a diferenciação celular de camundongos e humanos. MZ: zona marginal, SCS: seio subcapsular, DZ: dark zone; LZ: light zone. Adaptado de: Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity*. 2014;41(4):529-542⁸⁴.

O segundo estágio de diferenciação da célula T_{FH} ocorre quando a célula T interage com os antígenos específicos para célula B dentro folículo, na zona interfolicular ou na borda de transição T/B. Muito da função e diferenciação da célula T_{FH} está interconectada com os pontos topográficos da microanatomia das

zonas T e B do linfonodo e baço. As células T_{FH} tem uma grande relação simbiótica com as células B, que são necessárias para o desenvolvimento da T_{FH} em quase todas as condições⁹⁰. O ICOS, além de ser uma molécula coestimulatória, direciona a migração da célula T CD4 dentro do folículo de células B, e pode ser importante na localização da célula T_{FH} precoce no folículo^{84, 91}.

O terceiro estágio na formação da célula T_{FH} envolve o centro germinativo (CG), como demonstrado na figura 4A. Neste momento, a maioria das células já expressa, em altos níveis, marcadores como o CXCR-5, Bcl-6 e PD-1, e podem ser identificadas por meio destes em células CD4 do CG⁸⁴. Após a diferenciação dessas células em T_{FH} do CG, elas não ficam confinadas ao CG, e de lá podem sair e seguir os seguintes caminhos: 1) ir ao folículo vizinho e entrar em um diferente CG⁹², 2) residir temporariamente em um folículo de células B antes de entrar novamente no mesmo folículo ou 3) sair do CG e fazer uma supressão do Bcl-6 para formar uma célula T_{FH} de memória⁹². Logo, as células CXCR-5 encontradas fora do CG podem corresponder a uma célula T_{FH} em algum desses momentos⁸⁴.

Processos alternativos de formação de célula T_{FH} existem, e é esperado que existam fenótipos diferentes, além da heterogeneidade intrínseca da célula T CD4, que contribui ainda mais para a diversidade de fenótipos⁸⁴.

Atualmente, não há um marcador único, ou uma combinação padrão, que identifique de forma confiável a célula T_{FH} como uma população distinta⁹³. A presença de dois marcadores, idealmente três, é sugerida pela OMS, 2017 para identificar um fenótipo de células T_{FH} em um Linfoma nodal de células T-CD4+. Na prática diagnóstica, o PD-1, ICOS, CXCL13, CD10 e Bcl6 tem sido os marcadores mais utilizados, sendo o ICOS, c-MAF e PD-1 os mais sensíveis, e o BCL6, CXCL13 e CD10 os mais específicos, na ordem apresentada. **(SENSIBILIDADE - ICOS, c-MAF, PD-1, BCL6, CXCL13, CD10 - ESPECIFICIDADE)**³. Para identificar a célula T_{FH} no microambiente são propostos para este estudo o uso do CXCR-5, que é um receptor de quimiocina responsável por promover a migração das células B e T para o folículo de célula

B em resposta ao CXCL-13^{94, 95}. A presença do CXCR-5 diferencia a célula T_{FH} das outras populações de célula T CD4+^{96, 97} e é um dos marcadores que nos pareceu mais relevante para identificar a célula T_{FH} por ser uma molécula que precocemente se expressa nesse tipo celular, no momento em que se define a diferenciação da célula T-CD4+ para célula T_{FH}⁸⁴, além de ser um AC que oferece melhores resultados técnicos nas reações IHQ. O seu padrão de imunomarcação é citoplasmático.

O PD-1 é expresso em células T CD4+ associadas ao centro germinativo em folículos reativos células T_{FH}, mas também é expresso em células T CD8+, além de células B e monócitos. Ele inibe a atividade da célula T ao emitir sinais secundários, funciona como um regulador negativo do sistema imune e também é importante para a tolerância periférica⁹⁸. Há dois ligantes descritos para o PD-1, sendo eles o PD-L1 e o PD-L2, que são expressos em diversas células, como macrófagos, células dendríticas, células B e T, células do pulmão, coração e em células neoplásicas de diversas neoplasias, incluindo as células HRS no Linfoma de Hodgkin. A ligação do PD-L1 com o PD-1 na célula T inibe a ativação desta célula, já a ligação com o PD-L2 inibe profundamente a proliferação de célula T e a produção de citocinas pelas células T CD4+⁹⁹. Esse é o princípio da utilização dos anticorpos anti-PD-1 no tratamento de neoplasias que expressam PD-L1/PD-L2, no sentido de impedir o bloqueio da resposta imune através da inativação das células T. O PD-1 é um membro da família do CD28, e será utilizado neste trabalho através de sua expressão em imuno-histoquímica em citoplasma¹⁰⁰ para avaliar a presença de células T_{FH}, mas também como base para estudo de uma possível abertura para tratamento desta neoplasia usando o bloqueio do *checkpoint* PD-1/PD-L1.

A célula T_{FH} exerce um papel central no centro germinativo, que é participar da geração de células B com alta afinidade pelo patógeno¹⁰¹. A característica distintiva do centro germinativo é a capacidade de promover a hipermutação somática que leva a re-estruturação do receptor de células B (BcR) com alta afinidade pelo antígeno. A grande maioria das mutações são deletérias ou não acrescentam vantagem evolutiva à célula, o que induz a ativação do mecanismo de apoptose pela não sinalização de sobrevivência

celular devido à ausência do receptor de célula B, ou a um BcR autorreativo; ou ainda, um BcR com baixa afinidade para o antígeno apresentado pela célula dendrítica folicular (CDF) com o auxílio do Linfócito T_{FH} ¹⁰².

A célula T_{FH} atua em diversos momentos da dinâmica do CG, como regular o tamanho do CG⁸³, restringir a entrada de célula B de baixa afinidade no CG enquanto contribui para sua ocupação por células B de alta afinidade¹⁰³, e selecionar essas células B de alta afinidade durante a maturação¹⁰⁴. O papel da célula T_{FH} se estende à sinalização do BcR, pois a maioria das células B do CG não consegue ativar essa sinalização¹⁰⁵, e dependem da célula T_{FH} para a ativação de tais sinais, que auxiliam na discriminação de qual célula B do CG deve proliferar, além de determinar o número de ciclos que a célula B do CG deve passar pela zona escura do centro germinativo, regulando assim o número de divisões que a célula B faz no CG. Esse achado sugere que a célula T_{FH} também exerce um papel na regulação da hipermutação somática¹⁰⁶.

Ao extrapolar as funções da célula T_{FH} para além do papel no centro germinativo e no LH pode-se concluir, após analisar suas ações e mecanismos acima descritos, que esta célula exerce um papel importante na produção dos anticorpos; por conseguinte, alterações na produção e função da célula T_{FH} podem prejudicar a ação do sistema imune contra doenças que dependem da imunidade humoral para serem combatidas. Um bom exemplo é a coriomeningite linfocítica que precisa de anticorpos para controlar a infecção, mas quando há defeitos nos linfócitos T_{FH} o controle da viremia fica prejudicado¹⁰⁷. Um problema similar existe para os infectados com o HIV, que tem maior dificuldade em produzir anticorpos neutralizantes quando há defeitos nas células T_{FH} . De modo inverso, pacientes que tem níveis acima do normal de células T_{FH} altamente funcionantes tem maior probabilidade de fazer anticorpos amplamente neutralizantes contra o HIV¹⁰⁸. Dessa forma, acredita-se que possa existir também alguma relação entre a proporção dessas células na presença de outros tipos de vírus, como o vírus Epstein-Baar nas células HRS.

Por muito tempo se duvidou da existência de correlação do linfócito T_{FH} com a patologia dos cânceres. Porém, estudos mostraram a existência de

células T_{FH} como importantes constituintes de estruturas linfoides terciárias em tumores de mama, onde tem um papel no recrutamento de células do microambiente tumoral e na formação das próprias estruturas linfoides terciárias ajudando, desta forma, na estruturação de uma massa tumoral em que uma resposta imune antitumoral efetiva possa ser criada¹⁰⁹; resultados semelhantes foram encontrados em câncer colorretal¹¹⁰.

Sobre as neoplasias hematolinfóides relacionadas à célula T_{FH}, a classificação da OMS do ano de 2017 inclui o linfoma de células T angioimunoblástico, o linfoma folicular de células T e o linfoma nodal periférico com fenótipo de células T auxiliares foliculares. Esses tumores se originam da célula T_{FH} com morfologia, desenvolvimento e curso clínico diferentes entre si. Destes, o mais estudado é o linfoma de células T angioimunoblástico por ter uma casuística maior e ser uma entidade reconhecida há mais tempo. E, particularmente neste tumor, foi identificado a maior quantidade de células HRS-símile derivadas de células B, em estudo feito em linfomas de células T. Essas células tinham morfologia e imunofenótipo de células HRS e quase todas eram EBV positivas¹¹¹⁻¹¹³. A presença dessas células HRS-símile foi aceita como um processo passivo; a principal hipótese é que a célula T permite o desenvolvimento da célula B infectada por EBV, já que a célula T_{FH} tem um papel essencial na geração da resposta da célula B dependente de célula T; logo, a presença de células T_{FH} PD-1+ nesses linfomas podem estar protegendo clones aberrantes de célula B da vigilância imunológica, o que permitiria o surgimento dessas células HRS-símile¹¹⁴.

Até onde pudemos investigar, não encontramos na literatura de língua inglesa referências ao estudo da célula T_{FH} no LH. Estudo realizado previamente avaliou a quantidade de células PD-1+ no LH em amostras de TMA e concluíram um prognóstico muito pior para pacientes com alto índice de células PD-1+, mostrando diferença média de quase 100 meses de sobrevida entre esses pacientes. Porém, este estudo avaliou a população global de células PD-1+, sem a preocupação de avaliar especificamente as células T_{FH}, já que estas não eram o foco do estudo em questão, o que está de acordo com a falta de especificidade deste marcador para identificar este tipo celular⁹⁹.

O conceito estabelecido nos dias de hoje de que as células neoplásicas no LH seriam células com origem no CG, que se evadem da apoptose apesar de um programa de células B absolutamente anômalo, e da importância que tem a célula T_{FH} em todo o processo de seleção das células B durante sua passagem no CG como exposto acima, se constitui a um forte motivador para avaliar o seu papel nessa doença.

Um outro fator que nos estimulou a estudar essa população celular no LHC foi a constante presença de células B associadas ou não ao EBV, frequentemente com fenótipo morfológico e imunofenotípico superponíveis a células HRS, no Linfoma T angioimunoblástico, o primeiro linfoma identificado como originário da célula T_{FH} , sugerindo uma possível relação estreita entre essas células. Isso nos alertou para um tipo de interação importante entre essas células, e a investigar a situação inversa, ou seja, a participação das células T_{FH} no Linfoma de Hodgkin clássico e sua relação com o EBV.

1.4. Macrófagos M1 e M2

A resposta imune inata, representada aqui pelos macrófagos, é a primeira linha de defesa para todos os hospedeiros animais¹¹⁵. Por muito tempo se pensou que a resposta imune adaptativa direcionava a resposta inata^{116, 117} e ativava os macrófagos para orientar como seria seu “modo de operação”^{117, 118}; hoje, sabe-se que os macrófagos são os responsáveis por guiar a resposta imune da célula T em citotóxica/tumoricida ($TH1$) ou reparadora (T_{H2})^{119, 120}. A plasticidade dos macrófagos e heterogeneidade de suas funções são características observadas pela capacidade que o tipo celular tem de exercer uma função a partir do que o tecido exige/estimula em determinado momento; um dos desafios da ciência agora é entender como ocorre a polarização dos macrófagos e saber como modular a função dos mesmos para direcioná-los a fazer o necessário para agir de acordo com o interesse de proteger o hospedeiro¹²¹.

Os macrófagos são células há muito conhecidas por influenciar o desenvolvimento de tumores. A carcinogênese é associada com o processo inflamatório crônico que tem os macrófagos como uma das células relacionadas a este processo^{122, 123}. A importância dos macrófagos no microambiente do linfoma de Hodgkin é uma questão em estudo para saber se a polarização predominante poderia conferir um prognóstico pior para a neoplasia.

Um dos primeiros estudos abordando este tema foram feitos por Steidl e Gascoyne¹²⁴, com resultados com grande impacto na literatura, mostrando pior sobrevida em pacientes com maior número de células CD68+ no ambiente tumoral além de haver relação também com falência de tratamentos primário e secundário. Já no trabalho de Barros *et al.*¹²⁵, que estudou prognóstico de LH em crianças, mostrou que altos números de CD68 no microambiente tumoral não conferia pior prognóstico, mas alto índice de CD163 em tumores EBV negativos eram preditores de pior sobrevida em crianças, fato não comprovado em pacientes EBV positivos. Tan *et al.*¹²⁶ mostraram maior número de células CD163 e CD68 positivas em lesões EBV positivas que em lesões EBV negativas, mas também mostraram menor sobrevida em pacientes com alto índice de CD163 independente do *status* EBV do paciente, e menor sobrevida em pacientes EBV negativos com alto índice de CD68.

Porém, outros trabalhos não reproduziram os achados citados acima, e não encontraram diferença prognóstica em pacientes em relação a quantidade de macrófagos no microambiente tumoral¹²⁷⁻¹²⁹. Alguns fatores podem ter contribuído, isoladamente ou em conjunto, para a discordância dos resultados, como diferentes tipos e clones de anticorpos, técnicas para realização de imunohistoquímica variáveis entre diferentes serviços, métodos de quantificação da imunomarcagem distintos entre os trabalhos, critérios de inclusão e exclusão não concordantes (pacientes em diversos estádios de doença), e ainda a ausência de um ponto de corte comum para a quantificação de macrófagos.

A polarização dos macrófagos foi determinada de acordo com a função exercida pela célula no ambiente em que ela se encontra. O macrófago M1 é caracterizado pelo fenótipo proinflamatório, com promoção da resposta T_{H1}

(citotóxica) e atividade tumoricida ao inibir a proliferação celular, enquanto o macrófago M2 mostra atuação regulatória na reparação tecidual, cicatrização, remodelamento e estímulo da resposta T_{H2} (auxiliar)^{121, 130}. Porém, é importante enfatizar que denominar a resposta M2 como “anti-inflamatória” não parece correto; pois, onde há macrófago há processo inflamatório, e citocinas presentes na inflamação também estarão presentes neste microambiente; desta forma, neste momento alguns autores consideram questionável a subdivisão dos macrófagos em M1 e M2 no que se refere ao seu papel no microambiente tumoral¹²¹.

O CD68 é um marcador menos específico para macrófagos, visto que é expresso, a depender do clone do anti-CD68 utilizado, em células mielóides e fibroblastos¹³¹, enquanto o CD163 é identificado como um marcador mais específico para macrófagos associados a tumor, pois tem expressão restrita a células do sistema monocitário/macrofágico¹³² porém, sua expressão não é exclusiva para macrófagos M2 como se era pensado anteriormente. Para auxílio na identificação da polarização dos macrófagos, outros marcadores podem ser utilizados, sendo um deles o transdutor de sinal e ativador de transcrição STAT1, que é o fator de transcrição usado na identificação de macrófagos M1^{130, 133}; o outro marcador é o c-MAF, que é um fator de transcrição para a produção da IL-10 e é considerado marcador de macrófagos M2¹³⁰.

Em função dos achados controversos em relação ao papel dos macrófagos no comportamento biológico do Linfoma de Hodgkin e sua importante relação com os linfócitos T, nos parece essencial inclui-lo neste estudo que se propõe a avaliar um conjunto de células que compõe o microambiente inflamatório nessa doença e a relação entre elas.

1.5. Outras células inflamatórias e a fibrose no LH

No sentido de avaliar os demais componentes do microambiente inflamatório no LH, foram incluídos nesse estudo a avaliação das células T

regulatórias (T_{REG}), os plasmócitos, os neutrófilos, os eosinófilos e a intensidade de fibrose.

As **células T_{REG}** são importantes para o desenvolvimento da resposta imune e estão presentes no microambiente tumoral. Elas têm como função suprimir a atuação de outras células T e, desta forma, regulam a resposta imune ao manter a autotolerância¹³⁴. As pesquisas realizadas envolvendo este tipo celular sugerem que elas regulam as células B do centro germinativo e as células T_{FH} após o início da resposta do centro germinativo para produção de anticorpos, e ajudariam a limitar a reação inflamatória e controlar a autoimunidade que acontecem neste ambiente^{135, 136}. Alguns estudos sugerem que as células T_{REG} controlam a resposta da célula B, e a ausência daquelas induz a uma maior produção de anticorpos¹³⁶. Há também evidências de que, em contexto de doença autoimune, a quantidade de células T_{REG} está diminuída em comparação com indivíduos saudáveis; já alguns trabalhos mostram níveis similares de células T_{REG} ao se comparar pacientes saudáveis com portadores de doença autoimune¹³⁷⁻¹⁴¹. Nos estudos relacionados a imunologia dos tumores, há evidências que mostram que pacientes com câncer tem seu número de células T_{REG} aumentado, e mesmo no microambiente inflamatório de alguns tumores; outros trabalhos feitos em camundongos mostraram que a depleção de células T_{REG} aumenta a imunidade tumoral e reduz o crescimento de lesões¹³⁴. Outros estudos tentam denominar de forma mais específica e refinada a função da célula T_{REG} ao apontar que ela é responsável por induzir e manter a tolerância periférica que, por sua vez, diz respeito aos linfócitos maduros liberados dos órgãos linfóides primários e que ficam circulantes na periferia¹⁴². Logo, estas são uma população de células T que suprimem funcionalmente a resposta imune ao influenciar a atividade de outro tipo celular¹⁴³. O marcador utilizado para identificar a célula T_{REG} é o fator de transcrição intracelular FoxP3 por ser uma molécula crucial para o desenvolvimento e função destas células¹⁴².

Neste estudo avaliamos também semiquantitativamente os **plasmócitos**. Poucos são os trabalhos que tentam estabelecer uma associação semelhante; porém, um estudo recente avaliou o material biológico de 120 pacientes suecos com LH e perceberam que alta infiltração plasmocitária está

associada a estágio avançado, sintomas B, menor sobrevida e maior número de eosinófilos¹⁴⁴.

Usando os mesmos parâmetros que os plasmócitos, os **eosinófilos** foram avaliados por meio de avaliação celular morfológica (H&E) do linfonodo. Um estudo envolvendo essas células e o LH sugeriu que essas células da imunidade inata podem agir como elementos importantes na patobiologia da doença ao prover ligantes celulares para os receptores da superfamília do TNF, capazes de traduzir sinais proliferativos e antiapoptóticos na superfície das células HRS. A presença de receptores para ligantes de TNF, em eosinófilos, expressos por células T ativadas sugere que as células da imunidade inata contribui para a rede de sinais interativos entre células HRS, células T e outras células que ficam no entorno da neoplasia¹⁴⁵. A relação entre prognóstico e quantidade de eosinófilos no sangue foi avaliada em pacientes com LH que fizeram uso de inibidor de PD-1, e foi identificado que pacientes com alta contagem relativa de eosinófilos tinham menor risco de progressão de doença, relação que não foi identificada com os neutrófilos nesse mesmo estudo¹⁴⁶. Outros trabalhos não conseguiram mostrar relevância prognóstica na quantificação de eosinófilos, seja ela sanguínea ou tecidual¹⁴⁷. Sobre a avaliação dos **neutrófilos**, não foram encontrados estudos avaliando a quantidade dos mesmos em pacientes com LH.

Foi analisada também, utilizando o mesmo critério semiquantitativo (H&E), a extensão da **fibrose** apresentada nos casos e sua relação com os demais parâmetros. Apesar de ser um componente importante do LH, principalmente no subtipo esclerose nodular, não há evidências conclusivas na literatura de que a fibrose no LH esteja relacionada a evolução da doença¹⁴⁸.

1.6. Infecção pelo EBV no LHC

O vírus do Epstein-Baer (EBV) é um herpes vírus com DNA de fita dupla, que infecta mais de 90% da população mundial. Na maioria dos casos, a infecção se dá de forma latente em células B, mas pode infectar também células T ou

células epiteliais e, apesar de se apresentar de forma latente na grande maioria dos casos, o EBV está associado a diversas neoplasias malignas¹⁴⁹. Alguns exemplos são os linfomas de células B, como o linfoma de Hodgkin e o linfoma de Burkitt. Outro grupo importante de neoplasias hematolinfóides relacionadas são os linfomas associados a condições de imunossupressão tais como a doença linfoproliferativa pós transplante, linfomas associados ao HIV e os linfomas que comprometem o indivíduo idoso¹⁴⁹. Dentre as diversas características que estas neoplasias têm em comum, uma das mais importantes no contexto deste estudo é sua origem em células do centro germinativo^{2, 150, 151}.

O primeiro contato do indivíduo com o EBV acontece geralmente na primeira década de vida, na forma de uma infecção assintomática. Os portadores secretam o vírus na saliva, o que lhes permite transmitir o vírus pela via oral. Quando a primoinfecção acontece, geralmente na adolescência ou na fase de adulto jovem, o paciente pode manifestar uma doença linfoproliferativa autolimitada, conhecida como mononucleose infecciosa (MI)¹⁵¹. A associação do EBV com um subgrupo de linfomas de Hodgkin foi confirmada pela primeira vez quando se demonstrou a presença do DNA do vírus integrado ao DNA das células neoplásicas desta doença¹⁵². A relação de mononucleose infecciosa (MI) e linfoma de Hodgkin EBV+ é comprovada por meio de estudos epidemiológicos que mostram aumento de até quatro vezes a ocorrência desta neoplasia em pacientes com história de MI^{51, 52}. Porém, a infecção pelo EBV não explica totalmente a patogênese do LH, uma vez que mais da metade dos casos de LH são EBV-negativos, com variações relacionadas aos índices de desenvolvimento sócio-econômicos, e entre zonas rurais e urbanas, como será comentado a seguir. É possível que a exposição tardia nas crianças seja um outro fator importante para essa variação¹⁵³.

A evolução da infecção do EBV para o linfoma de Hodgkin não é bem elucidada. Sabe-se que a grande maioria dos infectados não desenvolve a neoplasia, e o que determina qual paciente irá apresentar alguma transformação neoplásica ainda é objeto de estudo. Os dois mecanismos hipotéticos que explicariam o papel do EBV durante a passagem da célula B pelo CG levando a

imortalização da célula e evolução para linfoma seriam: primeiro, a célula infectada pelo EBV deve ser incapaz de sair do ciclo celular e se tornar uma célula B de memória em repouso; segundo, a resposta da célula T citotóxica deve estar comprometida para que a célula defeituosa não seja eliminada^{154, 155}.

A epidemiologia da infecção do EBV no LH é variável, com índices a depender principalmente do subtipo histológico, sendo as maiores prevalências encontradas nos LHCM e LHDL. O LHEN tem uma faixa intermediária de positividade do EBV (entre 10 e 25%)¹⁵⁶. Outros fatores como aspectos sanitários e econômicos, além de pacientes infectados pelo vírus do HIV, podem interferir no índice de infecção pelo EBV, podendo a prevalência nos casos de LHC chegar próximo a 100% na dependência desses fatores. A cepa viral também é variável a depender da localização geográfica; a cepa 1 prevalente em países ricos e a cepa 2 em países subdesenvolvidos¹⁵⁷, sendo que a cepa do tipo 1 pode transformar a célula B de forma bem mais eficiente que o tipo 2¹⁵⁸.

Nos estudos sobre a epidemiologia do EBV no LH, alguns fatos curiosos são evidenciados; em uma afirmação controversa, observa-se que as regiões do planeta em que há maior associação do LH com o EBV são as que tem menor apresentação da síndrome da mononulceose infecciosa (MI), enquanto as áreas em que a MI é muito frequente, a presença do vírus no tumor é menos comum. As perguntas que surgem a partir desta constatação são várias, como por exemplo: o EBV estaria associado apenas ao linfoma que tem o genoma do vírus no seu DNA ou este microorganismo poderia estar associado à neoplasia mesmo sem ser detectado? Ou seja, EBV está associado com todos os casos de LH ou apenas com aqueles em que se consegue demonstrar expressão de material genético do vírus? Parte da resposta veio ao se demonstrar que o EBV leva a uma hiperexpressão da enzima deaminase citidina induzida por ativação (*Activation-Induced Cytidine Deaminase*) responsável pela hipermutação somática no centro germinativo; logo, com a hiperexpressão enzimática mesmo na ausência de material viral, constata-se que ele não precisa deixar nenhum rastro genético na célula para influenciar na tumorigênese do LH, já que o estímulo para um aumento das taxas de ocorrência da hipermutação somática já foi oferecido durante a infecção^{159, 160}.

A marca registrada do centro germinativo é a promoção da hipermutação somática que leva à formação de células B com BcR com alta afinidade. A expressão do BcR é uma propriedade necessária para que a célula B seja selecionada para sobreviver; quando esta expressão não ocorre, a célula deve entrar em apoptose¹⁶¹.

Porém, o EBV mostrou ser capaz de resgatar esta célula defeituosa da apoptose e permitir que ela prolifere mesmo com mutações desfavoráveis e BcR negativo¹⁶²⁻¹⁶⁴ e, em alguns casos, essas células resgatadas da apoptose podem dar origem a neoplasias como a doença linfoproliferativa pós transplante ou o linfoma de Hodgkin, doenças originada por vias diferentes em células do mesmo *pool* de linfócitos resgatados da apoptose pelo EBV¹⁶³.

Quando a célula B está infectada pelo EBV um grupo de genes virais, designados como genes latentes virais, são expressos. Existem diferentes **padrões de latência do vírus EBV** (Quadro 2), na dependência do estágio de ativação da célula B no qual houve a infecção viral: **a latência do tipo III** (*growth program*), corresponde as células infectadas no seu estado “naive”, no qual são expressos todos os antígenos virais latentes; as células infectadas durante sua passagem no CG exibem um padrão de **latência do tipo II** (*default program*), com expressão restrita ao EBNA1, LMP1, LMP2; as células infectadas deixam o CG para a periferia como células B memória, e passam a não expressar nenhum dos antígenos de latência (também chamado de **latência do tipo 0**); mas algumas expressam apenas EBNA1 e são referidas como padrão de **latência do tipo I**¹⁶⁵. Os linfócitos B imortalizados pela infecção viral são identificados como células de linhagem linfoblastóide e expressam as proteínas latentes virais, que são as seguintes: seis antígenos nucleares (EBNA 1, 2, 3A, 3B, 3C e EBNA-LP), três proteínas latentes de membrana (LMPs 1, 2A e 2B), o EBER, RNA viral não codificante (EBER1 e EBER2) e o micro RNA EBV-codificado¹⁵⁸. O padrão de latência do EBV no LH é o II, no qual são expressos o LMP1 e o LMP2 além do EBNA1. Um vírus recombinante, sem o gene do EBNA1, ainda pode transformar os linfócitos B, porém a eficiência desta transformação se reduz drasticamente visto que, na ausência do EBNA1, a forma epissomal do vírus não pode ser mantida, e o vírus precisaria se integrar ao DNA do

hospedeiro para usar o maquinário celular deste e produzir as proteínas de latência, e a frequência em que isto ocorre é muito menor do que a multiplicação do vírus em forma episomal¹⁵⁸. Já o LMP1 é uma proteína de membrana que, de acordo com estudos genéticos, é essencial, ou de importância crítica, para a transformação de célula B e para a ativação do fenótipo de célula B^{158, 166, 167}. Com relação ao EBER, foi comprovado que partículas virais de EBV mutante que não carregavam o EBER não eram capazes de transformar os linfócitos B ou a eficiência do processo era bastante reduzida; aliás, a hibridização *in situ* do EBER é o método mais confiável e sensível para detectar a infecção pelo EBV^{168, 169}.

Quadro 2 - Padrões de latência do EBV e neoplasias relacionadas¹⁶⁵

Padrão de latência	EBNA-1	EBNA-2	EBNA-3	LMP-1	LMP-2	EBER	Doença
Tipo 1	+	-	-	-	-	+	L. de Burkitt
Tipo 2	+	-	-	+	+	+	Carcinoma de nasofaringe, L. de Hodgkin , L. de células T periféricas
Tipo 3	+	+	+	+	+	+	MI, D. linfoproliferativa ligada ao X, D. linfoproliferativa
Outra	±	-	-	-	+	+	Portador saudável

L: :Linfoma; MI: mononucleose infecciosa; D: doença

Em função da heterogeneidade do Linfoma de Hodgkin em relação a presença ou não do EBV utilizando-se os recursos que dispomos hoje para a sua identificação no material de biópsia, acredita-se que o estudo das subpopulações celulares do microambiente de interesse nesse estudo devam ser avaliadas de forma comparativa nestes 2 subgrupos de pacientes.

1.7. Justificativa do estudo

Esse trabalho se justifica pela importância de avaliar o microambiente de forma mais ampla e analisar seus vários constituintes em conjunto para estabelecer relações, contribuindo com informações que possam ser úteis para a melhor compreensão deste complexo sistema que interage entre si e com as células neoplásicas. Os macrófagos tumorais ativados tem sido demonstrados como importantes no estudo desta neoplasia. Da mesma forma, as subpopulações de células T, em particular as células T_{FH} recentemente reconhecidas e caracterizadas, tem seu papel no microambiente inflamatório das neoplasias hematopoéticas ainda desconhecido e muito pouco explorado.

A avaliação do microambiente nas áreas próximas e distantes das células HRS, proposta no desenho deste estudo, teve como premissa a hipótese de que, tratando-se de um estudo *in situ*, seria possível explorar a possibilidade de que fenômenos mais estritamente relacionados à interação do microambiente mais próximo da célula neoplásica fossem observados de forma diversa das áreas mais distantes, sujeitas a modulações a partir da interação entre as próprias células inflamatórias desse microambiente.

Por fim, não se pode ignorar a participação do EBV em um subgrupo de Linfomas de Hodgkin, o que deve ser necessariamente levado em consideração em um estudo como este que se propõe a avaliar o microambiente inflamatório de uma doença protótipo da interação neoplasia/sistema imune.

Diante disso, tem se investido cada vez mais na busca de um melhor entendimento da influência do microambiente e seus constituintes no comportamento biológico do tumor, em busca de um racional para orientar terapias imunomoduladoras alternativas direcionadas não às células neoplásicas, mas ao desbloqueio e ativação do próprio sistema imune do seu hospedeiro.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Avaliar o microambiente do LHC com especial ênfase nos macrófagos e células T_{FH} e sua relação com os diferentes subtipos histológicos, com o status do EBV e com características clínicas da doença.

2.2. Objetivos secundários

- Analisar a presença da população global de células B, células T, e das subpopulações de células T incluindo as células T auxiliares, células T citotóxicas e células T_{REG} no microambiente e sua relação com o status do EBV e características clínicas da doença.
- Analisar a presença de outras células inflamatórias: eosinófilos, neutrófilos, plasmócitos e fibrose no microambiente e sua relação com o status do EBV, e características clínicas da doença.
- Analisar de forma quantitativa as subpopulações de células inflamatórias incluídas nesse estudo nas regiões próximas e distantes das células HRS e sua relação com o status do EBV e as características clínicas da doença.
- Analisar as associações entre as diferentes populações de células inflamatórias no microambiente do LH.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

A casuística inicial deste estudo compreende pacientes diagnosticados e acompanhados protocolarmente na Divisão de Hematologia do Departamento de Clínica Médica, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) e no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) no período de 2004 a 2014.

Foram **critérios de inclusão**:

- Pacientes incluídos no protocolo de diagnóstico, tratamento e acompanhamento no serviço, sob a responsabilidade da Dra. Valéria Buccheri.
- Pacientes com diagnóstico de linfoma de Hodgkin emitido ou revisado na Divisão de Anatomia patológica do ICHC ou do ICESP.
- Pacientes com material de biópsia "não core" de linfonodo disponível, obtido ao momento do diagnóstico, anterior a qualquer procedimento terapêutico.

Foram **critérios de exclusão**:

- Pacientes com prontuário incompleto.
- Pacientes HIV positivos.
- Amostras de biópsia com material representativo insuficiente.

Aplicados os critérios acima, 146 casos de um total de 458 avaliados foram selecionados para o estudo. Dos casos excluídos, 5 foram retirados do trabalho por apresentarem positividade para o vírus do HIV, e os demais 307 foram excluídos por não possuírem material suficiente em bloco de parafina para extração do material para TMA. Não foi necessário excluir nenhum paciente por prontuário incompleto, visto que as informações necessárias estavam atualizadas.

3.2. Métodos

3.2.1. Protocolo clínico

Os dados epidemiológicos, clínicos e do tipo de tratamento foram obtidos a partir de revisão dos prontuários, incluindo idade, sexo, *status* HIV, presença de sintomas B, estadiamento segundo a classificação de Lugano de 2014³⁸, resposta ao tratamento, recidiva (reaparecimento de sinais clínicos ou radiológicos da doença após 3 meses do término do tratamento) e refratariedade (falha em obter remissão ao menos parcial após o término do tratamento), além da constatação ou não de óbito pela doença.

3.2.2. Avaliação de representatividade do material de biópsia de linfonodo, revisão do diagnóstico e classificação histológica

Todos os casos foram avaliados pela pós-graduanda (A.C.F.M.M.L.) para analisar a possibilidade de extração de seis pontos de TMA do bloco de parafina. Quando a lâmina de H&E tinha quantidade suficiente de material, verificava-se se a amostra ainda disponível no bloco permitiria a extração. Se sim, o caso era selecionado como positivo e seguia no trabalho. Neste momento, era feita também revisão diagnóstica e classificação do subtipo histológico. A confirmação do diagnóstico foi feita com exame imuno-histoquímico usando os marcadores CD30, CD15, CD20 e Pax-5. Sendo que todos os casos foram positivos para CD30 e negativos para CD20 nas células neoplásicas.

3.2.3. Seleção das áreas de interesse e preparo do TMA

Devido ao fato de ser grande o número de casos e de marcadores a serem estudados, optou-se por utilizar o TMA para otimizar o tempo, custo e uniformidade do estudo. Desta forma, as lâminas de hematoxilina-eosina dos blocos de parafina foram usadas como base para selecionar áreas com maior concentração e menor concentração de células de Hodgkin/Reed-Sternberg; com as áreas selecionadas na lâmina através da observação do H&E pelo

microscópio óptico, seguia-se para a marcação no bloco de parafina com caneta de retroprojeção de ponta média (Figura 5). É importante observar que, neste momento, o bloco era analisado para verificar se realmente correspondia à lâmina em estudo, e se as áreas selecionadas estavam viáveis. Toda esta seleção foi feita pela pós-graduanda (A.C.F.M.M.L.).

Figura 5 - Blocos de parafina com marcação para seleção de *spots* de TMA. As áreas selecionadas na lâmina de H.E. foram marcadas nos blocos de parafina

Em todos os casos foram selecionadas 6 áreas, sendo 3 delas próximas à célula HRS e 3 áreas distantes da célula em estudo. Para o estudo do microambiente, consideramos de forma arbitrária a distância de 3 células HRS como áreas distantes da célula neoplásica, e distâncias menores que essas, áreas próximas. Sempre que se fez necessário, essa distância foi medida usando a régua micrométrica; considerando o tamanho da célula como $50\ \mu\text{m}^{171}$, a distância mínima para se observar a área em estudo como distante seria $150\ \mu\text{m}$, ou $0,15\ \text{mm}$. Após esta seleção e marcação, foi elaborado um “mapa”, construído em uma planilha no Excel em que havia a identificação de correspondência entre os pontos do TMA e os casos representados, com identificação dos pontos que representavam as áreas próximas e as áreas distantes da célula de H/RS.

Após a seleção das áreas o bloco receptor do TMA foi preparado com a seguinte técnica:

- os blocos receptores de TMA são feitos a 56°C com parafina de elevada pureza (o que garante a execução de cortes histológicos delgados e homogêneos, além de evitar possíveis rachaduras no ato da perfuração das agulhas) contendo polímero em molde com cassete comum;
- o recipiente é mantido na estufa a 60°C overnight para retirada de possíveis bolhas e estabilização da parafina;
- são retirados da estufa e imediatamente levados a geladeira para a solidificação rápida evitando a formação de pontos de ar;
- após a solidificação da parafina, o bloco deverá receber acabamento e ser aparado em micrótomo rotativo para garantir a superfície completamente reta e lisa;
- determinada a profundidade entre 0,8 e 0,9 cm, o “bloco receptor” está pronto para receber os cilindros de até 0,6 cm de profundidade.

A biomédica Aline Assato realizou a conferência e organização dos blocos doadores, então ela seguiu para a extração do material usando a agulha de 1,0 mm, todo esse processo ocorreu no LIM-14 da FMUSP. A técnica usada foi a seguinte:

- é definida a profundidade de 0,6 cm a fim de evitar diferenças nos níveis de cilindros de um bloco TMA para outro;
- o bloco receptor é fixado na base do aparelho;
- o eixo X e Y do aparelho são ajustados para que o TMA fique centralizado no bloco receptor;
- perfuração do bloco receptor com agulha azul;
- desprezar a parafina extraída;
- posicionamento do bloco doador;
- perfuração exata da região marcada pelo patologista com agulha vermelha;
- transferência do material para o bloco receptor;
- quando da introdução do cilindro, pressionar levemente para baixo evitando extrapolação do nível superficial;
- limpeza dos resíduos das agulhas com gaze seca;

- após a execução de todos os spots, o bloco pronto é colocado na estufa a 60°C (amolecer a parafina) e realiza-se o nivelamento dos *spots* pressionando a superfície do bloco em superfície lisa (Figura 6);
- o bloco recebe um número sequencial do LIM14;
- secção dos blocos TMA por microtomia;
- análise do intervalo com menor perda;
- banhos de parafina para preservação da imunorreatividade.

Figura 6 - Bloco de parafina final do TMA. Bloco “receptor” de parafina de TMA após a inserção do material selecionado em blocos de parafina “doadores”

Após o término deste processo, novas lâminas foram elaboradas com os cortes de TMA para a realização das reações imuno-histoquímicas e posterior análise (Figura 7).

Figura 7 - Fotografia panorâmica de corte histológico do bloco de TMA. Coloração com o anticorpo anti-CD20

3.2.4. Técnica imuno-histoquímica

As reações imuno-histoquímicas dos marcadores CD15, CD30, PAX5 (utilizados para confirmação diagnóstica), CD20, CD3, CD4, CD8, CXCR-5, PD-1, CD68, CD163, LMP1 e Fox-P3 foram realizadas individualmente, sendo que cada conjunto de 6 lâminas seriadas foi marcado com um anticorpo primário específico (Quadro 3).

Quadro 3 - Especificações relativas aos anticorpos primários

Anticorpos (anti-)	Fabricante	Código	Clone	Título	Retrieval method	Célula alvo
CXCR5	ABCAM	Ab46218	Policlonal	1:1500	EDTA, pH 8	Células Tfh
PD-1	ABCAM	Ab52587	NAT105	1:50	TRIS-EDTA, PH9	Células T _{FH} , T CD8+, macrófagos
CD68	DAKO	M0876	PG-M1	1:2500	Citrate, pH 6	Macrófago
CD163	LEICA NOVOCASTRA	NCL-L-CD163	10D6	1:300	TRIS-EDTA, pH 9	Macrófago
CD3	LEICA NOVOCASTRA	NCL-L-CD3-565	LN10	1:1500	Citrate, pH 6	Linfócitos T
CD8	DAKO	M7103	C8/144B	1:400	TRIS-EDTA, pH 9	Linfócitos T citotóxicos
CD4	LEICA NOVOCASTRA	NCL-LCD4-368	4B12	1:50	EDTA pH 8	Linfócitos T auxiliares
Fox-p3	Epitomics	EO01-2305	EP340	1:100	TRIS-EDTA, pH 9	Linfócitos T regulatórios
CD20	DAKO	M0755	L26	1:2500	Citrate, pH 6	Linfócitos B
PAX5	LEICA NOVOCASTRA	NCL-L-PAX-5	1EW	1:50	Citrate, pH 6	Linfócitos B e Células HRS
CD15	DAKO	M0733	C3D-1	1:50	TRIS-EDTA pH 9	Células HRS
CD30	LEICA NOVOCASTRA	NCL-L-CD30	JCM182	1:40	TRIS-EDTA pH 9	Células HRS
EBV	ABCAM	Ab78113	CS 1-4	1:800		Proteínas de fase latente do EBV LMP1/LMP2

Os cortes de linfonodo com infiltração por linfoma de Hodgkin, preparados em blocos de TMA, foram colocados em lâminas silanizadas (*Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, EUA*) em suporte adequado. O processo de desparafinização foi feito ao colocar as lâminas em xilol quente, em estufa a 60 – 65°C, durante 5 minutos e depois em 3 banhos de xilol frio. Para hidratação dos cortes as lâminas foram colocadas em dois banhos de álcool absoluto, um banho de álcool 95° e um banho de álcool 70°. Em seguida, foram lavadas em água corrente, água deionizada e deixadas em tampão fosfato pH 7,4 (PBS).

A recuperação dos sítios antigênicos foi realizada por alta temperatura utilizando os seguintes tampões: citrato pH 6 (para CD163, CD68, PAX5, CD20, CD3); Tris-EDTA pH 9 (para PD-1, CD15, CD30, CD8 e CD4); EDTA pH8 (para CXCR5).

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada 10 volumes (3%), em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente, água destilada e deixadas em tampão tris-fosfato pH 7,4 (TBS). Os anticorpos primários foram titulados em tampão de diluição nas concentrações mostradas na tabela abaixo.

As lâminas foram incubadas *overnight* a 4°C em câmara úmida. Posteriormente foi feita a incubação com o anticorpo secundário/sistema de amplificação *NOVOLINK POLYMER* (*Leica Biosystems*) por 30 minutos em estufa 37 graus.

Foi utilizado como substrato/cromógeno a Diaminobenzidina (DAB) (*Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha*). Posteriormente foi realizada a contra-coloração com hematoxilina de Harris (*Merck, Darmstadt, Alemanha*).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	CTRL LIM14	CTRL LIM14	CTRL LIM14	CTRL LIM14	70-2251-4 P	70-2251-4 P	70-2251-4 P	70-2251-4 V	70-2251-4 V	70-2251-4 V	61-3250-2 P	61-3250-2 P	61-3250-2 P	61-3250-2V
2	61-3250-2 V	61-3250-2 V	63-5384-3b P	63-5384-3b P	63-5384-3b P	63-5384-3b V	63-5384-3b V	63-5384-3b V	66-7007-5 P	66-7007-5 P	66-7007-5 P	66-7007-5 V	66-7007-5 V	66-7007-5 V
3	61-3145-0A P	61-3145-0A P	61-3145-0A P	61-3145-0A V	61-3145-0A V	61-3145-0A V	62-8468-0 P	62-8468-0 P	62-8468-0 P	62-8468-0 V	62-8468-0 V	62-8468-0 V	66-4263-2 P	66-4263-2 P
4	66-4263-2 P	66-4263-2 V	66-4263-2 V	66-4263-2 V	66-4813-3 P	66-4813-3 P	66-4813-3 P	66-4813-3 V	66-4813-3 V	66-4813-3 V	66-4884-2A2 P	66-4884-2A2 P	66-4884-2A2 P	66-4884-2A2 V
5	68-4884-2A2 V	68-4884-2A2 V	60-7205-4 P	60-7205-4 P	60-7205-4 P	60-7205-4 V	60-7205-4 V	60-7205-4 V	66-1813-8 P	66-1813-8 P	66-1813-8 P	66-1813-8 V	66-1813-8 V	66-1813-8 V
6	69-9810-0B P	69-9810-0B P	69-9810-0B P	69-9810-0B V	69-9810-0B V	69-9810-0B V	65-9471-9 P	65-9471-9 P	65-9471-9 P	65-9471-9 V	65-9471-9 V	65-9471-9 V	62-7429-3A1 P	62-7429-3A1 P
7	62-7429-3A1 P	62-7429-3A1 V	62-7429-3A1 V	62-7429-3A1 V	62-3917-0 P	62-3917-0 P	62-3917-0 P	62-3917-0 V	62-3917-0 V	62-3917-0 V	65-9057-8C P	65-9057-8C P	65-9057-8C P	65-9057-8C V
8	65-9057-8C V	65-9057-8C V	61-7998-3 P	61-7998-3 P	61-7998-3 P	61-7998-3 V	61-7998-3 V	61-7998-3 V	64-5184-5A P	64-5184-5A P	64-5184-5A P	64-5184-5A V	64-5184-5A V	64-5184-5A V
9	61-4363-6 P	61-4363-6 P	61-4363-6 P	61-4363-6 V	61-4363-6 V	61-4363-6 V	63-9163-0 P	63-9163-0 P	63-9163-0 P	63-9163-0 V	63-9163-0 V	63-9163-0 V	67-7821-6 P	67-7821-6 P
10	67-7821-6 P	67-7821-6 V	67-7821-6 V	67-7821-6 V	61-4893-0A P	61-4893-0A P	61-4893-0A P	61-4893-0A V	61-4893-0A V	61-4893-0A V	64-8831-5 P	64-8831-5 P	64-8831-5 P	64-8831-5 V
11	64-8831-5 V	64-8831-5 V	63-8529-0A P	63-8529-0A P	63-8529-0A P	63-8529-0A V	63-8529-0A V	63-8529-0A V	63-8165-0 P	63-8165-0 P	63-8165-0 P	63-8165-0 V	63-8165-0 V	63-8165-0 V
12	65-1802-8 P	65-1802-8 P	65-1802-8 P	65-1802-8 V	65-1802-8 V	65-1802-8 V	67-4939-9A1 P	67-4939-9A1 P	67-4939-9A1 P	67-4939-9A1 V	67-4939-9A1 V	67-4939-9A1 V		

Figura 8 - Planilha do excel com mapa mostrando correspondência de cada caso com os spots do TMA

Fox-P3 - O procedimento técnico para a realização desta reação seguiu as seguintes especificações: lâminas de TMA submetidas ao processo de desparafinização em estufa a 75°C por 12 horas – não foi usado xilol ou álcool neste procedimento. A recuperação antigênica foi realizada com solução HIGH PH por 20 minutos a 97°C; bloqueio de peroxidase endógena por 10 minutos em água oxigenada (10 volumes, 3%); incubação do anticorpo primário (Fox-P3 – clone EP340, *Rabbit Monoclonal Anti-Human*) por 45 minutos; o amplificador usado foi o *Linker of Rabbit* por 20 minutos; polímero HRP por 20 minutos; revelação com DAB por 5 minutos; contracoloração com hematoxilina por 16 segundos. Todas as etapas descritas acima exigem lavagem com PBS entre elas. Todos os produtos usados na técnica descrita são da marca DAKO, com exceção do anticorpo primário que é da marca Epitomics.

EBER - Para a realização da hibridização do EBV para a pesquisa dos EBERs a metodologia usada foi automatizada, com o equipamento *BenchMark Ultra* da Ventana. Os insumos usados foram *Inform EBER (Epstein-Barr Virus EARLY RNA Probe*, Referência: 800-2842, Marca: Ventana, pronta para uso). O kit de detecção foi o *ISH VIEW Blue* (Referência: 800-092, Marca: Ventana, pronto para uso).

3.2.5. Análise da imunoexpressão para os diferentes anticorpos

Para a análise imuno-histoquímica (IHQ) de cada anticorpo, foram considerados *spots* representativos quando pelo menos 50% do *spot* era representado pelo tecido de interesse, livre de artefatos.

As análises dos anticorpos foram individualizadas como descrito a seguir:

Imunoexpressão nas células HRS

1. **CD20, CD30, CD15, PAX5:** imunoexpressão positiva ou negativa na maioria das células HRS, utilizados para confirmação diagnóstica de LH clássico.
2. **LMP1 e EBER** (Hibridização *in situ* - HIS) – reação positiva ou negativa na maioria das células HRS, sendo considerado EBV+ a positividade para um e/ou outro teste.

Imunoexpressão no microambiente

Todas as lâminas foram digitalizadas utilizando o escaner Pannoramic Digital Slide Scanner P250 da 3DHISTECH, com a objetiva de 40x. Para a análise quantitativa dos diversos marcadores caracterizando os diferentes tipos celulares, foi utilizado o programa *Image-Pro Plus*, (V.5 Media Cybernetics, Inc.) utilizando-se um computador *Sony Vaio*. Este programa apresenta, dentre as suas funções, aquisição de imagens; processamento de imagens; calibração morfolométrica, densiométrica e de perspectiva; contagem de objetos; medição de parâmetros (incluindo área, perímetro e densidade de preenchimento); ferramentas de seguimento (para realizar comparações) e co-localização. Este *software* dispõe também de ferramentas que permitem mostrar os dados analisados em gráficos com histogramas e diagramas bi-variantes.

1. Para os anticorpos **CD20, CD3, CD4, CD8, CD68 e CD163** foi realizada a análise quantitativa com aumento de 380x, sendo calculada a relação entre

área imunomarcada/ área total analisada. A totalidade do spot em questão foi analisada. Os resultados foram descritos em valores absolutos, que vão de 1,0, que indica 100% de área imunomarcada, e 0,0 que indica 0% de área imunomarcada (Figura 10). A seguir foi calculada, **para cada caso**, a média das áreas dos 3 *spots* correspondentes às AP e dos 3 *spots* correspondentes às áreas distantes (AD) das células HRS, sendo esse valor multiplicado por 100 novamente e expresso em forma de porcentagem. A diferença da media dos *spots* das AP e da media dos *spots* das AD foi chamada de “dif”. Quando a média das AP > média das AD o dif é positivo. O dif é negativo no caso contrário, ou seja, quando a média das AD é > do que a média das AP às células HRS.

2. **Para os anticorpos CXCR-5, PD-1 e Fox-P3** foi utilizada a quantificação manual, por objeto marcado - linfócito pequeno/campo de grande aumento (Figuras 10 e 11-CGA, 400x). A totalidade do *spot* em questão foi analisada. Para estes Acs, foi utilizada da mesma forma a média dos 3 *spots* para caracterizar as AP e AD **de cada caso**, expressa em números absolutos. A “dif” corresponde à diferença entre esses valores, calculada da mesma forma do que no item logo acima.

3.2.6. Análise das demais populações de células inflamatórias e fibrose

A análise das demais células inflamatórias como eosinófilos, neutrófilos e plasmócitos, foi realizada em preparados histológicos representados por fragmentos inteiros de tecido submetidos a coloração convencional pela Hematoxilina & Eosina (H&E), sendo semiquantificados visualmente em negativos (0), correspondendo até a 1/3 das células nucleadas (1+), entre 1/3 e 2/3 das células nucleadas (2+) e >2/3 das células nucleadas (3+). Da mesma forma, a quantidade de fibrose foi estimada em ausente (0), discreta/ focal (1+), moderada (2+) e acentuada (3+).

3.2.7. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa *Minitab* (*Minitab® Statistical Software – 18th Version*). Todos os testes foram realizados assumindo nível de significância estatística $\alpha=5\%$.

Para as análises foram utilizados diferentes testes de acordo com o dado avaliado e as peculiaridades de cada análise. Os testes escolhidos são identificados a seguir: *status* EBV x idade (teste-T), *status* EBV x sexo, tipo histológico, estágio inicial, presença de sintomas B, refratariedade ou recidiva (Qui-quadrado para associação) ou *status* EBV x estágio inicial (teste Kruskal-Wallis).

Na avaliação dos seguintes marcadores – CD3, CD4, CD8, CD20, CD163 e CD68 – foram feitas algumas variações de acordo com a análise realizada: imunomarcador próximo ou distante da célula HRS x *status* EBV, sexo, tipo histológico, estágio inicial, presença de sintomas B, de refratariedade ou recidiva e presença de óbito pela doença (Kruskal-Wallis), proporção do imunomarcador em áreas próximas ou distantes da célula HRS x idade (teste de correlação de Spearman). Os marcadores PD-1, Fox-P3 e CXCR5, utilizaram os mesmos testes estatísticos ao serem comparadas as variáveis correspondentes com os antígenos estudados, como descrito acima; porém, enquanto aqueles antígenos foram estudados observando a proporção de área imunomarcada, nestes marcadores foi avaliado a quantidade de células positivas por 10 campos de grande aumento (CGA), segundo referido acima.

Também analisamos semiquantitativamente no linfonodo a presença de eosinófilos, plasmócitos, neutrófilos e fibrose; fizemos a comparação com a quantidade de CD3, CD20, CD68, CD163, CXCR-5, PD-1 e Fox-P3 usando o teste de correlação de Spearman. A correlação de Spearman também foi utilizada para avaliar a relação destes parâmetros com o Status EBV, estágio inicial, presença de sintomas B, de refratariedade ou recidiva e presença de óbito pela doença.

3.2.8. Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da USP sob o número CAEE 57418116.1.0000.0068 e com parecer positivo de número 1.629.293 (Anexo 1).

Foi solicitada a dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) dos pacientes para o comitê de ética, com obtenção de parecer positivo, devido ao caráter retrospectivo da pesquisa e ao fato de a confidencialidade garantida, bem como a ausência de acréscimo de risco aos pacientes do estudo.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação dos dados clínicos e classificação histológica e sua associação com o status do EBV na neoplasia

Os resultados estão apresentados na **Tabela 1** e serão descritos de forma resumida a seguir.

Dos pacientes avaliados, 145 tiveram o **status EBV** definido pelo exame imuno-histoquímico, e/ou pela hibridização *in situ*, sendo 91 EBV negativos (62,76%) e 54 EBV positivos (37,24%); dos 54 casos EBV positivos, 51 foram positivos à hibridização *in situ* (EBER), 43 foram positivos pela IHQ (LMP1) e 40 foram positivos em ambos; desses casos, 3 foram positivos para LMP1 e negativos para o EBER; dos 91 casos EBV negativos, 26 foram negativos para ambos, 65 foram negativos para EBER e inconclusivos para LMP1; apenas 1 caso foi inconclusivo para os dois marcadores, sendo excluído da análise.

A **média de idade** da amostra foi de 34,66 anos e a mediana de 29, sendo que a mínima foi de 14 anos e a máxima 78. Ao segregar a **idade pelo status EBV**, a média em pacientes EBV negativos foi de 31,10 anos, com mediana de 27, sendo a idade mínima de 16 e a máxima de 78; já os pacientes EBV positivos tiveram média de idade de 40,83 anos, mediana de 38, com idade mínima de 14 e máxima de 76. A **média de idade** em anos dos pacientes EBV positivos foi cerca de 1 década maior do que a média de idade dos pacientes EBV negativos ($p=0,001$).

Outro parâmetro que mostrou significância estatística comparando com o *status* EBV foi o **estadiamento dos pacientes ao diagnóstico**, sendo que a maioria dos pacientes EBV positivos apresentou-se predominantemente em estádios avançados (III/IV), enquanto a distribuição dos casos EBV negativos foi semelhante nos estádios precoces (I/II) e avançados (III/IV) ($p=0,005$). Em relação à **recidiva**, ela ocorreu em 25% dos pacientes, sendo mais frequente no grupo EBV negativo, com significância marginal ($p=0,053$).

Tabela 1 - Características clínicas e subtipo histológico nos diferentes status EBV

<div>STATUS EBV</div> <div>PARÂMETRO CÍNICO</div>	TOTAL (%)	POSITIVO	NEGATIVO	p
No. de pacientes (%)	145	54 (37%)	91 (63%)	
Idade (média +/- idade)	34,7 ± 4,7	40,8 ± 0,8	31,1 ± 1,1	0,001
Sexo (F/M)	80/65	28/26	52/39	0,536
TIPO HISTOLÓGICO (%) (n=145)				
CM	17 (12%)	13 (76%)	4 (24%)	0,003
RL	8 (5%)	4 (50%)	4 (50%)	
EN	114 (79%)	35 (31%)	79 (69%)	
DL	0	0	0	
Inconclusivo	6 (4%)	2 (50%)	4 (50%)	
SINTOMAS B (n=145)				
Presentes	110 (76%)*	42	67	0,448
Ausentes	35 (24%)	11	24	
ESTÁDIO (n=144)				
I/II	62 (43%)	15	47	0,005
III/IV	82 (57%)*	38	43	
REFRATARIEDADE (n=132)				
Presente	21 (16%)	5	16	0,118
Ausente	111 (84%)	46	65	
RECIDIVA (n=145)				
Presente	34	8	26	0,053
Ausente	111	46	65	
ÓBITO DO PACIENTE DEVIDO À DOENÇA(n=145)				
Óbito não	128	46	82	0,379
Óbito sim	17	8	9	

DP: Desvio padrão; F: Feminino; M: Masculino; CM: Celularidade mista; RL: Rico em linfócitos; EN: Esclerose nodular; DL: Depleção linfocitária; NA: Não se aplica. * Um dos pacientes com sintomas B e estágio III/IV não obteve status conclusivo da positividade do EBV no tumor. Destaques em amarelo: valores de p significantes, em azul, valores de p com significância marginal.

A **classificação nos subtipos histológicos** foi possível em 139/145 (96%) casos, correspondendo a EN em 79% (114/145), CM em 12% (17/145) e RL em 5% (8/145). Não houve nenhum classificado como depleção linfocitária e 6 casos foram designados como inclassificáveis. A distribuição dos **subtipos**

histológicos também foi diferente em relação ao *status* do EBV no tumor ($p=0,003$), observando-se que, apesar de ambos linfomas EBV+ e EBV-, apresentarem predomínio do subtipo EN, o grupo de casos EBV positivos apresenta três vezes mais casos do subtipo CM quando comparado ao grupo EBV negativo.

4.2. Distribuição topográfica da Imunomarcagem para células T (CD3) e subpopulações: T auxiliaadoras (CD4), T citotóxicas (CD8) e T regulatórias (Fox-P3) e sua associação com o *status* do EBV e os dados clínicos

Os resultados estão apresentados na **Tabela 2** e serão descritos de forma resumida a seguir.

Sobre as análises com os valores de proporção de área imunomarcada com o **CD3 (células T)**, não houve diferença de expressão do CD3 (linfócitos T) em relação ao *status* do EBV. Observamos significância estatística nas áreas próximas em relação ao sexo, sendo maior no sexo feminino ($p=0,045$), ao **tipo histológico** da neoplasia, sendo maior nos subtipos RL e CM do que nos demais ($p=0,026$). A proporção de áreas CD3 positivas foi inversamente proporcional a ocorrência de óbitos pela doença em ambas, AP e AD ($p=0,03$ e $0,008$, respectivamente). Ainda foi observada significância estatística na comparação entre a **ocorrência de refratariedade ao tratamento convencional** e a distribuição das células T CD3+, ao se observar a diferença entre a expressão de CD3 em áreas próximas e distantes em pacientes com doença refratária e não refratárias, sendo que, em pacientes refratários, o CD3 predominou nas áreas próximas a célula HRS, enquanto nos pacientes não refratários o CD3 foi predominante nas áreas distantes ($p=0,006$).

Na análise do CD4 (células T auxiliaadoras), em relação ao ***status* do EBV na neoplasia**, foi constatado que nas áreas distantes da célula HRS, houve menor imunomarcagem por CD4 nos pacientes EBV positivos do que os nos pacientes EBV negativos ($p=0,04$). Em relação a **doença refratária**, em áreas próximas à célula HRS a imunoexpressão de CD4 em pacientes refratários foi

maior do que em pacientes não refratários ($p=0,039$). Em relação à **presença de óbito devido à doença**, ao se avaliar o CD4 em áreas distantes às células HRS, observou-se que os pacientes que não foram a óbito pela doença tiveram imunoexpressão de CD4 maior em relação aos pacientes que faleceram pela doença ($p=0,026$).

A avaliação do CD8 (Figura 9 - Linfócitos T citotóxicos), em pacientes com diferentes **status do EBV**, mostrou que a imunoexpressão de CD8 foi maior nos tumores EBV positivos em relação aos EBV negativos, em ambas, áreas próximas ($p<0,001$) e distantes à célula HRS ($p<0,001$). Ainda em relação ao EBV observou-se que casos EBV positivos apresentam CD8 em AP>AD, e os tumores EBV negativos apresentam o inverso, AD>AP ($p=0,027$). Em relação ao **tipo histológico**, observou-se maior imunoexpressão de CD8 nas áreas distantes as células HRS nos subtipos CM e RL em relação aos demais ($p=0,023$). Em relação ao **estádio clínico**, nas áreas próximas da célula HRS a imunoexpressão de CD8 foi maior nos estádios avançados do que nos estádios precoces, ($p=0,043$). Em relação aos **sintomas B**, os pacientes em que os sintomas estavam presentes, a imunomarcagem para o CD8 nas AP-HRS era maior que nas AD-HRS, sendo que nos pacientes sem sintomas, as células CD8 se concentravam mais nas AD-HRS ($p<0,001$).

Figura 9 - Spot do TMA representando imunomarcagem do CD8 (aumento 380x)

O **Fox-p3** foi realizado para avaliar as **células T_{REG}**. Ao se analisar o **status EBV** foi demonstrado que a quantidade de células positivas para o Fox-p3 é menor em tumores EBV positivos do que em pacientes EBV negativos ($p=0,033$) nas AP-HRS. A avaliação do **estádio**, revelou que o contingente de células Fox-p3 positivas era maior nos estádios I/II do que os estádios III/IV ($p<0,001$) em AD-HRS. Em relação à distribuição das células Treg, nos estádios avançados III e IV, essas células mostraram tendência a se concentrarem mais nas AP-HRS, enquanto que nos estádios iniciais I e II, essas células mostraram-se em maior densidade nas AD-HRS ($p=0,057$). Em relação aos **sintomas B**, a presença de maior número de células Fox-p3+ associou-se a pacientes sem sintomas B quando comparados aos pacientes com sintomas B nas AD-HRS ($p=0,044$).

Tabela 2 - Associação entre variáveis clínicas e imunomarcadores de células T (CD3), células T Helper (CD4), células T citotóxicas (CD8) e células T Regulatórias (Fox-P3).

Variáveis clínicas		CD3 (medianas)				CD4 (medianas)				CD8 (medianas)				Fox-P3 (medianas)			
		N	Prox.	Dist.	Dif.	N	Prox.	Dist.	Dif.	N	Prox.	Dist.	Dif.	N	Prox.	Dist.	Dif.
Status EBV	Positivo	54	20,71%	22,01%	0,00525	51	7,36%	5,86%	0,0024	54	11,57%	9,42%	0,0089	31	23	16	-2,5
	Negativo	91	22,98%	22,45%	0,0105	91	12,66%	12,11%	0	91	4,49%	5,76%	-0,0032	55	38	23	6
Valor de p			0,537	0,702	0,701		0,054	0,04	0,577		<0,001	<0,001	0,027		0,033	0,082	0,964
Sexo	F	81	24,71%	22,79%	0,0105	78	12,44%	7,66%	0,01125	81	6,36%	7,26%	-0,00155	48	34	21	5,5
	M	65	19,94%	21,22%	0,0057	65	7,65%	6,51%	0,0004	65	8,25%	7,51%	-0,0007	38	25,5	16,5	1,5
Valor de p			0,045	0,15	0,368		0,272	0,066	0,06		0,421	0,514	0,97		0,524	0,235	0,909
Tipo histológico	CM	17	25,14%	26,68%	0,0276	16	13,72%	8,75%	0,00115	17	10,53%	9,94%	-0,00115	9	18	27,5	-5
	RL	8	34,85%	33,97%	0,02285	8	27,77%	27,55%	0,01235	8	10,21%	10,58%	-0,01285	6	27	4	-10
	EM	115	19,77%	20,83%	0,0057	115	8,49%	5,80%	0,0024	115	5,26%	6,79%	-0,0011	71	34	21	5,5
	Inconclusivo	6	16,59%	16,22%	0,00465	6	8,45%	11,22%	-0,01855	6	9,15%	6,47%	-0,0015	3	24	23	26
Valor de p			0,026	0,093	0,803		0,415	0,083	0,794		0,07	0,023	0,716		0,79	0,293	0,866
Estádio I-II / III-IV	I-II	62	20,53%	20,28%	0,00255	62	10,10%	6,64%	0,00825	62	5,08%	7,17%	-0,0093	36	36,5	29,5	-5
	III-IV	82	23,11%	23,32%	0,0099	81	7,65%	8,18%	0,0004	82	9,09%	7,95%	0,0051	50	25	11	14
Valor de p			0,446	0,614	0,699		0,575	0,598	0,879		0,043	0,515	0,066		0,127	<0,001	0,057
Sintomas	Positivo	110	21,17%	21,31%	0,0112	107	13,67%	9,74%	0,008	110	8,22%	7,22%	0,0026	66	34	17	7
	Negativo	35	24,86%	24,21%	0,0048	35	9,89%	6,76%	0,0009	35	6,17%	8,08%	-0,0204	21	24	28	-7,5
Valor de p			0,411	0,094	0,451		0,317	0,431	0,698		0,537	0,143	<0,001		0,706	0,044	0,15
Refratariedade	Positivo	22	24,08%	21,03%	0,047	22	19,26%	15,17%	0,0664	22	6,44%	5,33%	0,001	14	30	28	-0,5
	Negativo	111	19,97%	21,82%	-0,0112	110	7,93%	5,97%	0,0002	111	7,89%	7,75%	-0,0017	64	26	17	6
Valor de p			0,319	0,529	0,006		0,039	0,134	0,168		0,49	0,055	0,19		0,527	0,233	0,57
Recidiva	Ausente	111	19,97%	21,82%	-0,0112	110	7,93%	5,97%	0,0002	111	7,89%	7,75%	-0,0017	64	26	17	6
	Precoce	3	11,03%	3,87%	0,0125	3	6,69%	4,55%	-0,0361	3	13,48%	6,98%	0,065	2	60,5	12	48,5
	Tardia	9	27,78%	28,25%	0,0111	9	22,23%	18,31%	0,0001	9	6,99%	8,08%	-0,0143	5	67	36	15
Valor de p			0,212	0,079	0,518		0,368	0,453	0,678		0,93	0,797	0,188		0,089	0,414	0,533
Óbito devido à doença	Não óbito	129	23,68%	22,85%	NA	129	12,16%	9,17%	NA	129	7,68%	7,57%	NA		31	20,5	NA
	Óbito	17	12,51%	11,22%	NA	17	4,95%	3,19%	NA	16	8,05%	6,13%	NA		30	22	NA
Valor de p			0,03	0,008	NA		0,119	0,026	NA		0,791	0,155	NA		0,65	0,544	NA
Presença de recidiva e/ou refratariedade	Não evento	111	21,26%	22,19%	NA	108	9,19%	6,30%	NA		7,87%	7,75%	NA		63	18,5	NA
	Evento	35	23,62%	22,45%	NA	35	15,23%	14,16%	NA		6,99%	5,55%	NA		18	26,5	NA
Valor de p			0,399	0,673	NA		0,063	0,141	NA		0,828	0,089	NA		0,121	0,408	NA

N: Número de pacientes; Prox: Próximo da célula HRS; Dist: Distante da célula HRS; Dif: Área próximo da célula HRS – área distante da célula HRS; F: Feminino; M: Masculino; CM: Celularidade mista; RL: Rico em linfócitos; EM: Esclerose nodular; NA: Não se aplica. Destaques em amarelo: valores de p significantes, em azul, valores de p com significância marginal

4.3. Distribuição topográfica da Imunomarcção para células T auxiliares-foliculares (T_{FH}) (CXCR-5 e PD-1) e sua associação com o status do EBV e os dados clínicos

Os resultados estão apresentados na **Tabela 3** e serão descritos de forma resumida a seguir.

Tabela 3 - Relação entre variáveis clínicas e imunomarcadores de células T Helper folicular (CXCR-5 e PD-1)

Variáveis Clínicas		CXCR5 (Medianas)				PD-1 (Medianas)			
		N	Prox	Dist	Dif	N	Prox	Dist	Dif
Status EBV	Positivo	54	14	14	-3	24	13,5	61	-8
	Negativo	91	21	22	0	35	13	23	0
Valor de p			0,001	0,002	0,283		0,66	0,44	0,445
Tipo Histológico	CM	17	21	14	-1	9	59	63	11,5
	RL	8	19,5	18,5	-0,5	4	5	9	0
	EN	115	19	20	0	44	18	30,5	-2
	Inc.	6	30	29,5	-4	3	12	113	-51,5
Valor de p			0,934	0,575	0,943		0,034	0,089	0,388
Estádio Inicial I-II/III-IV	I-II	62	20	19,5	0	21	18	44	-2
	III-IV	82	19	22	-2	37	12	23	-2
Valor de p			0,636	0,252	0,581		0,405	0,622	0,48
Sintomas B	Positivo	110	20,5	22	-1	45	15,5	34	-1
	Negativo	35	19	18	0	16	13	23	-10
Valor de p			0,785	0,266	0,525		0,632	0,694	0,3
Refratariedade	Positivo	22	27	28	-5	47	13	28	-1
	Negativo	111	19	20	-1	9	13	31	2
Valor de p			0,138	0,108	0,524		0,278	0,772	0,494
Recidiva	Ausente	111	19	20	-1	47	13	28	-1
	Precoce	3	36	38	1	1		196	
	Tardia	9	20	16	0	5	18	117	-23
Valor de p			0,462	0,32	0,666		0,563	0,112	0,259
Óbito pela doença	Não Óbito	127	19	20	NA	57	14	30	NA
	Óbito	16	21	30	NA	7	11,5	42	NA
Valor de p			0,921	0,144	NA		0,8	0,279	NA

N: Número de pacientes; Prox: Próximo da célula HRS; Dist: Distante da célula HRS; Dif: Área próximo da célula HRS – área distante da célula HRS; F: Feminino; M: Masculino; CM: Celularidade mista; RL: Rico em linfócitos; EM: Esclerose nodular; Inc: Inconclusivo; NA: Não se aplica

Em relação ao **status do EBV**, os tumores EBV positivos, apresentaram menor imunoexpressão do contingente de células T_{FH} (Figura 10 - CXCR5+) em AP-HRS ($p=0,001$) e AD-HRS ($p=0,002$) quando comparados aos tumores EBV negativos.

O **PD-1** (Figura 11) apresentou elevada imunoexpressão no **tipo histológico CM** em relação aos demais subtipos histológicos, quando avaliado nas AP-HRS ($p=0,034$). Não houve diferença com significância estatística na expressão de PD-1 em relação ao *status* do EBV, assim como para as demais variáveis analisadas.

Figura 10 - Spot do TMA mostrando imunomarcagem do CXCR-5. (Aumento de 2000x)

Figura 11 - *Spot* do TMA mostrando imunomarcção para PD-1 (aumento 2000x)

4.4. Estudo dos linfócitos B (CD20) e macrófagos (CD163 e CD68) no microambiente do linfoma de Hodgkin clássico

Os resultados estão apresentados nas **Tabela 7** e serão descritos de forma resumida a seguir.

Na análise do CD20, em relação ao **sexo**, a proporção da área imunomarcada do CD20 foi maior no sexo feminino em relação ao masculino, em AP-HRS ($p=0,029$) e AD-HRS ($p=0,045$). Outro dado de interesse foi a comparação da proporção de CD20 e o **estádio**, sendo maior a expressão de CD20 nos **estádios** precoces do que nos estádios avançados, quando analisadas as AD-HRS ($p=0,004$), com expressiva diferença particularmente no estágio I. Em relação à distribuição dessas células, em todos os estádios houve predominância nas AD-HRS; entretanto, essa diferença mostrou tendência a ser mais acentuada nos pacientes com estádios precoce I e II, quando comparados aos pacientes nos estádios avançados III e IV ($p=0,054$). Quanto aos **sintomas B**, observou-se imunomarcção maior para CD20 nos pacientes sem sintomas B quando comparados aos pacientes com esses sintomas ($p=0,022$), quando analisadas as AP-HRS. Em relação ao parâmetro clínico de **refratariedade**, em pacientes não refratários ao tratamento convencional, a área imunomarcada para o CD20 foi maior ao se comparar com pacientes refratários, quando analisadas as AD-HRS ($p=0,026$).

Para o estudo dos macrófagos um dos marcadores utilizados foi o **CD163** e, ao comparar a expressão desse marcador com o **status EBV** dos tumores, observamos maior imunomarcção nas amostras EBV positivas em ambas, AP-HRS ($p<0,001$) e AD-HRS ($p=0,03$), quando comparados às amostras EBV negativas. Observou-se também distribuição diferente dessas células, com concentração maior nas AP-HRS nos tumores EBV+ ao contrário da menor concentração nas AP-HRS em relação das AD-HRS nos casos EBV negativos ($p=0,002$).

O CD163 ainda mostrou relevância estatística ao ser comparado com o **sexo** dos pacientes, e ficou evidente que os homens apresentavam maior positividade para o marcador do que as mulheres, tanto em AP-HRS ($p=0,006$)

como em AD-HRS ($p=0,007$). O **tipo histológico** da doença também apresentou resultados significantes, ao evidenciar maior imunomarcção para macrófago no subtipo celularidade mista do que nos subtipos ricos em linfócitos e esclerose nodular tanto em áreas próximas ($p=0,048$) como em áreas distantes ($p=0,027$) da célula HRS. Em relação ao **estádio** da doença ao diagnóstico, observou-se que os pacientes com estágio avançado apresentavam área imunomarcada maior quando comparados aos pacientes em estádios precoces tanto em AP-HRS ($p<0,001$) quanto em AD-HRS ($p<0,001$). Os demais parâmetros não mostraram significância estatística.

Para complementar a avaliação dos macrófagos, o **CD68** foi avaliado e apresentou relevância estatística em pacientes com diferentes **status EBV**, observando-se que neoplasias EBV positivas apresentavam maior área imunomarcada quando comparadas às neoplasias EBV negativas, em AP-HRS ($p=0,028$) e AD-HRS ($p=0,022$). Em relação ao **estádio clínico** ao diagnóstico, observou-se maior imunomarcção nos estádios avançados em relação aos estádios precoces, particularmente nas AP-HRS ($p=0,004$). Nos demais parâmetros avaliados com esse marcador não observamos significância estatística.

Tabela 4 - Associação entre as variáveis clínicas e as populações de células B (CD20) e macrófagos (CD163 e CD68)

			CD20 (Medianas)			CD163 (Medianas)				CD68 (Medianas)			
Variáveis Clínicas		N	Prox.	Dist.	Dif	N	Prox	Dist	Dif	N	Prox	Dist	Dif
Status EBV	Positivo	54	9,15%	10,29%	-0,00465	52	21,50%	22,40%	0,289	54	3,02%	2,68%	-0,0013
	Negativo	91	4,53%	5,74%	-0,0052	91	12,80%	13,60%	-0,0139	91	2,04%	2,02%	0,0009
Valor de p			0,093	0,115	0,767		<0,001	0,03	0,002		0,028	0,022	0,65
Sexo	F	81	8,52%	8,94%	-0,0057	80	13,30%	12,60%	-0,9	81	2,36%	2,02%	-0,0006
	M	65	3,74%	5,68%	-0,004	65	19,20%	22%	-0,8	65	2,30%	2,40%	-0,0011
Valor de p			0,027	0,045	0,592		0,006	0,007	0,386		0,726	0,173	0,403
Tipo Histológico	CM	17	12,38%	16,11%	-0,0251	16	25,40%	25,70%	-0,03	17	3,11%	2,47%	-0,0016
	RL	8	9,43%	7,63%	0,02395	8	17,30%	15%	-0,039	8	2,22%	2,45%	-0,0023
	EN	115	6,58%	6,73%	-0,0052	115	14,30%	14,50%	0,00925	115	2,34%	2,04%	0,0005
	Inconclusivo	6	1,83%	2,34%	-0,00085	6	20,10%	28,40%	-0,0649	6	1,78%	3,00%	-0,0074
Valor de p			0,127	0,153	0,077		0,048	0,027	0,21		0,706	0,574	0,185
Estádio	I-II	62	7,78%	11,28%	-0,01245	62	11,70%	10,30%	0,0058	62	1,94%	2,08%	-0,00145
I-II/III-IV	III-IV	82	5,21%	5,29%	-0,00395	81	23,40%	23,70%	0,00275	82	2,97%	2,57%	0
Valor de p			0,088	0,004	0,054		<0,001	<0,001	0,654		0,004	0,082	0,273

N: Número de pacientes; Prox: Próximo da célula HRS; Dist: Distante da célula HRS; Dif: Área próximo da célula HRS – área distante da célula HRS; F: Feminino; M: Masculino; CM: Celularidade Mista; RL: Rico em linfócitos; EM: Esclerose Nodular; NA: Não se aplica. Destaques em amarelo: valores de p significantes, em azul, valores de p com significância marginal.

continua....

...continuação

Tabela 4 - Associação entre as variáveis clínicas e as populações de células B (CD20) e macrófagos (CD163 e CD68)

			CD20 (Medianas)			CD163 (Medianas)				CD68 (Medianas)			
Variáveis clínicas		N	Prox.	Dist.	Dif.	N	Prox.	Dist.	Dif.	N	Prox.	Dist.	Dif.
Sintomas B	Presente	110	5,61%	5,81%	-0,0059	109	16%	18%	0,0078	110	2,62%	2,14%	-0,0006
	Ausente	35	12,83%	9,96%	-0,0031	35	13,90%	15,90%	0,0051	35	2,04%	2,18%	-0,0009
Valor de p			0,022	0,063	0,33		0,127	0,21	0,532		0,246	0,847	0,164
Refratariedade	Positivo	22	5,16%	4,17%	0,01135	21	16,20%	17,40%	-0,0159	22	2,39%	2,24%	-0,00045
	Negativo	111	6,66%	8,18%	-0,0072	111	14,80%	16,70%	0,01005	111	2,46%	2,13%	-0,0003
Valor de p			0,521	0,026	0,036		0,599	0,749	0,522		0,995	0,881	0,817
Recidiva	Ausente	111	6,66%	8,18%	-0,0072	111	14,80%	16,70%	0,01005	111	2,46%	2,13%	-0,0003
	Precoce	3	2,05%	3,03%	-0,0098	3	19,50%	20,90%	0,0186	3	0,89%	0,90%	-0,0036
	Tardia	9	9,65%	9,95%	-0,0031	9	6,30%	8,80%	0,0051	9	2,36%	2,47%	-0,0027
Valor de p			0,459	0,78	0,616		0,295	0,251	0,917		0,67	0,492	0,747
Óbito pela doença	Não Óbito	129	6,65%	8,02%	NA	129	14,40%	16,68%	NA	129	2,46%	2,33%	NA
	Óbito	17	4,53%	5,34%	NA	16	18,11%	17,33%	NA	16	1,39%	1,87%	NA
Valor de p			0,38	0,31	NA		0,134	0,729	NA		0,062	0,098	NA

N: Número de pacientes; Prox: Próximo da célula HRS; Dist: Distante da célula HRS; Dif: Área próximo da célula HRS – área distante da célula HRS; F: Feminino; M: Masculino; CM: Celularidade mista; RL: Rico em linfócitos; EM: Esclerose nodular; NA: Não se aplica. *teste de Spearman Rho. Destaques em amarelo: valores de p significantes.

4.5. Avaliação de outras populações de células inflamatórias (eosinófilos, neutrófilos e plasmócitos) e fibrose e sua associação com variáveis clínicas e *status* EBV no tumor

Os resultados estão apresentados na **Tabela 5** e serão descritos de forma resumida a seguir.

A realização deste estudo envolveu também a análise semiquantitativa de fibrose, eosinófilos, plasmócitos e neutrófilos à coloração da hematoxilina-eosina. Por ser uma avaliação semiquantitativa, com cada caso obtendo resultado denominado 0, 1, 2 ou 3, a análise estatística se deu pela avaliação do *Mean Rank* ou *ranking* médio em que, para saber quem teve a menor ou maior pontuação, divide-se o *rank* total (soma dos *ranks* do grupo) pelo tamanho da amostra de cada grupo, obtendo-se assim o *Mean Rank*. Em relação ao ***status* EBV** ficou evidente que neoplasias EBV positivas apresentavam menor grau de **fibrose** ($p<0,001$), menor contingente de **neutrófilos** ($p<0,001$) e de **eosinófilos** (**$p=0,027$**), quando comparados às neoplasias EBV negativas. Observou-se, ainda, a associação entre maiores graus de **fibrose** em **estádios** precoces quando comparados aos estádios avançados ($p=0,001$).

Nos demais parâmetros avaliados não observamos associações com significância estatística. Em relação aos plasmócitos e necrose não foi observada associação com nenhum dos parâmetros clínicos avaliados, assim como ao *status* do EBV no tumor.

Tabela 5 - Associação entre variáveis clínicas e status EBV, e células inflamatórias não linfóides (eosinófilos, plasmócitos e neutrófilos), fibrose e necrose – *mean rank*

Variáveis Clínicas (N)		Parâmetro avaliado* (<i>mean rank</i>)			
		Fibrose	Eosinófilos	Plasmócitos	Neutrófilos
Status EBV	Positivo (53)	47,5	63,2	72,4	58,8
	Negativo (90)	86,4	77,2	71,8	79,8
Valor de p		<0,001	0,027	0,928	0,001
Estádio I-II/III-IV	I-II (62)	84,3	70,7	70,0	72,4
	III-IV (80)	61,6	72,1	72,6	70,8
Valor de p		0,001	0,818	0,682	0,807
Sintomas B	Positivo (109)	69,2	73,3	72,7	74,4
	Negativo (34)	80,9	67,7	69,8	64,3
Valor de p		0,133	0,434	0,694	0,176
Refratariedade	Positivo (21)	66,0	65,6	53,2	67,7
	Negativo (110)	66,0	66,1	68,4	65,7
Valor de p		0,995	0,957	0,063	0,811
Recidiva	Ausente (110)	61,4	63,3	62,8	62,4
	Precoce (3)	67,3	61,2	45,3	65,7
	Tardia (9)	60,4	40,2	51,4	49,3
Valor de p		0,952	0,109	0,400	0,491
Óbito devido à doença	Não Óbito (127)	72,0	72,0	72,4	74,6
	Óbito (17)	76,6	75,9	73,6	56,6
Valor de p		0,655	0,686	0,899	0,067

4.6. Associação entre as células inflamatórias não linfoides e fibrose com as subpopulações de células linfoides e histiócitos em áreas próximas e distantes das células HRS

Os resultados estão apresentados nas **Tabela 6** e serão descritos de forma resumida a seguir.

Em relação às células B (CD20+) e células T totais (CD3), observou-se que quanto maior a quantidade de linfócitos B e T, menor a quantidade de eosinófilos e neutrófilos. Isso ocorreu de forma semelhante em AP-HRS e AD-HRS.

Em relação à fibrose, também se observou relação inversa com as células T totais (CD3+) e macrófagos (CD163 e CD68), e relação direta com as células T_{FH} (CXCR5+). Apenas as células T_{FH} (CXCR5+) apresentaram relação direta com o contingente de neutrófilos do microambiente. Todas essas associações ocorreram de forma semelhante em AP-HRS e AD-HRS.

Tabela 6 - Associação entre a fibrose e células inflamatórias não linfoides (eosinófilos, plasmócitos e neutrófilos) e as subpopulações celulares de linfócitos T (CD3), linfócitos B (CD20), Macrófagos (CD68 e CD163), linfócitos Tfh (CXCR5 e PD-1) e linfócitos Treg (FoxP3), em áreas próximas e distantes das células HRS.

	Eosinófilos		Plasmócitos		Neutrófilos		Fibrose	
	Valor de p	Spearman Rho	Valor de p	Spearman Rho	Valor de p	Spearman Rho	Valor de p	Spearman Rho
CD3 próximo	0,002	-0,258	0,176	0,113	<0,001	-0,298	0,005	-0,231
CD3 distante	0,001	-0,265	0,238	0,099	<0,001	-0,3	0,029	-0,182
CD20 próximo	0,006	-0,227	0,726	0,029	<0,001	-0,325	0,164	-0,117
CD20 distante	0,008	-0,22	0,292	0,088	0,001	-0,27	0,189	-0,11
CD163 próximo	0,223	0,103	0,369	0,076	0,499	0,057	0,002	-0,257
CD163 distante	0,098	0,14	0,16	0,118	0,277	0,092	0,002	-0,255
CD68 próximo	0,36	-0,077	0,831	0,018	0,932	-0,007	0,009	-0,218
CD68 distante	0,398	0,071	0,53	-0,053	0,142	-0,123	0,003	-0,249
CXCR5 próximo	0,095	0,141	0,861	-0,015	0,024	0,19	0,008	0,223
CXCR5 distante	0,115	0,132	0,673	-0,035	0,008	0,222	0,035	0,176
PD-1 próximo	0,619	-0,072	0,969	0,006	0,368	0,13	0,94	-0,011
PD-1 distante	0,221	-0,162	0,938	0,01	0,99	0,002	0,152	-0,189
Fox-p3 próximo	0,315	0,114	0,585	-0,062	0,956	0,006	0,48	-0,08
Fox-p3 distante	0,233	0,132	0,065	-0,202	0,188	0,145	0,139	0,163

Destaques em amarelo: valores de p significantes

5. DISCUSSÃO

5.1. Desenho do estudo

O microambiente tumoral (MAT) dos linfomas B contém um número variável de células do sistema imune, células do estroma, vasos sanguíneos e matriz extracelular. O estudo do MAT é bastante complexo e um dos motivos para isso é a multiplicidade de fatores envolvidos na sua formação. Os fatores determinantes da extensão, composição e arranjo espacial desse microambiente incluem as alterações genéticas que ocorreram nas células malignas, o grau de dependência dessas células de estímulos externos para a sobrevivência, proliferação e evasão do sistema imune, e a resposta inflamatória do hospedeiro. Nesse sentido, este estudo limitou-se a pacientes portadores de linfoma de Hodgkin clássico sem uma condição conhecida de imunossupressão. Conforme discutido, acreditamos que o EBV seja um ator relevante não só na patogênese da doença, quanto na interação das células neoplásicas com esse microambiente inflamatório que a circunda e em seu comportamento biológico. Dentre as múltiplas abordagens possíveis desse microambiente, optou-se por explorar a grande vantagem da observação *in situ*, relacionando expressão imunofenotípica, morfologia e topografia no estudo das subpopulações celulares do MAT, levando-se em consideração a proximidade com a célula neoplásica (HRS) e a associação da neoplasia ao EBV. Essa proposição se sustentou na hipótese de que a proximidade com as células neoplásicas, seria um fator de maior influência dos fatores expressos por essas células, assim como do próprio vírus EBV sobre as células do MAT. Já as áreas distantes das células neoplásicas poderiam apresentar características diversas, dependentes da interação entre as próprias células do sistema imune presentes na composição do MAT. Em função da íntima relação entre os diferentes tipos de células inflamatórias presentes no MAT, optou-se também por uma avaliação quantitativa abrangente desses tipos celulares, embora nosso interesse maior estivesse nos linfócitos T, em particular as células T_{FH}, e os macrófagos. Estudo semelhante utilizando técnica IHQ em 32 casos de LH (12 casos EBV+/20 casos EBV-) foi publicado recentemente por Duffield *et al.* (2017)¹⁷¹, porém sem a preocupação de avaliar as possíveis diferenças da composição do infiltrado em diferentes regiões relacionadas às células HRS. Um outro trabalho, por Wu *et al.*

(2016)¹⁷² procurou estudar a composição do microambiente de 46 tipos celulares específicos em 14 biópsias de LH (7 EBV+/7 EBV-) comparando a 14 amostras de linfonodos reacionais, utilizando a citometria de fluxo (FCM). Neste estudo eles identificaram a expressão de CD26 nas células T como um marcador de proximidade às células HRS (CD26-), sendo as células CD26+ localizadas em áreas distantes à célula neoplásica. Em nenhum dos 2 estudos foi avaliada a população de células T_{FH}. Estudos recentes utilizando imunofluorescência multiplex e citometria de massa de imagens permitindo a detecção simultânea de múltiplos epitopos no tecido, têm demonstrado distribuição espacial dinâmica e organizada dos subgrupos de células do sistema imune, de tal forma a definir uma complexa rede de interações celulares, que seguramente poderão contribuir para a definição das estratégias terapêuticas direcionadas ao controle do sistema imune no sentido de facilitar sua atividade anti-neoplásica¹⁷³⁻¹⁷⁵.

5.2. Características clínicas, subtipos histológicos e o status EBV da neoplasia

A proporção de casos de LH EBV+ nesta série de casos foi de cerca de 40%, sendo a **média de idade** dos pacientes EBV positivos (40,8 anos) praticamente uma década maior do que a dos pacientes EBV negativos (31,1 anos). Esses achados estão de acordo com os dados observados anteriormente em nosso meio por Campos *et al.*¹⁷⁶ e reproduzem as características de países desenvolvidos. Uma possível explicação para esse fato seria a perda na imunidade mediada por células T com o evoluir da idade, que permite que essas células B infectadas progridam para a transformação maligna¹³⁴. Da mesma forma como o observado na literatura, embora o **subtipo histológico** EN tenha sido o mais frequente em ambos os grupos de neoplasias, EBV+ e EBV-, dos 17 casos classificados como CM, 13 (76%) eram EBV+, corroborando a relação do EBV com esse subtipo histológico¹⁷⁷. Dos 114 casos classificados como EN, apenas 35 (31%) eram EBV positivos¹⁷⁸. O impacto prognóstico do EBV nos pacientes com LH é controverso, embora alguns estudos com base populacional

tenham demonstrado comportamento adverso em indivíduos mais velhos com LH-EBV+^{179, 180}.

Neste estudo encontramos relação entre a presença do EBV no tumor e o **estádio ao diagnóstico**, observando-se que, enquanto a distribuição dos casos EBV negativos entre os estádios iniciais e avançados era semelhante, no grupo de neoplasias EBV+ houve significativo predomínio de pacientes em estádios avançados. No mesmo sentido, a proporção de **recidiva** nos casos EBV negativos mostrou tendência a ser menor do que aquela observada nos casos EBV positivos. Além dos dados publicados em nosso meio por Campos *et al.*¹⁷⁶, e em uma extensa meta-análise publicada por Lee *et al.*¹⁸¹ em 2014, incluindo dados de diferentes continentes, observam-se dados bastante semelhantes a esta série de pacientes, incluindo a associação do EBV com estádios clínicos avançados, porém sem relação com presença de óbito devido à doença ou de eventos como refratariedade e/ou recidiva. Nesta série de pacientes, a presença do EBV não mostrou associação com a ocorrência de óbitos e de sintomas B.

5.3. Células do microambiente

O infiltrado inflamatório/imune do microambiente tumoral apresenta íntimas interações com as células HRS, as quais estimulam a produção de moléculas que suportam seu crescimento e sobrevivência (tais como CD30L ou CD40L nas células HRS), além de fatores imunossupressores de modo a construir um nicho imune privilegiado o qual, ao invés de exercer seu efeito anti-tumoral, promove a sua sobrevivência. As células HRS utilizam-se de diferentes mecanismos para escapar de ambas as respostas imunes inata e antígeno-dependente. Elas constroem esse santuário por secretar moléculas que inibem a resposta imune, assim como por recrutar e/ou induzir um fenótipo imunossupressor em células T e macrófagos. Entre esses mecanismos se destaca o do *checkpoint* imune PD-1/PD-L1 que, enquanto ativado, reprime as funções da célula T como proliferação, citotoxicidade e produção de citocinas¹⁸². O PD-L1, ligante do PD-1, expresso na superfície da célula HRS, e superexpresso em tumores EBV+¹⁸³, se liga ao PD-1 expresso na membrana

dos linfócitos citotóxicos e macrófagos para inativar o mecanismo de defesa imune por este mediador¹⁸².

Embora as células HRS nos LH-EBV+ e EBV- sejam morfológicamente e imunofenotipicamente indistinguíveis, assim como a aparente composição celular de seu microambiente, supõe-se que essas duas formas da doença utilizem de vias patogénicas próprias nesse mecanismo de sobrevivência, imunossupressão e influência sobre o microambiente inflamatório. Nesse sentido o EBV, e mais especificamente sua oncoproteína LMP1, contribui para um microambiente peculiar por estimular a produção de muitas quimiocinas e citocinas pelas células HRS.

A avaliação quantitativa *in situ* dos componentes do microambiente do LH como realizada neste estudo, se propôs a fornecer um panorama da composição dos atores desse microambiente na presença e ausência do EBV, e na proximidade e à distância das células HRS. Esperava-se que esse “mapeamento” pudesse contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos de evasão imune que operam no LH e, conseqüentemente, para intervenções terapêuticas racionais e eficazes.

Neste estudo observou-se que os pacientes com tumores EBV+ apresentaram microambiente com características próprias, e diferente dos LH EBV negativos.

Dados de literatura mostram que a maioria dos casos de LHC se caracterizam pela expressão de membros da família TNFR (*tumor necrosis factor receptor*) e seus ligantes, assim como por uma produção desbalanceada de citocinas e quimiocinas T_{H2}. A produção dessas citocinas desempenha importante papel na imunopatogênese do LH, atuando como fatores de crescimento autócrino, assim como responsáveis pela iniciação e manutenção do infiltrado reativo. Além disso, as citocinas produzidas pelas células do MAT podem contribuir para a sobrevivência e proliferação das células HRS¹⁸⁴.

Neste estudo demonstramos que o MAT dos tumores EBV+ caracteriza-se por um **perfil de linfócitos do microambiente** com maior contingente de

células CD8+ e menor contingente de células CD4+ (AP e AD), consonante com a menor proporção de células FOXP3+ (Treg) (AP) e menor proporção de células CXCR-5+ (T_{FH}) (AP e AD), em relação aos tumores EBV negativos. Em relação aos **macrófagos do microambiente**, os tumores EBV+ apresentaram maior contingente de macrófagos (AP e AD) em relação aos tumores EBV negativos. A quantidade de **neutrófilos, eosinófilos e fibrose** é menor nos tumores EBV positivos.

A presença do EBV pode alterar a expressão de citocinas e quimiocinas. De fato, o EBV favorece uma reação T_{H1} no MAT do LH-EBV+. A expressão da IL-12, a qual é responsável pela diferenciação celular T_{H1}, assim como quimiocinas que suportam essa resposta T_{H1} são expressas em maiores níveis nos LH-EBV+ do que nos casos de LH-EBV-¹⁸². De acordo com isso, é realmente esperado que as células T CD8+ sejam mais numerosas no TMA dos casos EBV+¹⁸⁴.

Na literatura, encontramos também maior número de células CD8+¹⁷², bem como maior expressão dos marcadores de macrófagos, CD68^{126, 185} e CD163^{126, 185} em LHC-EBV+, como encontramos neste estudo. É relevante assinalar que dados da literatura mostram maior número de células citotóxicas CD8+ não apenas no LHC relacionado ao EBV, mas também em pacientes com linfoma difuso de grandes células B-EBV positivos; as células CD8+ apresentavam exaustão imune e também não eram efetivas na resposta antitumoral¹⁸⁶. Um dos principais mecanismos de exaustão imune está ligado à expressão do PD-1, que ocorre normalmente em baixos níveis para manter a tolerância imunológica, já que este inibe a atividade da célula T ao emitir sinais secundários e funciona como um regulador negativo do sistema imune⁹⁸. Durante o estímulo imune crônico, o PD-1 permanece altamente expresso, o que pode levar a exaustão imune funcional. Esta pode ser parcialmente revertida com o bloqueio da interação PD-1/PD-L1, este último superexpresso nas células HRS, com as novas drogas liberadas no mercado (Nivolumab, Pembrolizumab, etc.)¹⁸⁷. Fato é, células CD8+ são mais numerosas no MAT de neoplasias EBV+ porém, essa tentativa de reação imune mediada por células parece ser ineficaz, pois há uma supressão local às células citotóxicas, que têm os antígenos do EBV

como alvo. Essa supressão pode estar relacionada também à presença de IL-10, uma citocina anti-inflamatória potente frequentemente produzida pelas células HRS em casos EBV+^{184, 188, 189}.

O aumento no número de macrófagos em MAT's de lesões EBV+ também é amplamente confirmado na literatura em crianças e adultos^{130, 185, 190}; em coerência com esta constatação, observa-se superexpressão de genes relacionados a macrófagos em LHC-EBV+(como o CDXL9, CXCL10, STAT1, Catepsinas e CD68)¹⁹¹. Esse achado foi confirmado por estudos de expressão gênica de amostras de tecido tumoral¹⁹¹. Embora em nosso estudo não tenha sido possível discriminar entre as subpopulações M1 e M2 através da co-expressão das moléculas de superfície com seus respectivos fatores de transcrição, observou-se predomínio de macrófagos com expressão de CD163 em relação aos macrófagos CD68, em AP e AD (vide Tabela 4). Sabe-se que, na dependência da disponibilidade de diferentes sinais do microambiente, os macrófagos podem sofrer ativação polarizada e, direcionamento a dois estados funcionais: os macrófagos M1 com fenótipo pró-inflamatório, com capacidade de promover resposta T_{H1} e destruir as células tumorais, e os macrófagos M2 com potente atividade promotora de tumor, funções regulatórias no reparo tecidual, e promoção de resposta T_{H2} ¹²¹. Polarização dominante dos macrófagos de tipo M1 no MAT do LHC-EBV+ está de acordo com a resposta do tipo T_{H1} observada, a qual é semelhante, embora menos proeminente, àquelas observadas nas doenças inflamatórias com predomínio de T_{H1} .

Esses resultados, juntamente com o aumento da quantidade de células CD8+, sugerem a possibilidade de que uma resposta imune antiviral pode ser acionada contra as proteínas virais nas células HRS, o que resultaria em maior recrutamento de células CD8+ e macrófagos¹²⁵. O desenvolvimento de técnicas de expressão gênica permitiu confirmar essa hipótese, demonstrando que os tumores EBV+ são caracterizados por uma robusta assinatura gênica envolvendo a imunidade inata e respostas antivirais¹⁹¹.

Além do aumento de células CD8+ e macrófagos em pacientes com positividade para o vírus EBV, observamos também a diminuição de células

CD4+, e de alguns de seus subtipos, como as células T_{REG} e T_{FH}, o que diverge de outros trabalhos na literatura que evidenciam o aumento de células CD4+ em pacientes com LHC^{192, 193}, sendo que Assis *et al.*¹⁹⁴ mostraram, em um trabalho brasileiro, aumento da quantidade de células T_{REG} no MAT do LHC-EBV+. Porém, temos estudos recentes, como enfatizado por Hurwitz *et al.*¹⁹⁵, mostrando que o microambiente do LH pode ter grande quantidade de células de resposta T_{H1}, como as CD8+ que, apesar de ter comportamento antitumoral, apresentam funcionamento comprometido nesse contexto¹⁹⁶.

A célula T_{FH} exerce um papel fundamental na hipermutação somática, na formação dos receptores de célula B e na seleção das células com BcR de maior afinidade pelo Ag⁸⁴. Logo, a degeneração neoplásica do linfócito B pode ter relação de dependência com a quantidade ou função da célula T_{FH}; de acordo com nossos resultados, os tumores EBV+ possuem menor quantidade de célula T_{FH} CXCR-5+ em seu microambiente. Isso resultaria em menor vigilância do complexo processo de remodelamento genético da célula B, permitido a sobrevivência e proliferação de uma célula defeituosa. Brauninger *et al.*¹ e Kupperts⁶ observaram, ao estudar o papel do EBV na patogênese do LHC, que quase a totalidade dos tumores com mutações que inviabilizam a formação de um BcR funcional (*crippling mutation*) eram EBV+, com papel importante do LMP2a que seria responsável por substituir o sinal de sobrevivência do BcR e permitir, desta forma, a perpetuação desta célula defeituosa. Como mencionado na revisão de literatura, o processo de hipermutação somática e seleção de linfócitos B com BcR competente é estreitamente dependente da célula T_{FH}, sugerindo possível relação entre a redução quantitativa e/ou funcional das mesmas com a patogênese do LHC relacionado ao EBV.

De qualquer forma, este é o primeiro estudo a analisar de forma sistemática as células T_{FH} em pacientes com LHC, sendo demonstrada uma relação entre o contingente de células T_{FH} e a presença do EBV no LHC. Outros marcadores utilizados para a caracterização da célula T_{FH} como BCL-6 e PD-1 são menos específicos na caracterização desse tipo celular, uma vez que são expressos em diversos outros tipos celulares. O receptor de quimiocina CXC tipo 5 (CXCR5) também conhecido como CD185 (*cluster* de diferenciação¹⁸³ ou

receptor de linfoma de Burkitt 1 (BLR1) é um receptor transmembrana acoplado à proteína G para a quimiocina CXCL13. Em humanos, a proteína CXCR5 é codificada pelo gene CXCR5. Essa quimiocina tem sido considerada como um marcador definidor das células T_{FH}¹⁹⁷. O anti-CXCR-5 nos pareceu um dos anticorpos mais úteis para a identificação da célula T_{FH}, já que sua expressão é essencial para a célula CD4+ se diferenciar em célula T_{FH} e, por isso, foi um dos anticorpos que selecionamos para a realização deste estudo. Recentemente, uma nova modalidade de terapia celular com células CAR-T (células T carregando um receptor antigênico quimérico), tem sido desenvolvida contra diferentes moléculas, inclusive contra o CXCR5), denominada de “CXCR5 CAR-T cells”, que em estudos *in vitro* tem demonstrado alta avidéz para o CXCR5 humano, podendo ser uma ferramenta promissora quando dirigida a esse alvo, tanto em células T_{FH} do MAT de várias neoplasias, como para as neoplasias que expressam essa molécula em suas células¹⁹⁸. Embora na rotina diagnóstica se utilize bastante o CXCL13 como marcador dessa célula, o anti-CXCR-5 tem sido amplamente utilizado nos projetos de pesquisa relacionados à célula T_{FH}, mostrando em nosso estudo resultados bastante satisfatórios, bem como no estudo de *Vinuesa et al.*⁹³ Esse anticorpo também faz parte do elenco de marcadores da célula T_{FH} pela OMS³.

A população de células T regulatórias (T_{REG}) também sofre influência do *status* EBV da neoplasia, evidente pela menor expressão de FoxP3 em tumores EBV+ em áreas próximas à célula HRS demonstrada no nosso estudo, consistente com a reposta predominantemente citotóxica relacionada ao vírus. Porém, este resultado não encontra correspondência na literatura, já que os trabalhos de *Pavlovic et al.*¹⁹⁹, *Morales et al.*²⁰⁰ e *Assis et al.*¹⁹⁴ chegaram a resultados opostos. As células T_{REG} também são importantes para o comportamento biológico da neoplasia, como observamos pela maior expressão deste tipo celular em pacientes livres de sintomas B, podendo estar relacionado à sua atividade anti-inflamatória, e em estádios mais baixos da doença (I-II) em áreas distantes da célula HRS; achado semelhante foi publicado por *Ouaguia et al.* ao mostrar que as células T_{REG} são associadas a bom prognóstico em LH e em outros tumores como carcinoma colorretal e carcinoma mamário negativo

para receptor de estrogênio²⁰¹. Dessa forma, os dados da literatura mostram achados conflitantes em relação ao papel das células T_{REG} nas neoplasias. A função da célula T_{REG} é suprimir a célula T autorreativa, reduzir a inflamação, induzir tolerância e modular a resposta imune do hospedeiro no contexto de estados autoimunes, alergias e cânceres induzidos por vírus. Em tumores, a célula T_{REG} exerce suas habilidades supressivas para inibir a resposta efetora citotóxica antiviral e antitumoral, o que deveria facilitar o crescimento da lesão neoplásica²⁰¹. Ao interpretar nossos achados relacionando esse tipo celular a fatores indicativos de melhor prognóstico, nos surpreendeu o paradoxo com a sua função inibitória da resposta imune das células T e nos leva a refletir sobre seu real papel em determinados tipos de neoplasia.

Neste estudo não encontramos relevância da população de células B-CD20+ com a presença do EBV no LHC. Não encontramos dados na literatura que pudéssemos comparar com este resultado. Não se conhece ainda o papel dessas células B no MAT do LHC, mas uma das hipóteses é a de que essas células competiriam com as células neoplásicas por sinais de crescimento, exercendo um efeito protetor contra a progressão do linfoma²⁰². Por outro lado, observou-se associação direta do contingente total de células T (CD3+) e, principalmente, de células B (CD20+) com parâmetros relacionados a bom prognóstico.

Em relação às células inflamatórias não linfoides, os tumores EBV positivos mostraram menor contingente de neutrófilos e eosinófilos do que os tumores EBV-. Este foi um achado contraditório com o achado de maior número de casos de LH-CM no grupo de LH-EBV+. Não encontramos na literatura estudos com objetivos ou resultados semelhantes; porém foi demonstrado que a maior quantidade de eosinófilos no tumor está relacionada com menor progressão da doença¹⁴⁵. Em tumores EBV- também se demonstrou maior quantidade de fibrose, podendo este achado estar relacionado ao maior contingente de casos de LHC-EN nesses pacientes, em relação aos EBV+, nos quais o LHC-CM tem maior representatividade.

Quando avaliado o grupo total de pacientes (EBV+ e EBV-), a fibrose foi maior em pacientes com estágio mais baixo. Entretanto, não há evidências conclusivas na literatura quanto ao papel da fibrose na progressão do LHC¹⁴⁸.

Neste estudo encontramos a associação da presença do EBV no LHC com estágio mais avançado (III-IV), da mesma forma como demonstrado por Lee *et al.*¹⁸¹; apesar de ter se mostrado relevante em diversos aspectos do LH, a infecção do EBV não influenciou a evolução dos pacientes em outros parâmetros clínicos avaliados neste trabalho, como também observado em outros trabalhos na literatura²⁰². Isso diverge do trabalho de Kanakry *et al.*²⁰⁴, que encontrou associação entre o status EBV e a evolução clínica dos casos. Porém, da mesma forma que discutido na metanálise de Lee *et al.*¹⁸¹ e em outros estudos, concluímos que o papel do EBV na evolução do LHC permanece indefinido.

Considerando agora o microambiente no grupo total de pacientes desta casuística (EBV+ e -), neste estudo observou-se maior expressão de marcadores de macrófagos (CD163/CD68) em AP e AD – nos pacientes com estágios avançados (III/IV). Várias relações semelhantes podem ser identificadas como o trabalho de Steidl e Gascoyne que mostrou menor sobrevida em pacientes com tumores associados a maior quantidade de macrófagos relacionados ao CD68¹²⁴ e o trabalho de Zaki *et al.*²⁰⁴ que também mostrou implicações prognósticas relacionadas ao marcador CD163 indicando pior prognóstico para pacientes com maior número deste componente celular inflamatório. Outras pesquisas não conseguiram comprovar relação entre macrófagos e fatores prognósticos ou associados ao comportamento biológico da doença em pacientes com LH^{127, 129}, como já apresentado mais detalhadamente na **Introdução** deste estudo.

Outro aspecto observado no nosso trabalho foi a maior expressão de CD20 em linfócitos do microambiente em pacientes com estágio mais baixo em AD, ausência de sintomas B em AP e ausência de refratariedade ao tratamento em AD; que nos leva à interpretação de que a maior presença de linfócitos B no microambiente sugere uma doença menos agressiva. Conclusão esta que encontra correspondência na literatura, já que foi demonstrado por Greaves *et al.*²⁰⁵ que a maior quantidade de CD20 confere maior sobrevida global e por

*Tudor et al.*²⁰⁶ melhor prognóstico em pacientes de LHC com microambiente com alta quantidade de células B CD20+.

Ao se comparar os diversos marcadores estudados com os parâmetros de avaliação do comportamento biológico da doença, constatamos também que, no parâmetro ocorrência ou não de óbito pela doença nos casos examinados, pacientes que não foram a óbito apresentaram maior quantidade de CD3 (AP e AD) e de CD4 (AD). Podemos inferir, com esta informação, que a maior influência da imunidade celular confere comportamento melhor para a doença; de fato, o trabalho de *Barros et al.* corrobora esta afirmação ao mostrar que os pacientes com parâmetros clínicos mais favoráveis tem infiltrado linfocítico T maior, inclusive de CD3 e CD4²⁰⁷.

Estudamos também a relação de algumas células do sistema imune inato, como eosinófilos e neutrófilos, em comparação com as células do sistema imune adaptativo, as células T (CD3+) e B (CD20+) e percebemos uma relação quantitativa inversa, em que quanto maior a quantidade de células do sistema imune inato, menor a quantidade de células do sistema imune adaptativo, e vice versa. Apesar de não se encontrar relação semelhante na literatura, foi observado por *Enblad et al.*²⁰⁸ que os dados sobre a influência dos eosinófilos no LH são conflitantes, com trabalhos mostrando melhor prognóstico enquanto outros mostram pior prognóstico com quantidade aumentada de eosinófilos. Enquanto isso, com relação aos neutrófilos, a relação observada foi a presença de leucocitose em pacientes com maior quantidade de neutrófilos no tumor. No nosso trabalho foi encontrada correspondência também entre neutrófilos e fibrose com a célula T_{FH} (CXCR-5+) que apresentaram uma relação quantitativa direta, relação que também não foi debatida na literatura previamente.

Outro aspecto estudado, foi a relação da fibrose com os diversos tipos celulares, sendo identificada associação contrária entre macrófagos (CD68+ e CD163+) e células T (CD3+) x fibrose indicando que, quanto mais fibrose menos macrófagos identificados no microambiente.

Com base nos resultados deste estudo, conclui-se que o microambiente do LH associado ao EBV se caracteriza por uma resposta

predominantemente histiocitária e T citotóxica, em detrimento da resposta T auxiliadora e seus componentes (células T_{REG} e T_{FH}). Essas informações podem ser relevantes no desenho de estratégias terapêuticas dirigidas ao MAT, considerando-se o *status* do EBV associado à doença.

5.4. Perspectivas futuras frente aos novos conhecimentos

Esse estudo tem como ponto forte a avaliação sistemática *in situ* das diferentes populações celulares, assim como sua distribuição do MAT no linfoma de Hodgkin, levando em consideração a participação do EBV na doença. A interação desse conjunto de células que compõe o MAT, assim como sua interação com as células neoplásicas é um fenômeno extremamente complexo e dinâmico. O interesse crescente em compreendê-lo tem resultado em enorme progresso no conhecimento da imunologia, trazendo como consequência a consolidação de novas opções terapêuticas no combate às células neoplásicas. Nesse sentido, ao longo da trajetória deste estudo, uma nova subpopulação de células T citotóxicas foliculares, com perfil imunofenotípico superponível às células T auxiliadoras (CD8^{CXCR5+} ICOS⁺) foi identificada em cerca de 7% dos casos de LHC, exibindo características de células disfuncionais, com citotoxicidade reduzida, baixos níveis de secreção de IFN, assim como estimulando a proliferação de células B e produção de Acs *in vitro*^{209, 210}. Fenotipicamente, a presença dessas células no LHC está relacionada à arquitetura nodular com centros germinativos hiperplásicos, somente parcialmente infiltrados pelo infiltrado neoplásico adjacente. Essas células parecem ter distribuição espacial circundando as células B. As evidências acima mostram a importância dos estudos com avaliação antigênica multiparamétrica e da relação espacial entre as diferentes populações celulares, através de recursos mais sofisticados como as técnicas de imunoistoquímica/imunofluorescência multiplex²¹¹.

Nesse sentido, com este estudo, nos propusemos a acrescentar uma pequena peça no intrincado quebra-cabeças que constitui o MAT.

6. CONCLUSÕES

Em relação à influência da presença do **EBV associado à neoplasia**, conclui-se que:

1. LH EBV+ apresentaram microambiente com características próprias, diferentes dos LH EBV negativos.
2. Os pacientes com tumores EBV+ apresentaram **perfil de linfócitos do microambiente** com maior contingente de células CD8+ e menor contingente de células CD4+ (AP e AD), menor proporção de células FoxP3+ (T_{REG}) (AP), e menor proporção de células CXCR5+ (T_{FH}) (AP e AD), em relação aos tumores EBV negativos.
3. Em relação aos **macrófagos do microambiente**, os tumores EBV+ apresentaram maior contingente de macrófagos (AP e AD) em relação aos tumores EBV negativos.
4. A quantidade de **neutrófilos, eosinófilos e fibrose** é maior nos tumores EBV negativos.
5. A **média de idade** dos casos EBV+ foi uma década maior do que a dos casos EBV negativos, provavelmente relacionado ao processo de imunosenescência fisiológica.
6. No **subtipo histológico** EN, 70% dos casos foram EBV negativos, enquanto no subtipo CM, 70% dos casos foram EBV positivos, confirmando a forte relação do EBV com o subtipo CM do LH.
7. A presença do EBV associou-se a **estádios avançados**, não mostrando associação com nenhum dos outros **parâmetros clínicos** relacionados ao comportamento biológico da doença.

Em relação à associação do **microambiente ao comportamento clínico** da lesão, conclui-se que:

8. A imunoexpressão de CD163/CD68 foi maior em pacientes com estágio mais alto (AP e AD).
9. A maior imunoexpressão de CD20 (linfócitos B) foi associada a parâmetros clínicos favoráveis como estágios mais baixos (AD), ausência de sintomas B (AP) e ausência de refratariedade ao tratamento (AD).
10. Pacientes que foram a óbito apresentaram menor quantidade de CD3 (AP e AD) e de CD4 (AD).
11. Graus maiores de fibrose associaram-se aos pacientes em estágio precoce.

Em relação à **associação entre os diversos componentes do microambiente** no LH conclui-se que:

12. As células T e B (sistema imune adaptativo) apresentaram relação quantitativa inversa aos eosinófilos e neutrófilos (sistema imune inato).
13. As células T_{FH} (avaliadas pelo CXCR5) apresentaram relação quantitativa direta com os neutrófilos e a fibrose.
14. As células T e os macrófagos apresentaram relação inversa com a fibrose.

7. ANEXOS

Anexo A

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Microambiente do linfoma de Hodgkin: Um estudo sobre as células T helper foliculares, macrófagos que compõem a neoplasia e resposta ao tratamento em paciente com diferentes status de infecção pelo EBV.

Pesquisador: Maria Claudia Nogueira Zerbini

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 57418116.1.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.629.293

Apresentação do Projeto:

O projeto tem apresentação sucinta mas clara e suficiente, discutindo as relações entre o EBV e o linfoma estudado.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo está bem enunciado: estudar o papel do microambiente do linfoma de Hodgkin em casos com EBV e avaliar impactos no prognóstico da doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto não traz riscos aos participantes por ser retrospectivo e basear-se em prontuários e material oriundo de biópsias anteriormente colhidas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa utilizará exame histopatológico e imunohistoquímica, não havendo dúvidas de exequibilidade.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A solicitação de dispensa de TCLE pode ser atendida pela comissão devido ao caráter retrospectivo da pesquisa e ao fato de que a confidencialidade está garantida, não havendo, além disso, nenhuma alteração quanto aos riscos.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 05403-010
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.edm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 1.029.263

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto pode ser aprovado pela comissão por não apresentar problemas de natureza ética.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	FE_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_600989.pdf	29/06/2016 11:35:30		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	AnuênciaHematologia.pdf	29/06/2016 11:35:01	Maria Claudia Nogueira Zerbini	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	16/05/2016 23:36:51	Maria Claudia Nogueira Zerbini	Aceito
Outros	Cadastroonline.pdf	16/05/2016 23:34:30	Maria Claudia Nogueira Zerbini	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DispensadeTCLE.docx	11/04/2016 12:16:39	Maria Claudia Nogueira Zerbini	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Cartasaceitacaoparticipacaoprojetoeorientacao.docx	15/12/2015 10:55:47	Ana Claudia Frota Machado de Melo Lopes	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	LaboratorioTMA.pdf	15/12/2015 10:43:34	Ana Claudia Frota Machado de Melo Lopes	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ConsentimentoValeria.pdf	15/12/2015 10:36:15	Ana Claudia Frota Machado de Melo Lopes	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 9º andar
 Bairro: Cerqueira César CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SÃO PAULO
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelacadm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 1.029.263

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Cartadeanuencia.pdf	15/12/2015 10:33:55	Ana Claudia Frota Machado de Melo Lopes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	14/12/2015 22:04:50	Ana Claudia Frota Machado de Melo Lopes	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 08 de Julho de 2016

Assinado por:
Joel Faintuch
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 9º andar
Bairro: Cerqueira César CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelacadm@hc.fm.usp.br

8. REFERÊNCIAS

1. Brauninger A, Schmitz R, Bechtel D, Renne C, Hausmann ML, Kuppers R. Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer*. 2006;118(8):1853-61.
2. Kanzler H, Kuppers R, Hansmann ML, Rajewsky K. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med*. 1996;184(4):1495-505.
3. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised Fourth Edition ed. 2017.
4. Harris NL. Hodgkin's disease: Classification and differential diagnosis. *Mod Pathol*. 1999;12(2):159-75.
5. Liu Y, Sattarzadeh A, Diepstra A, Visser L, van den Berg A. The microenvironment in classical Hodgkin lymphoma: An actively shaped and essential tumor component. *Semin Cancer Biol*. 2014;24:15-22.
6. Kuppers R. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(1):15-27.
7. Schwering I, Brauninger A, Klein U, Jungnickel B, Tinguely M, Diehl V, *et al*. Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2003;101(4):1505-12.
8. Theil J, Laumen H, Marafioti T, Hummel M, Lenz G, Wirth T, *et al*. Defective octamer-dependent transcription is responsible for silenced immunoglobulin transcription in Reed-Sternberg cells. *Blood*. 2001;97(10):3191-6.
9. Cossman J, Annunziata CM, Barash S, Staudt L, Dillon P, He WW, *et al*. Reed-Sternberg cell genome expression supports a B-cell lineage. *Blood*. 1999;94(2):411-6.
10. Tzankov A, Dirnhofer S. Pathobiology of classical Hodgkin lymphoma. *Pathobiology*. 2006;73(3):107-25.

11. Hinz M, Löser P, Mathas S, Krappmann D, Dörken B, Scheidereit C. Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood*. 2001;97(9):2798-807.
12. Horie R, Watanabe T, Morishita Y, Ito K, Ishida T, Kanegae Y, *et al.* Ligand-independent signaling by overexpressed CD30 drives NF-kappaB activation in Hodgkin-Reed-Sternberg cells. *Oncogene*. 2002;21(16):2493-503.
13. Jungnickel B, Staratschek-Jox A, Bräuninger A, Spieker T, Wolf J, Diehl V, *et al.* Clonal deleterious mutations in the IkappaBalpha gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma. *J Exp Med*. 2000;191(2):395-402.
14. Emmerich F, Theurich S, Hummel M, Haeffker A, Vry MS, Döhner K, *et al.* Inactivating I kappa B epsilon mutations in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *J Pathol*. 2003;201(3):413-20.
15. Küppers R. Molecular biology of Hodgkin's lymphoma. *Adv Cancer Res*. 2002;84:277-312.
16. Kashkar H, Seeger JM, Hombach A, Deggerich A, Yazdanpanah B, Utermöhlen O, *et al.* XIAP targeting sensitizes Hodgkin lymphoma cells for cytolytic T-cell attack. *Blood*. 2006;108(10):3434-40.
17. Akyurek N, Ren Y, Rassidakis GZ, Schlette EJ, Medeiros LJ. Expression of inhibitor of apoptosis proteins in B-cell non-Hodgkin and Hodgkin lymphomas. *Cancer*. 2006;107(8):1844-51.
18. Chabay P, Pesce P, De Matteo E, Lombardi MG, Rey G, Preciado MV. No Influence of bcl-2, p53, and p21waf1 protein expression on the outcome of pediatric Hodgkin lymphomas. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2006;28(9):552-8.
19. Bai M, Papoudou-Bai A, Horianopoulos N, Grepí C, Agnantis NJ, Kanavaros P. Expression of bcl2 family proteins and active caspase 3 in classical Hodgkin's lymphomas. *Hum Pathol*. 2007;38(1):103-13.

-
20. Dutton A, Young LS, Murray PG. The role of cellular FLICE inhibitory protein (c-FLIP) in the pathogenesis and treatment of cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2006;10(1):27-35.
 21. Kim LH, Eow GI, Peh SC, Poppema S. The role of CD30, CD40 and CD95 in the regulation of proliferation and apoptosis in classical Hodgkin's lymphoma. *Pathology*. 2003;35(5):428-35.
 22. Dotti G, Savoldo B, Pule M, Straathof KC, Biagi E, Yvon E, *et al*. Human cytotoxic T lymphocytes with reduced sensitivity to Fas-induced apoptosis. *Blood*. 2005;105(12):4677-84.
 23. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(1):22-33.
 24. Basso K, Dalla-Favera R. BCL6: master regulator of the germinal center reaction and key oncogene in B cell lymphomagenesis. *Adv Immunol*. 2010;105:193-210.
 25. Cattoretti G, Chang CC, Cechova K, Zhang J, Ye BH, Falini B, *et al*. BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood*. 1995;86(1):45-53.
 26. Onizuka T, Moriyama M, Yamochi T, Kuroda T, Kazama A, Kanazawa N, *et al*. BCL-6 gene product, a 92- to 98-kD nuclear phosphoprotein, is highly expressed in germinal center B cells and their neoplastic counterparts. *Blood*. 1995;86(1):28-37.
 27. Ye BH, Cattoretti G, Shen Q, Zhang J, Hawe N, de Waard R, *et al*. The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet*. 1997;16(2):161-70.
 28. Dent AL, Shaffer AL, Yu X, Allman D, Staudt LM. Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science*. 1997;276(5312):589-92.

-
29. Ci W, Polo JM, Cerchietti L, Shaknovich R, Wang L, Yang SN, *et al.* The BCL6 transcriptional program features repression of multiple oncogenes in primary B cells and is deregulated in DLBCL. *Blood*. 2009;113(22):5536-48.
 30. Saito M, Novak U, Piovan E, Basso K, Sumazin P, Schneider C, *et al.* BCL6 suppression of BCL2 via Miz1 and its disruption in diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(27):11294-9.
 31. Phan RT, Dalla-Favera R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature*. 2004;432(7017):635-9.
 32. Ranuncolo SM, Polo JM, Dierov J, Singer M, Kuo T, Greally J, *et al.* Bcl-6 mediates the germinal center B cell phenotype and lymphomagenesis through transcriptional repression of the DNA-damage sensor ATR. *Nat Immunol*. 2007;8(7):705-14.
 33. Shaffer AL, Yu X, He Y, Boldrick J, Chan EP, Staudt LM. BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity*. 2000;13(2):199-212.
 34. Basso K, Saito M, Sumazin P, Margolin AA, Wang K, Lim WK, *et al.* Integrated biochemical and computational approach identifies BCL6 direct target genes controlling multiple pathways in normal germinal center B cells. *Blood*. 2010;115(5):975-84.
 35. Kadin ME, Glatstein E, Dorfman RF. Clinicopathologic studies of 117 untreated patients subjected to laparotomy for the staging of Hodgkin's disease. *Cancer*. 1971;27(6):1277-94.
 36. Kaplan H. Hodgkin's Disease. Cambridge, MA: Harvard University Press; 1972.
 37. Ioachim HL. New vistas in Hodgkin's disease. *Pathol Annu*. 1975;10:419-59.
 38. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, *et al.* Recommendations for initial evaluation, staging, and response

- assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol*. 2014;32(27):3059-68.
39. Levy R, Kaplan HS. Impaired lymphocyte function in untreated Hodgkin's disease. *N Engl J Med*. 1974;290(4):181-6.
40. Lukes RJ, Butler JJ. The pathology and nomenclature of Hodgkin's disease. *Cancer Res*. 1966;26(6):1063-83.
41. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, *et al*. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994;84(5):1361-92.
42. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. Cancer Stat Facts: Hodgkin Lymphoma.
43. Mani H, Jaffe ES. Hodgkin lymphoma: an update on its biology with new insights into classification. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2009;9(3):206-16.
44. Armstrong AA, Alexander FE, Cartwright R, Angus B, Krajewski AS, Wright DH, *et al*. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: further evidence for the three disease hypothesis. *Leukemia*. 1998;12(8):1272-6.
45. Vassallo J, Paes RP, Soares FA, Menezes Y, Aldred V, Ribeiro KdCB, *et al*. Histological classification of 1,025 cases of Hodgkin's lymphoma from the State of São Paulo, Brazil. *Sao Paulo Med J*. 2005;123(3):134-6.
46. Monteiro TAF, Arnaud MVC, Monteiro JLF, Costa MRMd, Vasconcelos PFdC. Linfoma de Hodgkin: aspectos epidemiológicos e subtipos diagnosticados em um hospital de referência no Estado do Pará, Brasil. *Revista Pan-Amaz Saúde* 2016;7(1):27-31.
47. Cozen W, Katz J, Mack TM. Risk patterns of Hodgkin's disease in Los Angeles vary by cell type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1992;1(4):261-8.

48. Biggar RJ, Jaffe ES, Goedert JJ, Chaturvedi A, Pfeiffer R, Engels EA. Hodgkin lymphoma and immunodeficiency in persons with HIV/AIDS. *Blood*. 2006;108(12):3786-91.
49. Shimabukuro-Vornhagen A, Haverkamp H, Engert A, Balleisen L, Majunke P, Heil G, *et al.* Lymphocyte-rich classical Hodgkin's lymphoma: clinical presentation and treatment outcome in 100 patients treated within German Hodgkin's Study Group trials. *J Clin Oncol*. 2005;23(24):5739-45.
50. Desforges JF, Rutherford CJ, Piro A. Hodgkin's disease. *N Engl J Med*. 1979;301(22):1212-22.
- 51 Hjalgrim H, Askling J, Rostgaard K, Hamilton-Dutoit S, Frisch M, Zhang JS, *et al.* Characteristics of Hodgkin's lymphoma after infectious mononucleosis. *N Engl J Med*. 2003;349(14):1324-32.
52. Kvåle G, Høiby EA, Pedersen E. Hodgkin's disease in patients with previous infectious mononucleosis. *Int J Cancer*. 1979;23(5):593-7.
53. Alexander FE, Daniel CP, Armstrong AA, Clark DA, Onions DE, Cartwright RA, *et al.* Case clustering, Epstein-Barr virus Reed-Sternberg cell status and herpes virus serology in Hodgkin's disease: results of a case-control study. *Eur J Cancer*. 1995;31A(9):1479-86.
54. Benharroch D, Shemer-Avni Y, Myint YY, Levy A, Mejirovsky E, Suprun I, *et al.* Measles virus: evidence of an association with Hodgkin's disease. *Br J Cancer*. 2004;91(3):572-9.
55. Hodgkin Lymphoma.
<https://www.mdanderson.org/content/dam/mdanderson/documents/for-physicians/algorithms/cancer-treatment/ca-treatment-lymphoma-hodgkins-web-algorithm.pdf>. [Available from: 2021]
56. Hasenclever D. The disappearance of prognostic factors in Hodgkin's disease. *Ann Oncol*. 2002;13(Suppl 1):75-8.

-
57. Josting A, Franklin J, May M, Koch P, Beykirch MK, Heinz J, *et al.* New prognostic score based on treatment outcome of patients with relapsed Hodgkin's lymphoma registered in the database of the German Hodgkin's lymphoma study group. *J Clin Oncol.* 2002;20(1):221-30.
 58. Feltl D, Víttek P, Zámecník J. Hodgkin's lymphoma in the elderly: the results of 10 years of follow-up. *Leuk Lymphoma.* 2006;47(8):1518-22.
 59. Allemani C, Sant M, De Angelis R, Marcos-Gragera R, Coebergh JW, Group EW. Hodgkin disease survival in Europe and the U.S.: prognostic significance of morphologic groups. *Cancer.* 2006;107(2):352-60.
 60. Poppema S, Bhan AK, Reinherz EL, Posner MR, Schlossman SF. In situ immunologic characterization of cellular constituents in lymph nodes and spleens involved by Hodgkin's disease. *Blood.* 1982;59(2):226-32.
 61. Ma Y, Visser L, Blokzijl T, Harms G, Atayar C, Poppema S, *et al.* The CD4+CD26- T-cell population in classical Hodgkin's lymphoma displays a distinctive regulatory T-cell profile. *Lab Invest.* 2008;88(5):482-90.
 62. Poppema S, Lai R, Visser L, Yan XJ. CD45 (leucocyte common antigen) expression in T and B lymphocyte subsets. *Leuk Lymphoma.* 1996;20(3-4):217-22.
 63. Aldinucci D, Gloghini A, Pinto A, De Filippi R, Carbone A. The classical Hodgkin's lymphoma microenvironment and its role in promoting tumour growth and immune escape. *J Pathol.* 2010;221(3):248-63.
 64. Skinnider BF, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2002;99(12):4283-97.
 65. Teruya-Feldstein J, Tosato G, Jaffe ES. The role of chemokines in Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma.* 2000;38(3-4):363-71.
 66. Christian Steidl JMC, and Randy D. Gascoyne. Molecular Pathogenesis of Hodgkin's Lymphoma: Increasing Evidence of the Importance of the Microenvironment. *J Clin Oncol.* 2011;29(14):1812-26.

-
67. Khan G. Epstein-Barr virus, cytokines, and inflammation: a cocktail for the pathogenesis of Hodgkin's lymphoma? *Exp Hematol.* 2006;34(4):399-406.
 68. Fischer M, Juremalm M, Olsson N, Backlin C, Sundström C, Nilsson K, *et al.* Expression of CCL5/RANTES by Hodgkin and Reed-Sternberg cells and its possible role in the recruitment of mast cells into lymphomatous tissue. *Int J Cancer.* 2003;107(2):197-201.
 69. Ohshima K, Tutiya T, Yamaguchi T, Suzuki K, Suzumiya J, Kawasaki C, *et al.* Infiltration of Th1 and Th2 lymphocytes around Hodgkin and Reed-Sternberg (H&RS) cells in Hodgkin disease: Relation with expression of CXC and CC chemokines on H&RS cells. *Int J Cancer.* 2002;98(4):567-72.
 70. Gerdes J, Kretschmer C, Zahn G, Ernst M, Jones DB, Flad HD. Immunoenzymatic assessment of interferon-gamma in Hodgkin and Sternberg-Reed cells. *Cytokine.* 1990;2(4):307-10.
 71. Khnykin D, Troen G, Berner JM, Delabie J. The expression of fibroblast growth factors and their receptors in Hodgkin's lymphoma. *J Pathol.* 2006;208(3):431-8.
 72. Jundt F, Anagnostopoulos I, Bommert K, Emmerich F, Müller G, Foss HD, *et al.* Hodgkin/Reed-Sternberg cells induce fibroblasts to secrete eotaxin, a potent chemoattractant for T cells and eosinophils. *Blood.* 1999;94(6):2065-71.
 73. Samoszuk M, Nansen L. Detection of interleukin-5 messenger RNA in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease with eosinophilia. *Blood.* 1990;75(1):13-6.
 74. Hanamoto H, Nakayama T, Miyazato H, Takegawa S, Hieshima K, Tatsumi Y, *et al.* Expression of CCL28 by Reed-Sternberg cells defines a major subtype of classical Hodgkin's disease with frequent infiltration of eosinophils and/or plasma cells. *Am J Pathol.* 2004;164(3):997-1006.

-
75. Joos S, Menz CK, Wrobel G, Siebert R, Gesk S, Ohl S, *et al.* Classical Hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2. *Blood*. 2002;99(4):1381-7.
 76. Chui DT, Hammond D, Baird M, Shield L, Jackson R, Jarrett RF. Classical Hodgkin lymphoma is associated with frequent gains of 17q. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003;38(2):126-36.
 77. Steidl C, Telenius A, Shah SP, Farinha P, Barclay L, Boyle M, *et al.* Genome-wide copy number analysis of Hodgkin Reed-Sternberg cells identifies recurrent imbalances with correlations to treatment outcome. *Blood*. 2010;116(3):418-27.
 78. Mathas S, Jöhrens K, Joos S, Lietz A, Hummel F, Janz M, *et al.* Elevated NF-kappaB p50 complex formation and Bcl-3 expression in classical Hodgkin, anaplastic large-cell, and other peripheral T-cell lymphomas. *Blood*. 2005;106(13):4287-93.
 79. Martin-Subero JI, Wlodarska I, Bastard C, Picquenot JM, Höppner J, Giefing M, *et al.* Chromosomal rearrangements involving the BCL3 locus are recurrent in classical Hodgkin and peripheral T-cell lymphoma. *Blood*. 2006;108(1):401-2; author reply 2-3.
 80. Leonard WJ. Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction. *Int J Hematol*. 2001;73(3):271-7.
 81. Karin M, Gallagher E. TNFR signaling: ubiquitin-conjugated TRAF6 signals control stop-and-go for MAPK signaling complexes. *Immunol Rev*. 2009;228(1):225-40.
 82. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002;298(5600):1912-34.

-
83. Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, Barnett B, *et al.* Bcl6 and Blimp-1 Are Reciprocal and Antagonistic Regulators of T Follicular Helper Cell Differentiation. *Science*. 2009;325(5943):1006-10.
 84. Crotty S. T Follicular Helper Cell Differentiation, Function, and Roles in Disease. *Immunity*. 2014;41(4):529-42.
 85. Nurieva RI, Chung Y, Martinez GJ, Yang XO, Tanaka S, Matskevitch TD, *et al.* Bcl6 Mediates the Development of T Follicular Helper Cells. *Science*. 2009;325(5943):1001-5.
 86. Choi YS, Kageyama R, Eto D, Escobar TC, Johnston RJ, Monticelli L, *et al.* ICOS Receptor Instructs T Follicular Helper Cell versus Effector Cell Differentiation via Induction of the Transcriptional Repressor Bcl6. *Immunity*. 2011;34(6):932-46.
 87. Choi YS, Eto D, Yang JA, Lao C, Crotty S. Cutting edge: STAT1 is required for IL-6-mediated Bcl6 induction for early follicular helper cell differentiation. *J Immunol*. 2013;190(7):3049-53.
 88. Choi YS, Yang JA, Yusuf I, Johnston RJ, Greenbaum J, Peters B, *et al.* Bcl6 expressing follicular helper CD4 T cells are fate committed early and have the capacity to form memory. *J Immunol*. 2013;190(8):4014-26.
 89. Johnston RJ, Choi YS, Diamond JA, Yang JA, Crotty S. STAT5 is a potent negative regulator of TFH cell differentiation. *J Exp Med*. 2012;209(2):243-50.
 90. Crotty S. Follicular Helper CD4 T Cells (T-FH). *Annu Rev Immunol*. 2011;29:621-63.
 91. Xu HP, Li XY, Liu D, Li JF, Zhang X, Chen X, *et al.* Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility. *Nature*. 2013;496(7446):523-+.

92. Shulman Z, Gitlin AD, Targ S, Jankovic M, Pasqual G, Nussenzweig MC, *et al.* T follicular helper cell dynamics in germinal centers. *Science*. 2013;341(6146):673-7.
93. Vinuesa CG, Linterman MA, Yu D, MacLennan IC. Follicular Helper T Cells. *Annu Rev Immunol*. 2016;34:335-68.
94. Ansel KM, McHeyzer-Williams LJ, Ngo VN, McHeyzer-Williams MG, Cyster JG. In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *J Exp Med*. 1999;190(8):1123-34.
95. Gunn MD, Ngo VN, Ansel KM, Ekland EH, Cyster JG, Williams LT. A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature*. 1998;391(6669):799-803.
96. Rasheed AU, Rahn HP, Sallusto F, Lipp M, Müller G. Follicular B helper T cell activity is confined to CXCR5(hi)ICOS(hi) CD4 T cells and is independent of CD57 expression. *Eur J Immunol*. 2006;36(7):1892-903.
97. Breitfeld D, Ohi L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, *et al.* Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med*. 2000;192(11):1545-52.
98. Probst HC, McCoy K, Okazaki T, Honjo T, van den Broek M. Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol*. 2005;6(3):280-6.
99. Muenst S, Hoeller S, Dirnhofer S, Tzankov A. Increased programmed death-1+ tumor-infiltrating lymphocytes in classical Hodgkin lymphoma substantiate reduced overall survival. *Human Pathol*. 2009;40(12):1715-22.
100. Dorfman DM, Brown JA, Shahsafaei A, Freeman GJ. Programmed death-1 (PD-1) is a marker of germinal center-associated T cells and

- angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2006;30(7):802-10.
101. Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:429-57. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075032.
102. Liu YJ, Joshua DE, Williams GT, Smith CA, Gordon J, MacLennan IC. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature*. 1989;342(6252):929-31.
103. Schwickert TA, Victora GD, Fooksman DR, Kamphorst AO, Mugnier MR, Gitlin AD, *et al*. A dynamic T cell-limited checkpoint regulates affinity-dependent B cell entry into the germinal center. *J Exp Med*. 2011;208(6):1243-52.
104. Victora GD, Schwickert TA, Fooksman DR, Kamphorst AO, Meyer-Hermann M, Dustin ML, *et al*. Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell*. 2010;143(4):592-605.
105. Khalil AM, Cambier JC, Shlomchik MJ. B cell receptor signal transduction in the GC is short-circuited by high phosphatase activity. *Science*. 2012;336(6085):1178-81.
106. Gitlin AD, Shulman Z, Nussenzweig MC. Clonal selection in the germinal centre by regulated proliferation and hypermutation. *Nature*. 2014;509(7502):637-+.
107. Fahey LM, Wilson EB, Elsaesser H, Fistonich CD, McGavern DB, Brooks DG. Viral persistence redirects CD4 T cell differentiation toward T follicular helper cells. *J Exp Med*. 2011;208(5):987-99.
108. Locci M, Havenar-Daughton C, Landais E, Wu J, Kroenke MA, Arlehamn CL, *et al*. Human Circulating PD-1(+)CXCR3(-)CXCR5(+) Memory Tfh Cells Are Highly Functional and Correlate with Broadly Neutralizing HIV Antibody Responses. *Immunity*. 2013;39(4):758-69.

-
109. Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, Equeter C, Libin M, de Wind A, *et al.* CD4⁺ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest.* 2013;123(7):2873-92.
110. Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Waldner M, Obenauf AC, *et al.* Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity.* 2013;39(4):782-95.
111. Zettl A, Lee SS, Rudiger T, Starostik P, Marino M, Kirchner T, *et al.* Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorders in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma, unspecified. *Am J Clin Pathol.* 2002;117(3):368-79.
112. Quintanilla-Martinez L, Fend F, Moguel LR, Spilove L, Beaty MW, Kingma DW, *et al.* Peripheral T-cell lymphoma with Reed-Sternberg-like cells of B-cell phenotype and genotype associated with Epstein-Barr virus infection. *Am J Surg Pathol.* 1999;23(10):1233-40.
113. Xu Y, McKenna RW, Hoang MP, Collins RH, Kroft SH. Composite angioimmunoblastic T-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma: a case report and review of the literature. *Am J Clin Pathol.* 2002;118(6):848-54.
114. Nicolae A, Pittaluga S, Venkataraman G, Vijnovich-Baron A, Xi L, Raffeld M, *et al.* Peripheral T-cell Lymphomas of Follicular T-Helper Cell Derivation With Hodgkin/Reed-Sternberg Cells of B-cell Lineage Both EBV-positive and EBV-negative Variants Exist. *Am J Surg Pathol.* 2013;37(6):816-26.
115. Mills CD, Ley K. M1 and M2 macrophages: the chicken and the egg of immunity. *J Innate Immun.* 2014;6(6):716-26.
116. Mosmann TR, Coffman RL. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol.* 1989;46:111-47.

-
117. Scott P, Pearce E, Cheever AW, Coffman RL, Sher A. Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunol Rev.* 1989;112:161-82.
118. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 2010;32(5):593-604.
119. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* 2000;164(12):6166-73.
120. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature.* 2007;449(7161):419-26.
121. Mills CD. Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages. *Front Immunol.* 2015;6:212.
122. Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol.* 2010;22(2):231-7.
123. Porta C, Riboldi E, Sica A. Mechanisms linking pathogens-associated inflammation and cancer. *Cancer Lett.* 2011;305(2):250-62.
124. Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, *et al.* Tumor-Associated Macrophages and Survival in Classic Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med.* 2010;362(10):875-85.
125. Barros MHM, Hassan R, Niedobitek G. Tumor-Associated Macrophages in Pediatric Classical Hodgkin Lymphoma: Association with Epstein-Barr Virus, Lymphocyte Subsets, and Prognostic Impact. *Clin Cancer Res.* 2012;18(14):3762-71.
126. Tan KL, Scott DW, Hong F, Kahl BS, Fisher RI, Bartlett NL, *et al.* Tumor-associated macrophages predict inferior outcomes in classic Hodgkin lymphoma: a correlative study from the E2496 Intergroup trial. *Blood.* 2012;120(16):3280-7.

-
127. Sanchez-Espiridion B, Martin-Moreno AM, Montalban C, Medeiros LJ, Vega F, Younes A, *et al.* Immunohistochemical markers for tumor associated macrophages and survival in advanced classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2012;97(7):1080-4.
 128. Agur A, Amir G, Paltiel O, Klein M, Dann EJ, Goldschmidt H, *et al.* CD68 staining correlates with the size of residual mass but not with survival in classical Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(5):1315-9.
 129. Kayal S, Mathur S, Karak AK, Kumar L, Sharma A, Bakhshi S, *et al.* CD68 tumor-associated macrophage marker is not prognostic of clinical outcome in classical Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2014;55(5):1031-7.
 130. Barros MHM, Hauck F, Dreyer JH, Kempkes B, Niedobitek G. Macrophage Polarisation: an Immunohistochemical Approach for Identifying M1 and M2 Macrophages. *Plos One*. 2013;8(11):e80908.
 131. Kunisch E, Fuhrmann R, Roth A, Winter R, Lungershausen W, Kinne RW. Macrophage specificity of three anti-CD68 monoclonal antibodies (KP1, EBM11, and PGM1) widely used for immunohistochemistry and flow cytometry. *Ann Rheum Dis*. 2004;63(7):774-84.
 132. Lau SK, Chu PG, Weiss LM. CD163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples. *Am J Clin Pathol*. 2004;122(5):794-801.
 133. Leopold Wager CM, Hole CR, Wozniak KL, Olszewski MA, Mueller M, Wormley FL. STAT1 signaling within macrophages is required for antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 2015;83(12):4513-27.
 134. Abul K. Abbas AHL, Shiv Pilai. Cellular and Molecular Immunology. 6. ed. Saunders Elsevier; 2007.
 135. Nelson RW, Beisang D, Tubo NJ, Dileepan T, Wiesner DL, Nielsen K, *et al.* T cell receptor cross-reactivity between similar foreign and self peptides

- influences naive cell population size and autoimmunity. *Immunity*. 2015;42(1):95-107.
136. Sage PT, Sharpe AH. T follicular regulatory cells in the regulation of B cell responses. *Trends Immunol*. 2015;36(7):410-8.
137. Monte K, Wilson C, Shih FF. Increased number and function of FoxP3 regulatory T cells during experimental arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008;58(12):3730-41.
138. Lyssuk EY, Torgashina AV, Soloviev SK, Nasonov EL, Bykovskaia SN. Reduced number and function of CD4+CD25highFoxP3+ regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Adv Exp Med Biol*. 2007;601:113-9.
139. Bonelli M, Savitskaya A, von Dalwigk K, Steiner CW, Aletaha D, Smolen JS, *et al*. Quantitative and qualitative deficiencies of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Int Immunol*. 2008;20(7):861-8.
140. Lin SC, Chen KH, Lin CH, Kuo CC, Ling QD, Chan CH. The quantitative analysis of peripheral blood FOXP3-expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. *Eur J Clin Invest*. 2007;37(12):987-96.
141. Tao JH, Cheng M, Tang JP, Liu Q, Pan F, Li XP. Foxp3, Regulatory T cell, and autoimmune diseases. *Inflammation*. 2017;40(1):328-39.
142. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(4):295-307.
143. Shevach EM. Fatal attraction: tumors beckon regulatory T cells. *Nat Med*. 2004;10(9):900-1.
144. Gholiha AR, Hollander P, Hedstrom G, Sundstrom C, Molin D, Smedby KE, *et al*. High tumour plasma cell infiltration reflects an important

- microenvironmental component in classic Hodgkin lymphoma linked to presence of B-symptoms. *Br J Haematol*. 2019;184(2):192-201.
145. Pinto A, Aldinucci D, Gloghini A, Zagonel V, Degan M, Perin V, *et al*. The role of eosinophils in the pathobiology of Hodgkin's disease. *Ann Oncol*. 1997;8(Suppl 2):89-96.
 146. Hude I, Sasse S, Bröckelmann PJ, von Tresckow B, Momotow J, Engert A, *et al*. Leucocyte and eosinophil counts predict progression-free survival in relapsed or refractory classical Hodgkin Lymphoma patients treated with PD1 inhibition. *Br J Haematol*. 2018;181(6):837-40.
 147. Keresztes K, Szollosi Z, Simon Z, Tarkanyi I, Nemes Z, Illes A. Retrospective analysis of the prognostic role of tissue eosinophil and mast cells in Hodgkin's lymphoma. *Pathol Oncol Res*. 2007;13(3):237-42.
 148. Hess JL, Bodis S, Pinkus G, Silver B, Mauch P. Histopathologic grading of nodular sclerosis Hodgkin's disease. Lack of prognostic significance in 254 surgically staged patients. *Cancer*. 1994;74(2):708-14.
 149. Rickinson AB KE, Knipe DM, Howley PM. Epstein-Barr virus. *In: Fields Virology*. Philadelphia, editor: Lippincott-Raven; 2001. 2001:575-627 p.
 150. Bräuninger A, Spieker T, Mottok A, Baur AS, Küppers R, Hansmann ML. Epstein-Barr virus (EBV)-positive lymphoproliferations in post-transplant patients show immunoglobulin V gene mutation patterns suggesting interference of EBV with normal B cell differentiation processes. *Eur J Immunol*. 2003;33(6):1593-602.
 151. Küppers R. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(10):801-12.
 152. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, Sklar J. Detection of Epstein-baar viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkins-disease. *N Engl J Med*. 1989;320(8):502-6.

-
153. Masih A, Weisenburger D, Duggan M, Armitage J, Bashir R, Mitchell D, *et al.* Epstein-Barr viral genome in lymph nodes from patients with Hodgkin's disease may not be specific to Reed-Sternberg cells. *Am J Pathol.* 1991;139(1):37-43.
 154. Thorley-Lawson DA, Gross A. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med.* 2004;350(13):1328-37.
 155. Asano N, Yamamoto K, Tamaru J, Oyama T, Ishida F, Ohshima K, *et al.* Age-related Epstein-Barr virus (EBV)-associated B-cell lymphoproliferative disorders: comparison with EBV-positive classic Hodgkin lymphoma in elderly patients. *Blood.* 2009;113(12):2629-36.
 156. Hummel M, Anagnostopoulos I, Dallenbach F, Korbjuhn P, Dimmler C, Stein H. EBV infection patterns in Hodgkin's disease and normal lymphoid tissue: expression and cellular localization of EBV gene products. *Br J Haematol.* 1992;82(4):689-94.
 157. Weinreb M, Day PJ, Niggli F, Powell JE, Raafat F, Hesseling PB, *et al.* The role of Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease from different geographical areas. *Arch Dis Child.* 1996;74(1):27-31.
 158. Kanda T. EBV-Encoded Latent Genes. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1045:377-94.
 159. Meyer RM, Ambinder RF, Stroobants S. Hodgkin's lymphoma: evolving concepts with implications for practice. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2004:184-202.
 160. He B, Raab-Traub N, Casali P, Cerutti A. EBV-encoded latent membrane protein 1 cooperates with BAFF/BLyS and APRIL to induce T cell-independent Ig heavy chain class switching. *J Immunol.* 2003;171(10):5215-24.

-
161. Lam KP, Kühn R, Rajewsky K. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell*. 1997;90(6):1073-83.
162. Bechtel D, Kurth J, Unkel C, Kuppers R. Transformation of BCR-deficient germinal-center B cells by EBV supports a major role of the virus in the pathogenesis of Hodgkin and posttransplantation lymphomas. *Blood*. 2005;106(13):4345-50.
163. Chaganti S, Bell AI, Pastor NB, Milner AE, Drayson M, Gordon J, *et al*. Epstein-Barr virus infection in vitro can rescue germinal center B cells with inactivated immunoglobulin genes. *Blood*. 2005;106(13):4249-52.
164. Mancao C, Altmann M, Jungnickel B, Hammerschmidt W. Rescue of "crippled" germinal center B cells from apoptosis by Epstein-Barr virus. *Blood*. 2005;106(13):4339-44.
165. Cohen JL. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*. 2000;343(7):481-92.
166. Dirmeier U, Neuhierl B, Kilger E, Reisbach G, Sandberg ML, Hammerschmidt W. Latent membrane protein 1 is critical for efficient growth transformation of human B cells by Epstein-Barr virus. *Cancer Res*. 2003;63(11):2982-9.
167. Kaye KM, Izumi KM, Kieff E. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(19):9150-4.
168. Swaminathan S, Tomkinson B, Kieff E. Recombinant Epstein-Barr virus with small RNA (EBER) genes deleted transforms lymphocytes and replicates in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(4):1546-50.
169. Yajima M, Kanda T, Takada K. Critical role of Epstein-Barr Virus (EBV)-encoded RNA in efficient EBV-induced B-lymphocyte growth transformation. *J Virol*. 2005;79(7):4298-307.

-
170. Vinay Kumar AKA, Jon C. Aster. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease: Elsevier Saunders; 2015.
171. Duffield AS, Ascierto ML, Anders RA, Taube JM, Meeker AK, Chen S, *et al.* Th17 immune microenvironment in Epstein-Barr virus-negative Hodgkin lymphoma: implications for immunotherapy. *Blood Adv.* 2017;1(17):1324-34.
172. Wu R, Sattarzadeh A, Rutgers B, Diepstra A, van den Berg A, Visser L. The microenvironment of classical Hodgkin lymphoma: heterogeneity by Epstein-Barr virus presence and location within the tumor. *Blood Cancer J.* 2016;6:e417.
173. Carey CD, Gusenleitner D, Lipschitz M, Roemer MGM, Stack EC, Gjini E, *et al.* Topological analysis reveals a PD-L1-associated microenvironmental niche for Reed-Sternberg cells in Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2017;130(22):2420-30.
174. Lee CW, Ren YJ, Marella M, Wang M, Hartke J, Couto SS. Multiplex immunofluorescence staining and image analysis assay for diffuse large B cell lymphoma. *J Immunol Methods.* 2020;478:112714.
175. Baharlou H, Canete NP, Cunningham AL, Harman AN, Patrick E. Mass Cytometry Imaging for the Study of Human Diseases-Applications and Data Analysis Strategies. *Front Immunol.* 2019;10:2657.
176. Campos AHJF, Moreira A, Ribeiro KB, Paes RP, Zerbini MC, Aldred V, *et al.* Frequency of EBV associated classical Hodgkin lymphoma decreases over a 54-year period in a Brazilian population. *Sci Rep.* 2018;8(1):1849.
177. Khan G, Norton AJ, Slavin G. Epstein-Barr virus in Hodgkin disease. Relation to age and subtype. *Cancer.* 1993;71(10):3124-9.
178. Myriam BD, Sonia Z, Hanene S, Teheni L, Mounir T. Prognostic significance of Epstein-Barr virus (EBV) infection in Hodgkin lymphoma patients. *J Infect Chemother.* 2017;23(3):121-30.

-
179. Chang KC, Chen PC, Chang Y, Wu YH, Chen YP, Lai CH, *et al.* Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 up-regulates cytokines and correlates with older age and poorer prognosis in Hodgkin lymphoma. *Histopathology*. 2017;70(3):442-55.
180. Diepstra A, van Imhoff GW, Schaapveld M, Karim-Kos H, van den Berg A, Vellenga E, *et al.* Latent Epstein-Barr virus infection of tumor cells in classical Hodgkin's lymphoma predicts adverse outcome in older adult patients. *J Clin Oncol*. 2009;27(23):3815-21.
181. Lee JH, Kim Y, Choi JW, Kim YS. Prevalence and prognostic significance of Epstein-Barr virus infection in classical Hodgkin's lymphoma: a meta-analysis. *Arch Med Res*. 2014;45(5):417-31.
182. Armand P. Immune checkpoint blockade in hematologic malignancies. *Blood*. 2015;125(22):3393-400.
183. Green MR, Rodig S, Juszczynski P, Ouyang J, Sinha P, O'Donnell E, *et al.* Constitutive AP-1 activity and EBV infection induce PD-L1 in Hodgkin lymphomas and posttransplant lymphoproliferative disorders: implications for targeted therapy. *Clin Cancer Res*. 2012;18(6):1611-8.
184. Massini G, Siemer D, Hohaus S. EBV in Hodgkin Lymphoma. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2009;1(2):e2009013.
185. Kamper P, Bendix K, Hamilton-Dutoit S, Honoré B, Nyengaard JR, d'Amore F. Tumor-infiltrating macrophages correlate with adverse prognosis and Epstein-Barr virus status in classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2011;96(2):269-76.
186. Cohen M, Vistarop AG, Huaman F, Narbaitz M, Metrebian F, De Matteo E, *et al.* Cytotoxic response against Epstein Barr virus coexists with diffuse large B-cell lymphoma tolerogenic microenvironment: clinical features and survival impact. *Sci Rep*. 2017;7(1):10813.

-
187. Bally AP, Austin JW, Boss JM. Genetic and Epigenetic Regulation of PD-1 Expression. *J Immunol.* 2016;196(6):2431-7.
 188. Lambert SL, Martinez OM. Latent membrane protein 1 of EBV activates phosphatidylinositol 3-kinase to induce production of IL-10. *J Immunol.* 2007;179(12):8225-34.
 189. Herling M, Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Vassilakopoulos TP, Kliche KO, Nadali G, *et al.* Expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's lymphoma: associations with presenting features, serum interleukin 10 levels, and clinical outcome. *Clin Cancer Res.* 2003;9(6):2114-20.
 190. Carbone A, Gloghini A. Epstein Barr Virus-Associated Hodgkin Lymphoma. *Cancers (Basel).* 2018;10(6).
 191. Chetaille B, Bertucci F, Finetti P, Esterni B, Stamatoullas A, Picquenot JM, *et al.* Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome. *Blood.* 2009;113(12):2765-3775.
 192. Cader FZ, Schackmann RCJ, Hu X, Wienand K, Redd R, Chapuy B, *et al.* Mass cytometry of Hodgkin lymphoma reveals a CD4. *Blood.* 2018;132(8):825-36.
 193. Di Gaetano R, Gasparetto V, Padoan A, Callegari B, Candiotto L, Sanzari MC, *et al.* Flow cytometry CD4(+)CD26(-)CD38(+) lymphocyte subset in the microenvironment of Hodgkin lymphoma-affected lymph nodes. *Ann Hematol.* 2014;93(8):1319-26.
 194. Assis MC, Campos AH, Oliveira JS, Soares FA, Silva JM, Silva PB, *et al.* Increased expression of CD4+CD25 + FOXP3+ regulatory T cells correlates with Epstein-Barr virus and has no impact on survival in patients with classical Hodgkin lymphoma in Brazil. *Med Oncol.* 2012;29(5):3614-9.

-
195. Hurwitz SN, Bagg A. A 2020 vision into Hodgkin lymphoma biology. *Adv Anat Pathol*. 2020;27(5):269-77.
 196. Greaves P, Clear A, Owen A, Iqbal S, Lee A, Matthews J, *et al*. Defining characteristics of classical Hodgkin lymphoma microenvironment T-helper cells. *Blood*. 2013;122(16):2856-63.
 197. Moser B. CXCR5, the Defining Marker for Follicular B Helper T (TFH) Cells. *Front Immunol*. 2015;6:296.
 198. Bunse M, Pfeilschifter J, Bluhm J, Zschummel M, Joedicke JJ, Wirges A, *et al*. CXCR5 CAR-T cells simultaneously target B cell non-Hodgkin's lymphoma and tumor-supportive follicular T helper cells. *Nat Commun*. 2021;12(1):240.
 199. Pavlovic A, Glavina Durdov M, Capkun V, Jakelic Pitesa J, Bozic Sakic M. Classical Hodgkin Lymphoma with Positive Epstein-Barr Virus Status is Associated with More FOXP3 Regulatory T Cells. *Med Sci Monit*. 2016;22:2340-6.
 200. Morales O, Mrizak D, François V, Mustapha R, Miroux C, Depil S, *et al*. Epstein-Barr virus infection induces an increase of T regulatory type 1 cells in Hodgkin lymphoma patients. *Br J Haematol*. 2014;166(6):875-90.
 201. Ouaguia L, Mrizak D, Renaud S, Moralès O, Delhem N. Control of the inflammatory response mechanisms mediated by natural and induced regulatory T-cells in HCV-, HTLV-1-, and EBV-associated cancers. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:564296.
 202. Souza EM, Baiocchi OC, Zanichelli MA, Alves AC, Assis MG, Eiras DP, *et al*. Impact of Epstein-Barr virus in the clinical evolution of patients with classical Hodgkin's lymphoma in Brazil. *Hematol Oncol*. 2010;28(3):137-41.
 203. Kanakry JA, Li H, Gellert LL, Lemas MV, Hsieh WS, Hong F, *et al*. Plasma Epstein-Barr virus DNA predicts outcome in advanced Hodgkin lymphoma:

- correlative analysis from a large North American cooperative group trial. *Blood*. 2013;121(18):3547-53.
204. Zaki MAA, Wada N, Ikeda J, Shibayama H, Hashimoto K, Yamagami T, *et al*. Prognostic implication of types of tumor-associated macrophages in Hodgkin lymphoma. *Virchows Archiv*. 2011;459(4):361-6.
205. Greaves P, Clear A, Coutinho R, Wilson A, Matthews J, Owen A, *et al*. Expression of FOXP3, CD68, and CD20 at diagnosis in the microenvironment of classical Hodgkin lymphoma is predictive of outcome. *J Clin Oncol*. 2013;31(2):256-62.
206. Tudor CS, Distel LV, Eckhardt J, Hartmann A, Niedobitek G, Buettner M. B cells in classical Hodgkin lymphoma are important actors rather than bystanders in the local immune reaction. *Hum Pathol*. 2013;44(11):2475-86.
207. Barros MH, Vera-Lozada G, Soares FA, Niedobitek G, Hassan R. Tumor microenvironment composition in pediatric classical Hodgkin lymphoma is modulated by age and Epstein-Barr virus infection. *Int J Cancer*. 2012;131(5):1142-52.
208. Enblad G, Molin D, Glimelius I, Fischer M, Nilsson G. The potential role of innate immunity in the pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2007;21(5):805-23.
209. Ferrarini I, Rigo A, Visco C, Krampera M, Vinante F. The Evolving Knowledge on T and NK Cells in Classic Hodgkin Lymphoma: Insights into Novel Subsets Populating the Immune Microenvironment. *Cancers (Basel)*. 2020;12(12).
210. Le KS, Amé-Thomas P, Tarte K, Gondois-Rey F, Granjeaud S, Orlanducci F, *et al*. CXCR5 and ICOS expression identifies a CD8 T-cell subset with T. *Blood Adv*. 2018;2(15):1889-900.

-
211. Tan WCC, Nerurkar SN, Cai HY, Ng HHM, Wu D, Wee YTF, *et al.* Overview of multiplex immunohistochemistry/immunofluorescence techniques in the era of cancer immunotherapy. *Cancer Commun (Lond.)*. 2020;40(4):135-53.