

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE

Graziela Toledo Costa Mayrink

Expressão do Vírus Epstein-Barr em Células Tumorais do Linfoma de Hodgkin
Clássico:
correlação com fatores desfavoráveis e sobrevida

Juiz de Fora
2016

Graziela Toledo Costa Mayrink

Expressão do vírus Epstein-Barr em células tumorais do Linfoma de Hodgkin

Clássico:

correlação com fatores desfavoráveis e sobrevida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Saúde. Área de concentração: Saúde Brasileira.

Orientador: Prof. Dr. Abrahão Elias Hallack Neto

Juiz de Fora

2016

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Mayrink, Graziela Toledo Costa .

Expressão do Vírus Epstein-Barr em Células Tumorais do Linfoma de Hodgkin Clássico : correlação com fatores desfavoráveis e sobrevida / Graziela Toledo Costa Mayrink. -- 2016.

153 f. : il.

Orientador: Abrahão Elias Hallack Neto

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2016.

1. Linfoma de Hodgkin clássico. 2. Vírus Epstein-Barr. 3. Hibridização in situ. 4. LMP-1. 5. Escore Prognóstico Internacional. I. Hallack Neto, Abrahão Elias, orient. II. Título.

Dedico este estudo ao paciente com câncer, anjo divino nesse mundo, fonte de inspiração constante em minha vida; exemplo imensurável de fé, resiliência e profundidade. Cuidar de você faz o meu coração se aproximar mais do Amor de Deus.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus a alegria de viver este momento tão especial.

Aos meus pais, Angelina e Ildebrando – educadores de profissão – agradeço pelo inesgotável empenho em me guiar pelo caminho dos estudos e por despertarem em mim o desejo de ensinar. Vocês são os verdadeiros mestres da minha vida.

À minha irmã, Larissa, incentivadora eterna das minhas conquistas, pela manifestação de carinho e apoio essencial para a finalização desse projeto.

Ao meu esposo Camilo, pelo amor, paciência e todo apoio prestado. Por dividir comigo as angústias e dificuldades de todo o processo.

Ao Diego Micarello, pelas primeiras e valiosas orientações estatísticas e pelo trabalho de preparação e formatação das imagens do banco de dados.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Abrahão Elias Hallack Neto, pela orientação inteligente deste trabalho, por ser um exemplo que eu procuro sempre seguir.

À minha querida amiga Kelli Borges dos Santos, pela amizade sincera, pela orientação didática e estatística e pelo incentivo constante.

À pesquisadora Suely Nonogaki, por ter prestado sempre com prontidão todo auxílio necessário com os métodos utilizados no Centro de Patologia Quantitativa do Instituto Adolfo Lutz.

À Dra. Yara de Menezes, pela imprescindível contribuição dispensada na revisão histopatológica e análise diagnóstica dos testes imunohistológicos.

Ao Prof. Dr. Angelo Atalla, por ser incansável fonte de orientação e incentivo para o meu crescimento pessoal e profissional.

Às residentes de Hematologia, Aline e Juliana, pelo apoio e compreensão nos últimos meses de finalização do estudo e pela presença amiga em dias difíceis.

Aos demais colegas e acadêmicos do Núcleo de Hematologia e Transplante de Medula Óssea, pela amizade e aprendizado constante durante as nossas reuniões.

Aos integrantes do Centro de Patologia Quantitativa do Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo, que gentilmente me acolheram e permitiram a execução das minhas análises.

Aos funcionários do Hospital Ascomcer e do serviço de Hematologia e Transplante de Medula Óssea do Hospital Universitário de Juiz de Fora, pela colaboração na pesquisa de prontuários.

Aos monges do Mosteiro Santíssima Trindade e às monjas do Mosteiro da Santa Cruz, pelas especiais orações.

Ao Gláucio, por transmitir lucidez nos momentos mais delicados.

Aos pacientes, que gentilmente permitiram a análise de seus materiais anatomopatológicos.

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

(Albert Einstein)

RESUMO

Introdução: A associação entre Linfoma de Hodgkin clássico e o *status* tumoral do vírus Epstein-Barr é bem definida. Entretanto, a expressão da positividade do vírus Epstein-Barr nas células de Reed-Sternberg/Hodgkin e o impacto dessa relação na sobrevida do Linfoma de Hodgkin clássico permanecem controversos e apresentam resultados conflitantes em estudos de diversas regiões do mundo. Considera-se essencial o entendimento fisiopatogênico desse vírus no prognóstico dos pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico. **Objetivo:** Correlacionar o *status* do vírus Epstein-Barr com os fatores de risco desfavoráveis e fatores prognósticos do Linfoma de Hodgkin clássico em uma população brasileira. **Métodos:** A positividade do vírus Epstein-Barr foi determinada pelo método de Hibridização *in situ* para o ácido ribonucleico viral e pela imuno-histoquímica para proteína de membrana latente viral-1. A revisão histopatológica das amostras e a análise dos testes de identificação foram realizadas por uma hematopatologista experiente. Avaliou-se o impacto prognóstico do *status* do vírus Epstein-Barr em 29 pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico. Os fatores prognósticos do Escore Prognóstico Internacional para estadio avançado e os fatores de risco desfavoráveis instituídos pelo Grupo Alemão de Estudos em Hodgkin para estadio limitado foram correlacionados com o *status* viral nas células tumorais. Para as associações entre presença do vírus Epstein-Barr e outras variáveis categóricas, aplicaram-se os testes de Qui-quadrado ou exato de Fisher. A Sobrevida Global e a Sobrevida Livre de Eventos foram analisadas pelo método de Kaplan-Meier e Modelo de Regressão Proporcional de Cox. **Resultados:** A média de idade ao diagnóstico foi 33 anos. O *status* do vírus Epstein-Barr nas células tumorais foi positivo em 37,9%. As células tumorais positivas para o vírus foram mais frequentes em pacientes com idade maior que 45 anos, sem diferença estatística. O subtipo celularidade mista foi o mais frequente ($p = 0,02$) e o tamanho de efeito desse teste foi de moderada magnitude. Na análise univariada, as sobrevidas Livre de Eventos e Global não apresentaram significância estatística para idade, sexo, estadio clínico, hemoglobina, leucocitose, linfocitopenia, albumina, envolvimento nodal, sintomas B, doença extranodal e doença Bulky entre os pacientes positivos e negativos para o vírus Epstein-Barr ($p > 0,05$). Os pacientes positivos apresentaram maior Sobrevida Livre de Eventos quando comparados aos

pacientes negativos, embora a diferença não apresentasse significância ($p = 0,07$). Na análise multivariada, a positividade ao vírus Epstein-Barr não demonstrou fator prognóstico significativo. Conclusões: Apesar do *status* do vírus Epstein-Barr nas células tumorais não ter revelado associação com fatores prognósticos adversos e não ter influenciado a Sobrevida Global e a Sobrevida Livre de Eventos, observou-se uma associação positiva entre a presença desse vírus e o subtipo celularidade mista, demonstrando uma relação com o subtipo histológico de pior prognóstico.

Palavras-chave: Linfoma de Hodgkin Clássico. Vírus Epstein-Barr. Hibridização *in situ*. LMP-1. Escore Prognóstico Internacional.

ABSTRACT

Introduction: The association between classical Hodgkin's Lymphoma and tumor Epstein-Barr virus status is well established. However, the expression of Epstein-Barr virus presence in Hodgkin/Reed-Sternberg cells and its prognosis remains controversial and presents conflicting results in studies worldwide. Understanding the pathophysiological role of this virus in the prognosis of patients with classical Hodgkin's Lymphoma is essential. **Objective:** The aim of this study is to correlate the clinical outcome with Epstein-Barr virus status in a Brazilian population. **Methods:** Epstein-Barr virus positivity was determined by in situ hybridization for Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acid and immunohistochemistry for viral latent membrane protein-1. The histopathology review and the analysis of identification tests were performed by an hematopathologist expert. The prognostic impact of Epstein-Barr virus status in 29 patients with classical Hodgkin's Lymphoma was evaluated. Prognostic factors from International Prognostic Score to advanced stage and risk factors from German Hodgkin Study Group to limited stage were correlated with tumor cells Epstein-Barr virus status. In order to determine associations between the presence of Epstein-Barr virus and other categorical variables, Chi-square or Fisher's exact tests were applied. Overall and event-free survivals were analyzed with Kaplan-Meier method and Cox proportional hazards regression models. **Results:** The mean age at diagnosis was 33 years. Tumor cells Epstein-Barr virus status was positive in 37.9%. Epstein-Barr virus-positive classical Hodgkin's Lymphoma was more frequent in patients older than 45 years, with no statistical difference. Mixed cellularity histological subtype was more common in Epstein-Barr virus-related tumor cells ($p = 0.02$) and its effect-size index was medium. Univariate analysis, event-free survival and overall survival were not significantly associated to age, sex, clinical stage, hemoglobin, leukocytes, lymphocytes, albumin, nodal involvement, B symptoms, extranodal disease and Bulky disease in Epstein-Barr virus-positive and negative patients ($p > 0.05$). Epstein-Barr virus-positive patients had longer event-free survival when compared to Epstein-Barr virus-negative ones, even though the difference was not statistically significant ($p = 0.07$). In multivariate analysis, Epstein-Barr virus positivity was not a significant prognostic factor. **Conclusions:** Although the Epstein-Barr virus status in tumor cells was not associated with adverse prognostic

factors and did not influence the overall and event-free survivals, a positive association between the presence of Epstein-Barr virus and Mixed-cellularity subtype was noticed.

Keywords: Classical Hodgkin's Lymphoma. Epstein-Barr virus. In situ hybridization. LMP-1. International Prognostic Score.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da relação entre as células malignas de Reed-Sternberg/ Hodgkin e o microambiente tumoral no Linfoma de Hodgkin clássico	28
Figura 2 – Casos novos e óbitos de Linfoma de Hodgkin por 100.000 pessoas nos Estados Unidos da América, período de 1975 a 2012	30
Figura 3 – Titulação sorológica do vírus Epstein-Barr	63
Figura 4 – Modelo esquemático da provável relação entre o vírus Epstein-Barr e as células de Reed-Sternberg/Hodgkin	67
Figura 5 – Hibridização <i>in situ</i> para vírus Epstein-Barr em células tumorais do Linfoma de Hodgkin	83
Figura 6 – Controles positivos e negativos das reações de imuno-histoquímica e hibridização <i>in situ</i>	84
Figura 7 – Fotomicrografias das amostras histológicas de dois pacientes do estudo: hematoxilina-eosina, imuno-histoquímica e hibridização <i>in situ</i>	85
Figura 8 – Tempo de sobrevida global de pacientes com Linfoma de Hodgkin incluídos (n = 29) e excluídos (n = 30) no presente estudo	118
Figura 9 – Tempo de sobrevida livre de eventos de pacientes com Linfoma de Hodgkin incluídos (n = 29) e excluídos (n = 30) no presente estudo....	119

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Perfil imuno-histoquímico do Linfoma de Hodgkin.....	34
Quadro 2 – Classificações do Linfoma de Hodgkin.....	37
Quadro 3 – Sistema de estadiamento de Ann Arbor.....	42
Quadro 4 – Estadiamento de Ann Arbor Cotswolds-modificada	43
Quadro 5 – Definição de resposta do linfoma pelos critérios de Cheson.....	44
Quadro 6 – Escore de Deauville: escala de 5 pontos para tomografia por emissão de pósitrons com fluordeoxiglicose marcada com flúor acoplada à tomografia computadorizada	46
Quadro 7 – Recomendações de Lugano para avaliação de resposta à tomografia por emissão de pósitrons	46
Quadro 8 – Fatores de risco do German Hodgkin's Lymphoma Study Group para estadio limitado no Linfoma de Hodgkin	49
Quadro 9 – Fatores prognósticos pelo Escore Prognóstico Internacional para estadio avançado no Linfoma de Hodgkin	50
Quadro 10 – Fatores prognósticos adversos para recidiva e refratariedade no Linfoma de Hodgkin	53
Quadro 11 – Protocolos de quimioterapia mais utilizados no Linfoma de Hodgkin.....	56
Quadro 12 – Expressão gênica na latência do vírus Epstein-Barr.....	61
Quadro 13 – Testes laboratoriais para vírus Epstein-Barr	64
Quadro 14 – Descrição de estudos clínicos e populacionais que relacionaram o valor prognóstico da presença do Epstein-Barr vírus e Linfoma de Hodgkin clássico nos últimos 16 anos.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características do grupo incluído (n = 29) e excluído (n = 30) no estudo	115
Tabela 2 – Características da população <i>versus</i> recidiva/óbito	116
Tabela 3 – Concordância da Classificação do subtipo histológico	116
Tabela 4 – Positividade do vírus Epstein-Barr pelas técnicas de imunohisquímica e hibridização <i>in situ</i> cromogênica	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-PS	5-point scale (Escala dos 5 pontos)
ABF1	Autonomously Replicating Sequence Binding Factor
ABVD	Doxorrubicina, Bleomicina, Vimblastina, Dacarbazina
ACV	Antígeno de Capsídeo Viral
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
AR	Artrite Reumatoide
ASH	American Society of Hematology (Sociedade Americana de Hematologia)
BCL-2	B-Cell Lymphoma 2
BCL-6	B-Cell CLL/Lymphoma 6
BCR	B-Cell Receptor (Receptor de Células B)
BEACOPP	Bleomicina, Etoposídeo, Doxorrubicina, Ciclofosfamida, Vincristina, Procarbazina, Prednisona
BMO	Biópsia de Medula Óssea
BOB.1/OBF.1	Coativador de transcrição específico de linfócito B
BRLF1	Proteína de transcrição ativadora do Epstein-Barr Vírus
BZLF1	Proteína de Transcrição Ativadora do Epstein-Barr Vírus
CCL17	Chemokine Ligand 17
CD163	Cluster of Differentiation 163
CD138	Cluster of Differentiation 138
CD15	Cluster of Differentiation 15
CD19	Cluster of Differentiation 19
CD2	Cluster of Differentiation 2
CD20	Cluster of Differentiation 20
CD21	Cluster of Differentiation 21
CD3	Cluster of Differentiation 3
CD30	Cluster of Differentiation 30
CD37	Cluster of Differentiation 37
CD4	Cluster of Differentiation 4
CD43	Cluster of Differentiation 43
CD45	Cluster of Differentiation 45

CD68	Cluster of Differentiation 68
CD75	Cluster of Differentiation 75
CD79a	Cluster of Differentiation 79
CD8	Cluster of Differentiation 8
cGy	Centigray
cHL	Classical Hodgkin's Lymphoma (Linfoma de Hodgkin clássico)
CM	Celularidade Mista
CO	Cavidade Oral
CRu	Complete Remission Unconfirmed (Remissão Completa Não Confirmada)
CV	Carga Viral
DE	Doença estável
DH	Doença de Hodgkin
DHAP	Dexametasona, Citarabina em altas doses, Cisplatina
DL	Depleção Linfocitária
DLPT	Doença Linfoproliferativa após Transplante
DMP	Doença Metabólica Progressiva
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
DP	Doença em Progressão
DS	Deauville Score (Escore de Deauville)
E2A	Gene que potencializa ligação de fatores de transcrição
EA	Early Antigen (Antígeno Precoce)
EBER1	Epstein-Barr Virus-encoded small Ribonucleic Acid 1 (Pequeno Ácido Ribonucleico Viral do Epstein-Barr 1)
EBER2	Epstein-Barr Virus-encoded small Ribonucleic Acid 2 (Pequeno Ácido Ribonucleico Viral do Epstein-Barr 2)
EBNA-1	Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 (Antígeno Nuclear de Epstein-Barr 1)
EBNA-2	Epstein-Barr Nuclear Antigen 2 (Antígeno Nuclear de Epstein-Barr 2)
EBNA-3A	Epstein-Barr Nuclear Antigen 3A (Antígeno Nuclear de Epstein-Barr 3A)
EBNA-3B	Epstein-Barr Nuclear Antigen 3B (Antígeno Nuclear de Epstein-Barr 3B)

EBNA-3C	Epstein-Barr Nuclear Antigen 3C (Antígeno Nuclear de Epstein-Barr 3C)
EBNA-LP	Epstein-Barr Nuclear Antigen Leader Protein (Proteína Líder do Antígeno Nuclear de Epstein-Barr)
EBV -	Epstein-Barr Vírus Negativo
EBV +	Epstein-Barr Vírus Positivo
EBV	Epstein-Barr Vírus
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EN	Esclerose Nodular
EORTIC	European Organization for Research and Treatment of Cancer (Organização Europeia de Investigação e Tratamento do Câncer)
ESMO	European Society for Medical Oncology (Sociedade Europeia de Oncologia Médica)
EUA	Estados Unidos da América
FDG	Fluorodeoxyglicose
FFP	Freedow From Progression
FISH	Fluorescent in situ Hybridization
FOXP3	Forkhead Winged-Helix Transcriptional Fator
GCET1	Centerin, marcador de linfoma derivado de centro germinativo
G-CSF	Granulocyte-Colonystimulating Fator (Fator estimulador de Colônias de Granulócitos)
GHSG	German Hodgkin's Lymphoma Study Group
HE	Hematoxilina-Eosina
HHV4	Vírus Herpes Humano do tipo 4
HIV	Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HLA	Human Leukocyte Antigen (Antígeno Leucocitário Humano)
HRS	Hodgkin Reed-Sternberg
ICE	Ifosfamida, Carboplatina, Etoposídeo
ID2	Inhibitor of Deoxyribonucleic Acid Binding 2 (Inibidor da ligação de Ácido Desoxirribonucleico)
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina

IgD	Imunoglobulina D
IGEV	Ifosfamida, Gencitabina, Vinorelbina, Prednisolona
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IHQ	Imuno-histoquímica
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-2	Interleucina 2
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-7	Interleucina 7
IL-9	Interleucina 9
ILRN	Interleukin-1 Receptor Antagonista (Antagonista do Receptor de Interleucina-1)
INFG	Gene do interferon gama
IP-10	Proteína induzível pelo interferon 10
IPS	International Prognostic Score (Escore Prognóstico Internacional)
IRF4	Interferon Regulatory Factor 4 protein
ISH	In situ Hybridization (Hibridização in situ)
IWG	International Working Group (Grupo de Trabalho Internacional)
JAK/STAT	Janus kinase/signal transducers and activators of transcription pathway
LCK	Possui função de proteína da família kinase
LDH	Lactate dehydrogenase (Lactato Desidrogenase)
LH	Linfoma de Hodgkin
LHc	Linfoma de Hodgkin clássico
LHPLN	Linfoma de Hodgkin Predominância Linfocítica Nodular
LMP-1	Latent Membrane Protein 1 (Proteína Latente de Membrana-1)
LMP-2A	Latent Membrane Protein 2A (Proteína Latente de Membrana-2A)

LMP-2B	Latent Membrane Protein 2B (Proteína Latente de Membrana-2B)
LP	Lymphocyte Predominant (Predominância Linfocítica)
MAL protein	Proteína codificada pelo gene MAL
MDC	Macrophage Derived Chemokine (Quimiocina Derivada dos Macrófagos)
MHC	Major Histocompatibility Complex (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
MI	Mononucleose infecciosa
Mig	Monocina induzida pelo interferon gama
MIP-1 α	Macrophage Inflammatory Proteins-1 α
MIP-1 β	Macrophage Inflammatory Proteins-1 β
MOPP	Mecloretamina, Oncovin, Procarbazina, Prednisona
MUM1	Multiple Myeloma 1 (Mieloma múltiplo 1; Fator de transcrição)
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NF-kappa B	Nuclear Factor-kappa B (Fator Nuclear-kappa B)
NK	Natural Killer
NOTCH1	Notch Homolog 1, Translocation-Associated
OCT-2	Organic Cation Transporter Gene
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAG	Phosphoprotein Associated with Glycolipid-enriched membrane domains
PAX5/BSAP	“Paired Box” (gene que codifica proteína ativadora de linhagem de célula B)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
PCR	Proteína C Reativa (exame bioquímico)
PD-1	Programmed Death-1 (Proteína de Morte Celular Programada)
PD-L1	Programmed Death Ligand-1 (Morte Celular Programada do Ligante 1)
PD-L2	Programmed death ligand-2 (Morte Celular Programada do Ligante 2)
PET/TC FDG-F	Tomografia por Emissão de Pósitrons com Fluorodeoxiglicose marcada com flúor acoplada à tomografia computadorizada

PU.1	Fator de transcrição
QT	Quimioterapia
RANTES	Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted
RC	Remissão completa
RCB	Receptor de células B
REAL	Revised European-American Lymphoma (Revisão Euro-Americana de Linfoma)
RL	Rico em Linfócitos
RMC	Resposta Molecular Completa
RMN	No Metabolic Response
RMP	Resposta Molecular Parcial
RNA	Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
RP	Remissão parcial
RS	Reed-Sternberg
RSH	Reed-Sternberg/Hodgkin
RT	Radioterapia
SG	Sobrevida Global
SLE	Sobrevida Livre de Eventos
SLP	Sobrevida Livre de Progressão
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de Nucleotídeo Único)
SUV max	Standardized Uptake Values (Valor Padronizado de Captação Máximo)
TAMS	Tumor-Associated Macrophages (Macrófagos Associados ao Tumor)
TARC	Thymus and Activation-Regulated Chemokine (Quimiocina Tímica Regulada pela Ativação)
TC	Tomografia Computadorizada
TCTH	Transplante de Células Tronco Hematopoéticas
TGF- β	Transforming growth factor β (Fator de transformação do crescimento β)
TH2	Célula T Helper 2

TNFA	Tumor Necrosis Factor Alpha (Gene do Fator de Necrose Tumoral Alfa)
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α (Fator de necrose tumoral- α)
Treg	Células T regulatórias
VHS	Velocidade de Hemossedimentação
WHO	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO PRIMÁRIO	25
2.2	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	25
3	REVISÃO DA LITERATURA	26
3.1	ASPECTOS HISTÓRICOS DO LINFOMA DE HODGKIN	26
3.2	DEFINIÇÃO E BIOLOGIA DO LINFOMA DE HODGKIN	27
3.3	EPIDEMIOLOGIA E ETIOPATOGENIA	29
3.4	DIAGNÓSTICO	32
3.4.1	Aspectos clínicos	32
3.4.2	Aspectos hematológicos e bioquímicos	32
3.4.3	Aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos	33
3.5	CLASSIFICAÇÃO	34
3.5.1	Aspectos históricos da classificação histológica	34
3.5.2	Linfoma de Hodgkin Clássico	38
3.5.2.1	<u>Subtipos histológicos do Linfoma de Hodgkin Clássico</u>	39
3.5.2.1.1	Esclerose nodular	39
3.5.2.1.2	Celularidade mista	39
3.5.2.1.3	Rico em linfócitos	40
3.5.2.1.4	Depleção linfocitária	40
3.5.3	Linfoma de Hodgkin predominância linfocítica nodular	40
3.6	ESTADIAMENTO E AVALIAÇÃO DE RESPOSTA	41
3.7	FATORES PROGNÓSTICOS	48
3.8	TRATAMENTO	55
3.8.1	Tratamento da doença limitada favorável	55
3.8.2	Tratamento da doença limitada desfavorável	56
3.8.3	Tratamento da doença avançada	57
3.8.4	Tratamento da doença refratária ou recorrente	58
3.9	O VÍRUS EPSTEIN-BARR	59
3.10	EPSTEIN-BARR VÍRUS E LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO	65

3.11	EPSTEIN-BARR VÍRUS E PROGNÓSTICO NO LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO.....	68
4	MÉTODOS	77
4.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	77
4.2	DESENHO DO ESTUDO	77
4.3	SELEÇÃO DA POPULAÇÃO	78
4.4	AMOSTRAS ANATOMOPATOLÓGICAS.....	79
4.5	MÉTODOS PARA DETECÇÃO DO EPSTEIN-BARR VÍRUS	79
4.5.1	Microtomia das amostras	79
4.5.2	Coloração de Hematoxilina-Eosina	80
4.5.3	Reação de imuno-histoquímica para a proteína latente de membrana 1 do Epstein-Barr vírus	80
4.5.4	Hibridização <i>in situ</i> cromogênica para Epstein-Barr vírus	82
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	86
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
7	CONCLUSÃO	89
	REFERÊNCIAS	90
	APÊNDICES	106
	ANEXOS	120

1 INTRODUÇÃO

O Linfoma de Hodgkin (LH) é uma doença heterogênea tanto do ponto de vista histopatológico quanto epidemiológico. Representa, aproximadamente, 11% de todos os linfomas e divide-se em duas distintas entidades: o Linfoma de Hodgkin clássico e o raro Linfoma de Hodgkin predominância linfocítica nodular. As células neoplásicas de Reed-Sternberg/Hodgkin (RSH) do Linfoma de Hodgkin clássico são de origem linfoide, clonais e derivadas, principalmente, das células B maduras (ANSELL, 2014).

A descoberta da origem clonal das células de RSH a partir de células B provocou numerosas pesquisas envolvendo a complexidade biológica do LH. Recentes aplicações de tecnologia genômica, a fim de compreender as mudanças moleculares dessa transformação e proliferação maligna, foram reportadas. Entretanto, nenhum estudo decifrou até o momento um evento transformador etiogênico primário para explicar as características fenotípicas das células de RSH (RE et al., 2005).

Fatores de risco etiopatogênicos implicados no desenvolvimento dessa neoplasia ainda permanecem indefinidos. Fatores hereditários, exposições virais e imunossupressão foram associados ao LH em estudos prévios (ANSELL, 2014).

O vírus Epstein-Barr (EBV), também denominado vírus herpes humano tipo 4, é um vírus duplo de DNA com um potencial oncogênico conhecido e sua presença em células de Reed-Sternberg/Hodgkin do Linfoma de Hodgkin clássico é bem documentada (KAPATAI; MURRAY, 2007).

Considera-se, atualmente, que o EBV, detectado nas células malignas de alguns pacientes portadores de LH, pode influenciar no prognóstico da doença, devido a características como idade ao diagnóstico, subtipo histológico celularidade mista e sexo masculino serem correlacionados com pior sobrevida nesses pacientes. Entretanto, estudos que avaliam a importância prognóstica do EBV, demonstram resultados conflitantes. Pesquisas iniciais não encontraram nenhum impacto ou associação benéfica, enquanto estudos atuais mostram que a presença do EBV em células tumorais de pacientes com LH está associada a uma taxa de melhor sobrevida em pacientes jovens e pior taxa de sobrevida em pacientes de maior idade, com ou sem outros fatores de risco (KEEGAN et al., 2005).

Os estudos no Brasil acerca do valor prognóstico do EBV no Linfoma de Hodgkin são escassos. Conhecer a prevalência do EBV e as características clínicas, biológicas e prognósticas dessa associação no âmbito de uma amostragem brasileira, é essencial para compreender a relação deste vírus na biologia do Linfoma de Hodgkin clássico.

A correlação do prognóstico clínico com o *status* do EBV, em células tumorais de pacientes portadores de Linfoma de Hodgkin clássico, em nosso estudo, fornece uma dimensão da probabilidade que o LH EBV-positivo possui de se manifestar como uma doença biológica distinta do LH EBV-negativo.

Estudar o efeito prognóstico do EBV no Linfoma de Hodgkin clássico contribui na compreensão do comportamento desta doença e pode proporcionar uma relevância terapêutica no futuro.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliar a expressão do vírus Epstein-Barr nas células tumorais de pacientes portadores de Linfoma de Hodgkin clássico.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Correlacionar o *status* do vírus Epstein-Barr com fatores desfavoráveis e avaliar seu impacto na sobrevida;
- Permitir o conhecimento da prevalência do vírus Epstein-Barr no Linfoma de Hodgkin clássico na população de nossa região;
- Identificar prováveis fatores prognósticos em nosso estudo que se relacionem com desfecho desfavorável ou maior possibilidade de sobrevida no Linfoma de Hodgkin clássico.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ASPECTOS HISTÓRICOS DO LINFOMA DE HODGKIN

O Linfoma de Hodgkin (LH) foi referido, primeiramente, por Marcell Malpighi, em 1666, que publicou observações de nódulos esplênicos em uma autópsia de uma jovem de 18 anos (MALPIGHI, 1666). Séculos mais tarde, em 1832, Thomas Hodgkin – cujo nome é associado à doença – descreveu sete pacientes com linfonodomegalias e esplenomegalia, também avaliados através de autópsias (HODGKIN, 1832).

A descrição de Hodgkin permaneceu esquecida durante anos, mas Wilks, em 1865, tendo intitulado seu artigo como “Doença de Hodgkin”, a tornou reconhecida dessa forma. Dois dos sete casos originais de Hodgkin foram posteriormente provados como verdadeiros exemplos de LH por Fox, em 1926, e novamente por Poston, em 1999, desta vez demonstrando a expressão do CD15 nas células neoplásicas. O primeiro relato histopatológico do LH foi publicado por Theodor Langhans, em 1872, e a descrição detalhada das células multinucleadas características desta doença foi apresentada por Carl Sternberg, em 1898 e Dorothy Reed, em 1902. Gall e Mallory estabeleceram o LH como um processo neoplásico em 1942 e a primeira evidência definitiva de sua natureza neoplásica ocorreu em 1967, por meio de uma publicação científica de Seif e Spriggs, que abordava seu cenário citogenético, corroborada posteriormente por Boecker, que em 1975, demonstrou o crescimento clonal das células de Hodgkin (BANERJEE, 2012).

Como consequência do reconhecimento da proliferação clonal das células B – na maioria dos casos – na Doença de Hodgkin (DH), patologistas sugeriram a substituição do nome “Doença de Hodgkin” para “Linfoma de Hodgkin”. O comitê de classificação de doenças neoplásicas hematopoéticas e linfoides, promovido pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1997, decidiu pela aplicação de ambos os nomes (HARRIS et al., 1999).

3.2 DEFINIÇÃO E BIOLOGIA DO LINFOMA DE HODGKIN

O Linfoma de Hodgkin é uma neoplasia do tecido linfoide originada de linfócitos B e raramente de linfócitos T – aproximadamente 98% e 2% dos casos, respectivamente. Seu diagnóstico fundamenta-se na identificação de células características, inseridas em um contexto inflamatório (MOZAHEB, 2013; PILERI et al., 2002).

As células neoplásicas do LH clássico (células de Reed-Stenberg/Hodgkin ou células de RSH) são frequentemente procedentes do centro germinativo de células B e raramente originadas de células T; as células do LH do tipo predominância linfocítica nodular (células LP) são sempre derivadas do centro germinativo de células B (BANERJEE, 2012).

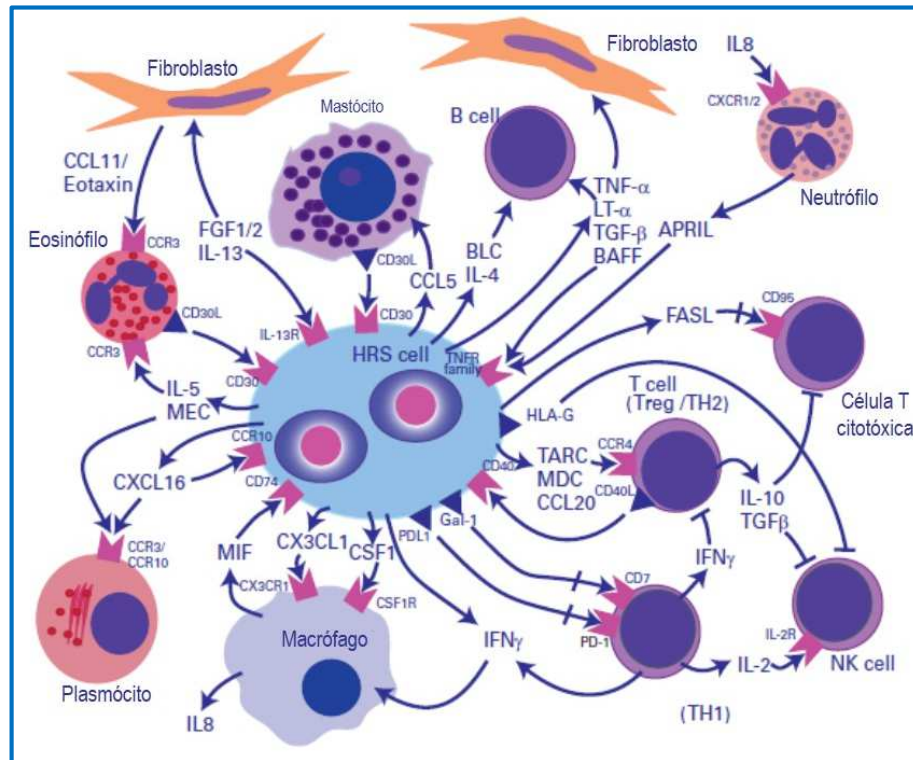
O LH é o único câncer em que, no microambiente tumoral, a quantidade de células reativas supera a quantidade de células malignas, estas últimas representando apenas 1% do tumor. As células de RSH e as células LP manipulam o microambiente, desenvolvendo as características de malignidade e escapando do ataque imune do hospedeiro. Expressam citocinas e quimiocinas, que possibilitam uma resposta imune anormal. A esse mecanismo, soma-se a secreção de substâncias e fatores, pelas células reativas, que permitem a manutenção do processo inflamatório (STEIDL; CONNORS; GASCOYNE, 2011).

O microambiente tumoral do LH clássico é constituído por linfócitos, macrófagos, eosinófilos, mastócitos, células plasmáticas, células estromais, fibroblastos e outras células (PILERI et al., 2002). As citocinas envolvidas nesse contexto inflamatório estruturam o fundo histológico típico do LH (IL-5, TARC, MDC, IP-10, RANTES, Mig), funcionam como fatores de crescimento (IL-6, IL-7, IL-9, IL-13, IL-17) e como agentes imunossupressores [IL-10, fator de crescimento transformador- beta (TGF- β)]. As células de RSH secretam quimiocinas (citocinas com propriedades quimioatrativas) que promovem uma atração de linfócitos T_{H2} (T Helper 2), proporcionando um ambiente favorável de sobrevivência (MAGGIO et al., 2002).

Enquanto a maioria dos linfomas de células B permanece com as características principais de suas células de origem, as células de RSH demonstram um imunofenótipo incomum, por expressarem genes de diferentes células

hematopoéticas (Figura 1). Raramente expressam o receptor de célula B (RCB), o CD19 e o CD20 (KÜPPERS, 2009).

Figura 1 – Representação esquemática da relação entre as células malignas de Reed-Sternberg/ Hodgkin e o microambiente tumoral no Linfoma de Hodgkin clássico



Fonte: Adaptado de STEIDL; CONNORS; GASCOYNE, 2011 (tradução nossa)

Notas: No centro observa-se uma célula binucleada de RSH expressando moléculas de superfície características, tão bem quanto, a secreção de citocinas e quimiocinas. Em volta da célula de RSH encontram-se células não neoplásicas atraídas e ativadas por essas moléculas. As células do microambiente também expressam uma variedade de quimiocinas e citocinas que proporcionam um infiltrado reacional e fornecem sinalização para as células de RSH. Apenas as funções principais de inibição e ativação (setas) de ligantes da membrana (triângulos roxos) e as moléculas secretadas por receptores de superfície (rosa) são ilustradas; existem outras interações.

Legenda:

IL	– Interleucina	Treg	– Célula regulatória T
FGF	– Fator de crescimento de fibroblastos	TH	– Células helper T
TNF- α	– Fator de necrose tumoral α	TARC	– Quimiocina tímica regulada pela ativação
LT- α	– Linfoxina α	MDC	– Quimiocina derivada do macrófago
TGF- β	– Fator de crescimento transformador β	Gal-1	– Galectina-1
BAFF	– Fator ativador de célula B	PDL	– Morte celular programada
APRIL	– Ligante indutor de proliferação	IFN- γ	– Interferon gama
BLC	– Quimioatrativo de linfócitos B	NK	– Natural killer
TNFR	– Receptor de fator de necrose tumoral		
FASL	– Ligante Fas		
MEC	– Quimiocina epitelial associada à mucosa		

Uma falha da programação da célula B ocorre através de vários mecanismos relacionados com a metilação do DNA, com a inibição do fator de transcrição E2A por proteínas ABF-1 e Id2, com a perda da expressão PU.1 associada com a transcrição defeituosa do gene da imunoglobulina, com a regulação baixa do BOB.1/OBF.1 e do OCT-2 e regulação alta do NOTCH1, que representa um mediador negativo da programação da célula B. Paralelamente, ocorre uma regulação alta das proteínas das linhagens de células não B (BANERJEE, 2012).

Compreender esses mecanismos da reprogramação fenotípica das células de Reed-Stenberg/Hodgkin e sua atribuição na patogênese do LH clássico mostra-se tão relevante (KÜPPERS, 2009).

As células LP são procedentes de células B ativadas por antígenos do centro germinativo, expressando rearranjo clonal do gene de imunoglobulina, proteína BCL6 e GCET1 – uma serpina associada ao centro germinativo da célula B. Apesar das células LP preservarem características das células B, também apresentam perda seletiva fenotípica das células B, tais como a baixa regulação de CD19, CD37, PAG e LCK (BANERJEE, 2012).

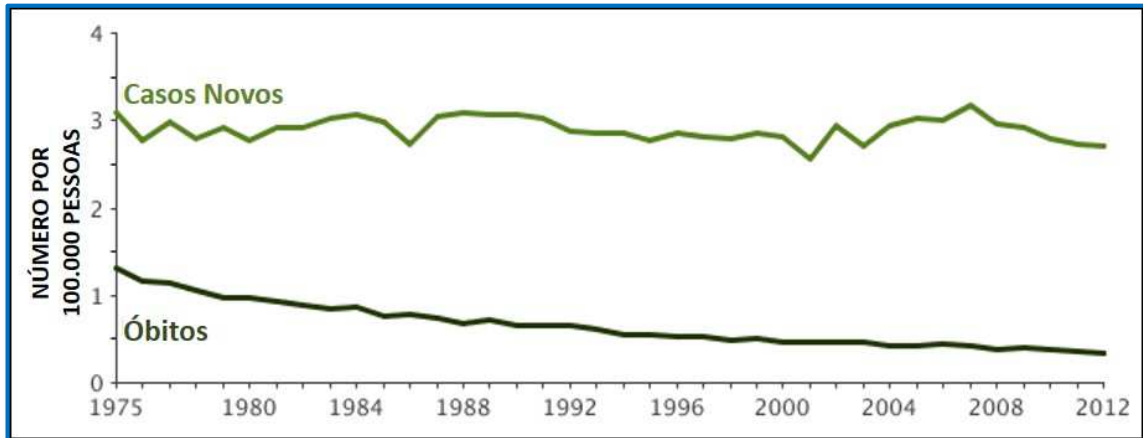
Mutações e alterações estruturais genéticas envolvidas nas vias de ativação do fator nuclear Kappa B (NF-kappa B) e da via de sinalização JAK-STAT (*Janus Kinase – Signal Transducer and Activator of transcription*), como ganhos cromossômicos, superexpressão de genes e inativações de genes supressores de tumor, têm sido descritas e cada vez mais estudadas na patogênese do Linfoma de Hodgkin (JOOS et al., 2002).

3.3 EPIDEMIOLOGIA E ETIOPATOGENIA

O Linfoma de Hodgkin é uma neoplasia rara – representou 0,5% de todos os casos novos (9.050) de câncer em 2015. Apresentou incidência de 2,7 por 100 mil pessoas e o número de óbitos indicou 0.4 por 100 mil pessoas em 2015, entre homens e mulheres, conforme Figura 2. A sobrevida global em 5 anos é de 85,9%. Para doença localizada, a sobrevida é de 91%. Dados do Instituto Nacional do

Câncer dos Estados Unidos da América (EUA) indicam que a média de idade de diagnóstico é 38 anos e de óbito é 65 anos (HOWLADER et al., 2014).

Figura 2 – Casos novos e óbitos de Linfoma de Hodgkin por 100.000 pessoas nos Estados Unidos da América, período de 1975 a 2012



Fonte: Adaptado de HOWLADER et al., 2014 (tradução nossa)

Em países industrializados, verifica-se uma distribuição etária bimodal, evidenciando um primeiro pico na terceira década e um segundo pico após os 50 anos. Acomete mais frequentemente homens do que mulheres entre todos os subtipos, exceto para o subtipo esclerose nodular, que apresenta incidência similar em relação ao sexo (THOMAS et al., 2002).

A estimativa brasileira de casos novos para o ano de 2016 foi de 1.460 casos em homens e 1.010 em mulheres (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, c1996-2016). A taxa de cura nas últimas quatro décadas aumentou significativamente com os avanços em radioterapia e quimioterapia. Atualmente, mais de 80% de todos os pacientes diagnosticados com LH, com menos de 60 anos, são possíveis de cura (ANSELL, 2014).

Estudos epidemiológicos sugerem a relação com um provável agente infeccioso como causa potencial do Linfoma de Hodgkin (MUELLER, 1992). Fatores de risco familiares, exposições virais e imunossupressão estão correlacionados. Além disso, irmãos do mesmo sexo de pacientes portadores de Linfoma de Hodgkin possuem dez vezes maior risco de desenvolver a doença (ANSELL, 2014).

Porém, mesmo que fatores familiares possam sugerir uma causa genética para o LH, uma resposta imunológica anormal à infecção também pode estar envolvida em sua patogênese (WEISS et al., 1987).

Outro dado importante consiste no fato de que, pacientes com história de mononucleose relacionada ao EBV quando adultos jovens apresentam três a quatro vezes maior risco de desenvolver LH (risco relativo, 4,0; intervalo de confiança 95%, 3.4 a 4.5). A média estimada do tempo de incubação da mononucleose ao desenvolvimento do Linfoma de Hodgkin EBV-positivo foi de 4,1 anos (HJALGRIM et al., 2003).

O genoma do EBV foi identificado nas células tumorais do LH (células de Reed-Sternberg), em vários estudos, constatando uma nova compreensão da biologia da doença. Importante notar que, embora o EBV se apresente em aproximadamente 40% de todos os casos de LH – sendo seu papel etiopatogênico reconhecido – detalhes dessa relação permanecem obscuros (ALEXANDER et al., 2000; MOZAHAB, 2013).

Outra associação viral identificada e bem estudada é a infecção pelo HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) e o risco aumentado de pacientes por ele infectados desenvolverem o LH. Nesses casos, verifica-se de forma frequente, no diagnóstico da doença, a manifestação de sintomas B (febre, emagrecimento e sudorese noturna) associados a estádios avançados (ANDRIEU et al., 1993; ANSELL, 2014; TIRELLI et al., 1995).

Existe uma associação de prematuridade, escolaridade materna alta e número reduzido de irmãos com a ocorrência de LH em pacientes mais jovens nos países desenvolvidos (THOMAS et al., 2002).

Ademais, estuda-se a relação do LH com doenças autoimunes. Observa-se, por exemplo, uma maior prevalência da Artrite Reumatoide (AR) associada ao Linfoma de Hodgkin. Importante destacar que, aparentemente, essa associação foi restrita a pacientes portadores de AR que apresentavam tumores EBV-positivos, determinando uma possível indução de replicação viral pela inflamação crônica presente na AR (HOLLANDER et al., 2015).

3.4 DIAGNÓSTICO

3.4.1 Aspectos clínicos

O LH pode surgir em qualquer idade, no entanto, como já citado anteriormente, é mais raro em crianças e possui um pico de incidência em adultos jovens. Predomina no sexo masculino em uma relação de 2:1. A maioria dos pacientes apresenta-se ao diagnóstico com aumento assimétrico de linfonodos periféricos, indolores, firmes e de consistência elástica, principalmente de topografia supradiafragmática. A linfadenopatia cervical está envolvida em 60 a 70% dos casos; axilar em cerca de 10 a 15% e inguinal em 6 a 12%. O acometimento retroperitoneal é menos frequente e diagnosticado por tomografia computadorizada (TC), na maioria dos casos. Embora o acometimento de linfonodos regionais seja mais comum, o LH pode progredir por contiguidade através do sistema linfático e também pode atingir locais extranodais, como baço (esplenomegalia em 50% dos casos), fígado, pulmões, medula óssea, ossos, trato gastrointestinal e cérebro. Ocorre envolvimento mediastinal inicial em 10% dos casos, mais característico no tipo Esclerose Nodular e, particularmente, em mulheres jovens. Derrame pleural e obstrução de veia cava superior podem estar presentes. LH cutâneo manifesta-se como complicação tardia em 10% dos casos. Sintomas constitucionais, como febre (contínua ou cíclica, em 30% dos casos), sudorese profusa noturna e emagrecimento, são observados em aproximadamente 1/3 dos pacientes. Também pode ocorrer prurido intenso em 25% dos casos. Há relatos, por alguns pacientes, de dor em regiões de doença, induzida por ingesta alcoólica (ANSELL, 2014; HOFFBRAND; MOSS, 2013).

3.4.2 Aspectos hematológicos e bioquímicos

Anemia normocítica e normocrômica é um achado comum. A insuficiência medular com anemia leucoeritroblástica por infiltração medular é uma manifestação incomum na doença incipiente. A neutrofilia apresenta-se em 1/3 dos casos e a eosinofilia é frequente. A linfopenia relaciona-se com a doença avançada. A

contagem plaquetária é normal ou alta em fases iniciais e baixa em fases tardias. Os valores de proteína C reativa (PCR) e velocidade de hemossedimentação (VHS) normalmente apresentam-se aumentados. Em 30 a 40% dos casos, observa-se aumento da desidrogenase láctica (LDH) ao diagnóstico (HOFFBRAND; MOSS, 2013).

3.4.3 Aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos

Para o adequado diagnóstico do Linfoma de Hodgkin é necessária a biópsia excisional de um linfonodo ou, raramente, de um sítio extranodal envolvido. É importante salientar que pode ocorrer envolvimento de linfonodos inflamatórios associados a linfonodos patológicos, por isso, a escolha do linfonodo a ser biopsiado deve ser bem avaliada. Linfonodos inguinais, por exemplo, manifestam mais alterações inflamatórias e, dessa forma, deve ser evitado como escolha para o diagnóstico histopatológico. O método de citometria de fluxo de material por aspiração não é adequada para o LH devido a amostra tumoral possuir reduzidas células malignas de RS e predominante fundo inflamatório, que pode resultar em um diagnóstico falso “reativo” associado a um resultado de aspiração por agulha fina falso negativa. As técnicas de imuno-histoquímica e citogenética são as mais adequadas para o diagnóstico e classificação. As células de RS não são específicas para o LH e podem estar presentes na mononucleose infecciosa, em carcinomas e sarcomas. Histologicamente, o LH clássico diferencia-se dos outros linfomas, pela presença das células bi ou multinucleadas com citoplasma abundante (células de Reed-Sternberg), envolvidas por uma resposta inflamatória reacional que compreende linfócitos, histiócitos, granulócitos, eosinófilos e células plasmáticas. Em adição ao critério anatomopatológico, a avaliação imuno-histoquímica das células de RS e suas variantes apresenta-se necessária, a fim de uma adequada classificação do LH (GREER et al., 2014).

O perfil imuno-histoquímico apresenta-se sintetizado no Quadro 1.

Quadro 1 – Perfil imuno-histoquímico do Linfoma de Hodgkin

Marcador	LH clássico	Marcador	LH clássico
CD30	+	BOB.1	-
CD15	+/-	OCT-2	..**
CD45	-/+	PU.1	-
CD20	-/+	BCL-2	-/+
CD79a	-/+	HLA-DR	+
CD21	-	MAL protein	-/+
CD10	-	BCL-6	-
CD68	-	MUM1/IRF4	+
CD3	-	Marcadores de célula T	-/+
CD2	-	Ig	-
CD43	-	ALK	-
PAX5/BSAP	+*	LMP-1	+/-

Fonte: Adaptado de GOBBI et al., 2013; SWERDLOW et al., 2008 (tradução nossa)

Notas: + Todos os casos são positivos +/- Maioria dos casos são positivos
 -/+ Minoria dos casos são positivos - Todos os casos são negativos
 * Mais de 10% pode ser negativo ** Expressão forte em 10% dos casos

3.5 CLASSIFICAÇÃO

3.5.1 Aspectos históricos da classificação histológica

Desde a sua primeira descrição, a nomenclatura do LH é confusa, devido à diversidade de aspectos histológicos. Nas primeiras décadas do século XX, vários estudos para subdividir histologicamente o LH, foram realizados. Em 1936, Rosenthal foi o primeiro a sugerir que a proliferação linfocítica associava-se a um melhor prognóstico, enquanto que a depleção linfocítica sugeriria um pior prognóstico (FONSECA JÚNIOR, 2008).

Jackson Jr. e Parker, em 1944, criaram a primeira classificação de impacto para o LH. Subdividiram a doença em três grupos: paraganuloma – também denominado de “Doença de Hodgkin inicial” –, granuloma e sarcoma. O grupo paraganuloma caracterizava-se por pequena quantidade de células tumorais associada a uma intensa infiltração por linfócitos reacionais; o grupo sarcoma

apresentava maior número de células tumorais associada a um pequeno número de linfócitos reacionais e aspecto fibrótico do retículo; e o grupo granuloma englobava o restante dos casos (JACKSON JR; PARKER, 1944).

A dificuldade na classificação de Jackson e Parker era a maior concentração de diagnósticos entre os granulomas, grupo que compreendia 80% dos casos e manifestava evoluções clínicas e prognósticos diversos. Diante disso, Smetana e Cohen, em 1956, destacaram que os casos do grupo granuloma, com esclerose linfonodal acentuada, expressavam um melhor prognóstico, propondo uma possível subdivisão desse grupo (SMETANA; COHEN, 1956).

A seguir, Lukes propõe uma nova classificação histológica, fundamentada no predomínio dos achados histológicos, visando uma melhor relação entre quadro histológico e prognóstico (LUKES, 1964). Em 1966, Lukes e Butler subdividiram a doença em seis grupos: linfocítico e/ou histiocítico nodular; linfocítico e/ou histiocítico difuso; esclerose nodular; celularidade mista; fibrose difusa e reticular, agrupando critérios histopatológicos de diagnóstico e classificação segundo aspectos previamente definidos (LUKES; BUTLER, 1966).

Estudos posteriores asseveraram os mesmos dados de prevalência entre esses grupos histológicos mencionados (CROSS, 1969).

Na cidade de Rye, em Nova Iorque, ainda no ano de 1966, realizou-se uma conferência sobre a DH, patrocinada pela Sociedade Americana de Câncer e pelo Instituto Nacional do Câncer, em que foi recomendada uma nova classificação baseada nos trabalhos de Lukes e seus colaboradores, denominada de Classificação de Rye. Foi proposta uma divisão simplificada em quatro grupos, de acordo com a expressão histológica: predomínio linfocitário – que agrupou os subtipos nodular e difuso –, esclerose nodular, celularidade mista, depleção linfocitária – que agrupou os subtipos reticular e fibrose difusa (KELLER et al., 1968).

A classificação de Rye ainda apresentava falhas quanto à interpretação morfológica e, por isso, estudos posteriores procuravam relacionar a histologia com outros caracteres como prognóstico, idade, sexo, etnia, envolvimento mediastinal e metástases ósseas (COHEN, C.; HAMILTON, 1980; FRANSSILA; KALIMA; VOUTILAINEN, 1967).

O aprimoramento terapêutico da DH na década de 1980 proporcionou uma evolução de seu prognóstico e, em decorrência da utilização dos métodos imuno-histoquímicos, foi possível demonstrar que o fenótipo das células neoplásicas

da DH não era uniforme. A maioria dos casos apresentava expressão dos antígenos CD30 e CD15, mas alguns apresentavam expressão do CD20, um antígeno de linfócito B, na ausência de CD30 e CD15 (FONSECA JÚNIOR, 2008).

Após tais observações, em 1993, na Alemanha, um grupo de 19 hematopatologistas experientes em linfoma (*International Lymphoma Study Group*), publicou uma proposta denominada REAL – acrônimo de *Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms* –, que incluía uma classificação para a DH e a modificação do nome para Linfoma de Hodgkin, já que a origem linfocitária das células de Reed-Sternberg e Hodgkin foi reconhecida. O LH foi dividido em duas entidades distintas: LH clássico (CD30 e CD15 positivos e CD20 negativos) e LH predomínio linfocitário nodular (CD20 positivo e rara expressão para CD30). O LH clássico foi subdividido em: Esclerose Nodular (EN), Celularidade Mista (CM) e Depleção Linfocitária (DL). O LH Rico em Linfócitos difuso (RL) ficou designado como uma entidade provisória (HARRIS et al., 1999).

A OMS, em 2000, revisou e homologou a classificação REAL. O subtipo histológico, rico em linfócitos, deixou de ser uma classificação provisória (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000).

Em 2008, essa classificação foi revisada e publicada pela OMS e prossegue seu uso nos dias atuais (CAMPO et al., 2011).

O Quadro 2 exhibe as diversas classificações cronológicas do Linfoma de Hodgkin.

Quadro 2 – Classificações do Linfoma de Hodgkin

Classificação de Jackson Jr e Parker	
	Paragranuloma Granuloma Sarcoma
Classificação de Lukes e Butler	
	Linfocítico e/ou histiocítico, nodular Linfocítico e/ ou histiocítico, difuso Esclerose nodular Celularidade mista Fibrose difusa Reticular
Classificação de Rye	
	Predominância linfocítica (nodular e difuso) Depleção linfocitária (reticular e fibrose difusa) Celularidade mista Esclerose nodular
Classificação REAL (<i>Revised European-American Lymphoma</i>)	
Linfoma de Hodgkin Predominância linfocítica nodular	
Linfoma de Hodgkin Clássico	Esclerose nodular Celularidade mista Depleção linfocitária
	Rico em linfócitos difuso como entidade provisória
Classificação pela OMS (Organização Mundial de Saúde) de 2000, 2008, 2016	
Linfoma de Hodgkin Predominância linfocítica nodular	
	Linfoma de Hodgkin clássico Esclerose nodular Celularidade mista Depleção linfocitária Rico em linfócitos

Fonte: A autora

Em 2016, uma revisão dessa classificação da OMS de 2008 apresenta-se em processo de publicação. Os subtipos histológicos para o LH não sofreram modificações. Atualizações sobre padrões de crescimento variantes e transformações histológicas para o LHPLN foram reportadas. Para o LH clássico Rico em Linfócitos, foram reconhecidas características intermediárias entre o LHPLN e outros tipos de LH clássico (SWERDLOW et al., 2016).

3.5.2 Linfoma de Hodgkin Clássico

Correspondendo a 95% de todos os casos de LH, caracteriza-se por células de Reed-Sternberg bi ou multinucleadas e células de Hodgkin (variantes mononucleares) envolvidas por um ambiente inflamatório. As células neoplásicas são derivadas de células B maduras do centro germinativo em mais de 98% dos casos de LH clássico. Em casos raros, são derivadas de células T periféricas (póstímicas). As células de RS são positivas para o CD30 em quase todos os casos e 75 a 85% são positivos para o CD15. Usualmente são negativos para o CD45 e constantemente negativos para a cadeia J, CD75 e marcadores específicos de macrófagos. O CD20 pode ser detectado em 30 a 40% dos casos, mas normalmente é verificado em número reduzido de células neoplásicas. Expressa em 95% dos casos, uma proteína ativadora específica de célula B, a PAX 5. O fator transcrito específico de células plasmáticas IRF4/MUM1 é fortemente positivo nas células de RS, enquanto o CD138, que corresponde à molécula de adesão associada às células plasmáticas, é consistentemente ausente. O fator transcrito OCT-2 e o seu coativador BOB.1 estão ausentes em 90% dos casos. As células de RS apresentam rearranjo clonal no gene de imunoglobulina em 98% dos casos e rearranjo clonal no gene de receptor de célula T em raros casos. O EBV associa-se com a patogênese do LH clássico, sendo mais frequentemente verificado no subtipo celularidade mista – em aproximadamente 75% dos casos – e menos encontrado no subtipo esclerose nodular – 10 a 40% dos casos (HUMMEL et al., 1992; SCHWARTING et al., 1989; SWERDLOW et al., 2008; ZUKERBERG et al., 1991).

3.5.2.1 Subtipos histológicos do Linfoma de Hodgkin Clássico

3.5.2.1.1 Esclerose nodular

Esse subtipo histológico é definido por bandas de colágeno que circundam pelo menos um nódulo e células de RS e de Hodgkin apresentando morfologia lacunar. Representa 70% dos casos de LH clássico, sendo mais comum em regiões com *status* socioeconômico maior. A incidência é similar em relação ao sexo e o pico de idade entre 15 a 34 anos. Envolvimento mediastinal ocorre em 80% dos casos, ósseo em 5%, pulmonar e/ou esplênico em 8 a 10%, hepático em 2% e de medula óssea em 3%. A maioria dos pacientes apresenta-se em estágio II de Ann Arbor. É o subtipo de melhor prognóstico. Massa mediastinal é um fator de prognóstico adverso (MORTON et al., 2006; SHIMABUKURO-VORNHAGEN et al., 2005; SWERDLOW et al., 2008).

3.5.2.1.2 Celularidade mista

É um subtipo de LH clássico caracterizado histologicamente por células de RS dispersas em um fundo inflamatório difuso e levemente nodular, sem fibrose esclerosante nodular associada. Tumores não caracterizados em outros subtipos são classificados como celularidade mista. Compreende 20 a 25% dos casos de LH clássico. A média de idade ao diagnóstico é de 38 anos e 70% são do sexo masculino. É o tipo mais frequente encontrado em pacientes infectados pelo HIV e em países em desenvolvimento. Acometimento mediastinal é incomum e linfonodos periféricos são mais envolvidos. O baço é implicado em 30% dos casos, medula óssea em 10% e fígado em 3%. A presença de sintomas B é frequente (SHIMABUKURO-VORNHAGEN et al., 2005; SWERDLOW et al., 2008).

3.5.2.1.3 Rico em linfócitos

Caracteriza-se histologicamente por células de Hodgkin e de RS dispersas em um fundo nodular ou menos frequente, celular difuso, de pequenos linfócitos e com ausência de eosinófilos e neutrófilos. Este subtipo pode ser confundido com o LH predominância linfocítica nodular. Compreende 5% dos casos de LH clássico. Predomina no sexo masculino e a idade ao diagnóstico é maior em relação aos outros subtipos. Acomete linfonodos periféricos e envolvimento mediastinal é incomum. A presença de sintomas B é rara e a maioria dos pacientes apresenta-se em estágio I ou II de doença. A sobrevida livre de progressão é ligeiramente melhor em relação aos outros subtipos (DIEHL et al., 1999; SHIMABUKURO-VORNHAGEN et al., 2005; SWERDLOW et al., 2008).

3.5.2.1.4 Depleção linfocitária

É um subtipo de LH caracterizado morfológicamente por predominância de células de RS e Hodgkin, associada à depleção de linfócitos não neoplásicos. É o mais raro subtipo de LH clássico, correspondendo a menos de 1% dos casos. A média de idade ao diagnóstico é de 30 a 37 anos e 60 a 75% dos casos são do sexo masculino. Associa-se, frequentemente, com infecção pelo HIV. Acomete, preferencialmente, linfonodos retroperitoneais, órgãos abdominais e medula óssea. Apresenta-se clinicamente ao diagnóstico em estágios avançados de doença e mais comumente com sintomas B em relação aos outros subtipos (SWERDLOW et al., 2008; VASSALLO et al., 2005).

3.5.3 Linfoma de Hodgkin predominância linfocítica nodular

O Linfoma de Hodgkin predominância linfocítica nodular (LHPLN) é uma neoplasia monoclonal de células B caracterizada histologicamente por uma proliferação nodular ou nodular e difusa de células neoplásicas largas, com núcleos

hiperlobulados, conhecidas como células de predominância linfocítica (LP) ou *popcorn*, linfócitos e histiócitos. As células LP são designadas como variantes das células de RS. O LHPLN representa, aproximadamente, 5% de todos os linfomas de Hodgkin. Os pacientes são predominantemente do sexo masculino e a idade ao diagnóstico é de 30 a 50 anos. Envolve normalmente linfonodos cervicais, axilares e inguinais. O acometimento de medula óssea, baço e mediastino é raro. A maioria dos pacientes apresenta linfadenopatia periférica localizada. As células LP são positivas para CD20, CD79a, CD75, BCL6 e CD45 em praticamente todos os casos. A cadeia J está presente na maioria dos casos. As células LP apresentam positividade para IgD em 9 a 27% dos casos e perdem a expressão do CD30 e CD15 em quase todos os casos. As células LP possuem rearranjo clonal no gene de imunoglobulina e não apresentam infecção latente pelo vírus do EBV. A manifestação clínica do LHPLN é lenta e demonstra recaídas frequentes. O prognóstico do estágio I e II é muito bom, com sobrevida global em 10 anos acima de 80% dos casos. Verifica-se uma relação clonal entre LHPLN e Linfoma difuso de grandes células e, em alguns casos, a morfologia do LHPLN é semelhante à morfologia do Linfoma difuso de grandes células, rico em células T/Histiócitos (ANAGNOSTOPOULOS et al., 2000; SWERDLOW et al., 2008).

3.6 ESTADIAMENTO E AVALIAÇÃO DE RESPOSTA

O sistema padrão de estadiamento usado para o LH foi proposto pela conferência de Ann Arbor, no ano de 1971, e modificada no encontro de Cotswolds, em 1988 (Quadro 3). Essa classificação de estadiamento foi formulada para proporcionar uma decisão terapêutica baseada em uma apresentação inicial da doença. O número de sítios de envolvimento e a presença de doença acima ou abaixo do diafragma são avaliados pelo sistema de estadiamento em quatro estadios distintos (CARBONE et al., 1971; LISTER et al., 1989).

Quadro 3 – Sistema de estadiamento de Ann Arbor

Estadio I	Comprometimento de uma única região linfonodal ou comprometimento de uma única estrutura linfóide como baço, timo e anel de Waldeyer (I) ou sítio extralinfático (IE).
Estadio II	Comprometimento de duas ou mais regiões linfonodais ou estruturas linfóides do mesmo lado do diafragma (II) ou com comprometimento limitado de órgão ou tecido extralinfático contíguo (IIE). O número de regiões anatômicas envolvidas deve ser indicado subscrito (por exemplo, II ₃). Linfonodos mediastinais são considerados como única região linfonodal.
Estadio III	Comprometimento de regiões linfonodais ou estruturas linfóides em ambos os lados do diafragma (III), podendo incluir o baço (III _S) e/ou comprometimento limitado de órgão ou sítio extralinfático contíguo (IIIE, IIIE _S). Estadio III ₁ – envolvimento nodal esplênico, hilar, celíaco ou portal. Estadio III ₂ – envolvimento nodal para-aórtico, ilíaco e/ou mesentérico.
Estadio IV	Envolvimentos múltiplos ou disseminados de um ou mais órgãos ou tecidos extralinfáticos, com ou sem comprometimento linfático. Envolvimento localizado de fígado ou medula óssea é também considerado estadio IV.
Doença extranodal	Sítios extranodais dos estadios I-III: envolvimento extralinfático único por extensão direta limitada de um linfonodo ou sítio nodal adjacente. Envolvimento extranodal deve ser identificado por um símbolo (M: medula óssea, L: pulmão, D: pele, H: fígado, P: pleura, O: osso).
Sintomas sistêmicos	Febre > 38° sem outra causa por 3 dias consecutivos, sudorese noturna e perda inexplicada de peso >10% do peso corporal. Presença desses sintomas: B, ausência: A.
Doença Bulky	Massas palpáveis ou abdominais são definidas como Bulky quando maior dimensão ≥ 10 cm. Massa mediastinal é definida como Bulky se na radiografia de tórax em PA (posteroanterior), a largura máxima é > 1/3 do diâmetro transversal interno do tórax no nível da vértebra T5-T6.

Fonte: Adaptado de GOBBI et al., 2013 (tradução nossa)

O estadiamento modificado de Cotswold (Quadro 4) incorporou a TC na avaliação, por introduzir o X para doença Bulky e a CRu (Complete remission unconfirmed) para a massa residual pós tratamento sugestiva de fibrose (LISTER et al., 1989).

Quadro 4 – Estadiamento de Ann Arbor Cotswolds-modificada

Estadio	Envolvimento/ características
I	Região linfonodal única (I) ou um sítio extralinfático (IE).
II	Duas ou mais regiões linfonodais no mesmo lado do diafragma (II) ou extensão local extralinfática mais uma ou mais regiões linfonodais do mesmo lado do diafragma (IIE).
III	Regiões linfonodais em ambos os lados do diafragma (III), que pode ser acompanhado por extensão local extralinfática (IIIE).
IV	Envolvimento difuso de um ou mais órgãos extralinfáticos.
Sufixo	
A	Ausência de sintomas B.
B	Presença de pelo menos um dos seguintes: perda inexplicada de peso > 10% basal durante 6 meses antes do estadiamento; febre inexplicada recorrente > 38°C; suores noturnos recorrentes.
X	Tumor Bulky é definido como massa única ≥ 10 cm no maior diâmetro ou massa mediastinal acima de 1/3 do diâmetro máximo transversal transtorácico medido em radiografia de tórax em posição posteroanterior.

Fonte: Adaptado de T. C. KWEE; R. M. KWEE; NIEVELSTEIN, 2008 (tradução nossa)

A identificação das células de RS em amostras de sangue periférico e medula óssea, através da análise molecular, por PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), foi descrita em estudos prévios. Marcadores celulares das células de RS do diagnóstico permaneceram os mesmos nas células de RS da recidiva. Dessa forma, questionou-se sobre a importância da análise molecular, como avaliação de Doença Residual Mínima nos pacientes de Linfoma de Hodgkin em remissão. Contudo, essa hipótese prossegue em investigação e não é aplicada na rotina clínica (GOBBI et al., 2013).

A avaliação completa inclui uma história clínica detalhada, presença e duração de sintomas sistêmicos, exame físico minucioso, exames hematológicos e bioquímicos, exames de imagem como radiografias e tomografias e biópsia de medula óssea. A biópsia de medula óssea é considerada necessária em pacientes com sintomas B e/ou estadio clínico avançado e/ou em pacientes portadores de lesões ósseas, dor óssea, hipercalcemia e elevação de fosfatase alcalina (VASSILAKOPOULOS et al., 2005). Se a biópsia de medula óssea pode ser substituída por PET/TC FDG-F (Tomografia por emissão de pósitrons com

fluorodeoxiglicose marcada com flúor acoplada à tomografia computadorizada), permanece ainda uma questão de debate. A sensibilidade desse método é maior que a TC a fim de identificar doença extranodal e nodal primária na classificação de estadiamento (MOULIN-ROMSEE et al., 2010).

O primeiro critério de resposta universalmente aceito para LH foi publicado, em 1999, pelo *National Cancer Institute Working Group*, sendo, revisado, em 2007, pelo *International Working Group (IWG)*, que incorporou o *Positron Emission Tomography (PET)* e a análise da medula óssea por citometria de fluxo e imuno-histoquímica, na avaliação de resposta, eliminando a remissão completa não confirmada (RCu). Os critérios de resposta de Cheson e outros (2007), apresentam-se explanados no Quadro 5 (CHESON et al., 1999; CHESON et al., 2007).

Quadro 5 – Definição de resposta do linfoma pelos critérios de Cheson

Resposta	Definição	Doença nodal/fígado/baço/medula óssea
RC	Ausência de evidência de doença	a) Em PET inicial (+), pode permanecer massa residual se PET (-); b) Em PET inicial não ávido ou (-), TC final normal. Baço/fígado não palpáveis. Ausência de nódulos. MO sem infiltração, IHQ (-) sem dúvida morfológica.
RP	Regressão de doença mensurável e ausência de novas lesões	Redução $\geq 50\%$ das lesões mensuráveis. Ausência de novas lesões. Persistência de positividade em lesões iniciais ávidas ao PET. Lesões iniciais não ávidas ao PET ou PET (-): regressão à TC. Redução $\geq 50\%$ em nódulos hepáticos e esplênicos, sem aumento. MO: irrelevante se positivo antes. Especificar tipo histológico.
DE	Falência em atingir RC/RP ou doença estável	Lesões iniciais ávidas ao PET: manutenção da positividade, sem novas lesões. Lesões não ávidas ao PET: sem mudança no tamanho à TC.
Recidiva/DP	Qualquer nova lesão ou aumento de lesão prévia $\geq 50\%$	Surgimento de lesão nova $> 1,5$ cm ou aumento $\geq 50\%$ em LN prévio ou aumento $\geq 50\%$ em LN prévio > 1 cm. Novas lesões ávidas ao PET se PET (-) prévio. Aumento $> 50\%$ de lesões em fígado e baço. Surgimento ou recidiva de infiltração medular.

Fonte: Adaptado de CHESON et al., 2007 (tradução nossa)

Legenda:

RC – Remissão Completa

DE – Doença Estável

PET – Tomografia por Emissão de Pósitrons

(-) – Negativo

MO – Medula Óssea

LN – Linfonodo

DP – Doença em Progressão

(+) – Positivo

RP – Remissão Parcial

TC – Tomografia Computadorizada

IHQ – Imuno-histoquímica

Após extensa experiência com os critérios de 2007 e o progresso científico, particularmente, das técnicas de imagem, um novo encontro com especialistas foi realizado a fim de revisar e atualizar os critérios. As recomendações atuais para avaliação inicial, estadiamento e critérios de resposta para o Linfoma de Hodgkin, foram definidas na 11ª Conferência Internacional de Linfomas em Lugano, Suíça, em Junho de 2011. Na classificação de Lugano, a Tomografia Computadorizada/PET-FDG foi formalmente incorporada no estadiamento padrão dos Linfomas ávidos por FDG. Os sufixos A ou B do estadiamento de Ann-Arbor continuam sendo utilizados para LH. Também foi determinado que a biópsia de medula óssea (BMO) não é mais indicada no estadiamento de rotina do LH, desde que realizado o PET-TC. Esse deverá ser empregado para avaliar resposta utilizando a escala de 5 pontos (5-PS). O produto dos diâmetros perpendiculares de um único linfonodo pode ser usado para identificar doença progressiva. A designação X para doença Bulky é dispensável, porém, a documentação do maior diâmetro do tumor é necessária (CHESON et al., 2014).

A recomendação atual é o uso da escala 5-PS no PET-TC para avaliação de resposta. A escala de 5 pontos para avaliação visual do PET-TC é também designada como Escore de Deauville (*DS: Deauville score*). Tem por finalidade, a graduação da captação do FDG comparada com a captação fisiológica no mediastino e no fígado (Quadro 6). Os escores 1 ou 2 são considerados como respostas metabólicas completas, tanto no PET interino como no PET do final do tratamento. O escore 3 configura bom prognóstico no final do tratamento com a terapia padrão no LH. Os escores 4 ou 5 com evidência de redução ao PET inicial, como resultado do PET interino, sugerem doença sensível à quimioterapia, representando resposta metabólica parcial. Entretanto, se no interino, evidenciar escore 4 ou 5, sem redução ao PET inicial ou descrição de novas lesões, esse resultado exprime falência de tratamento (Quadro 7). Para o final do tratamento, o escore 4 ou 5 caracteriza falência terapêutica (CHESON et al., 2014).

Quadro 6 – Escore de Deauville: escala de 5 pontos para tomografia por emissão de pósitrons com fluorodeoxiglicose marcada com flúor acoplada à tomografia computadorizada

Captação	Pontos/Escore
Ausência de captação	1 (DS1)
Captação ≤ mediastino	2 (DS2)
Captação > mediastino mas ≤ fígado	3 (DS3)
Captação moderadamente maior comparada ao fígado	4 (DS4)
Captação marcadamente* maior comparada ao fígado e/ou lesões novas	5 (DS5)

Fonte: A autora

Nota: * Marcadamente, captação 2 a 3 vezes maior que a captação máxima do fígado

Quadro 7 – Recomendações de Lugano para avaliação de resposta à tomografia por emissão de pósitrons

Categoria	Resposta metabólica baseada no PET-TC
RMC	Escore 1, 2, 3* em sítios nodais ou extranodais com ou sem massa residual usando o 5-PS.
RMP	Escore 4 ou 5, com redução de captação comparada com o inicial e massa residual de qualquer tamanho. No PET interino: estes achados sugerem que doença está respondendo. No PET do final do tratamento: estes achados indicam doença residual. Medula óssea: captação medular residual > medula normal, mas reduzida comparada com a inicial (permitida alteração difusa devido à quimioterapia). Se alteração focal persistente em medula com resposta nodal, deve ser considerada a avaliação por RNM, biópsia ou rastreamento após intervalo.
RMN**	Escore 4 ou 5 sem alteração significativa na captação do PET inicial para o PET interino ou PET do final do tratamento.
DMP	Escore 4 ou 5 com aumento na captação em relação ao PET inicial e /ou novo foco FDG-ávido no PET interino e no PET do final do tratamento, consistente com linfoma.

Fonte: Adaptado de CHESON et al., 2014 (tradução nossa)

Legenda:

PET-TC – Tomografia por emissão de pósitrons-tomografia computadorizada	DMP – Doença Metabólica Progressiva
RMC – Resposta Metabólica Completa	5-PS – Escala dos 5 pontos (do inglês, 5-point scale)
RMP – Resposta Metabólica Parcial	RNM – Ressonância Nuclear Magnética
RMN – Resposta Metabólica Negativa	FDG – Fluorodeoxiglicose

Notas: * Escore 3 em muitos pacientes indica um bom prognóstico com tratamento padrão. Entretanto, estudos envolvendo PET consideram o escore 3 como resposta inadequada para evitar subtratamento.

** Ausência de resposta ou doença estável.

Uma captação fisiológica pelo FDG pode ocorrer em alguns sítios como, por exemplo: anel de Waldeyer, intestino e medula óssea, após quimioterapia, radioterapia ou tratamento com G-CSF (*Granulocyte-colony stimulating factor*). Nesses casos, a RMC pode ser considerada se a captação inicial nos sítios envolvidos não for maior que nos tecidos normais circunjacentes (BARRINGTON et al., 2014).

Um estudo prospectivo recente, com 1.100 pacientes com LH avançado, comparou o PET-TC com a TC no estadiamento. Radiologistas experientes avaliaram as imagens usando a escala dos 5 pontos (Escore de Deauville). Um grupo de pacientes foi estadiado por avaliação clínica, TC e biópsia de medula óssea e outro grupo por PET-TC ao diagnóstico (PET0) e após dois ciclos de quimioterapia (PET2). O estadiamento dos dois grupos foi concordante em 80% dos pacientes. PET-TC apresentou maior estadiamento em 14% e menor estadiamento em 6% em relação ao grupo da TC. Os resultados confirmaram o PET-TC como um método moderno de estadiamento do LH e o escore de Deauville como critério forte de avaliação na prática clínica (BARRINGTON et al., 2016).

A resposta à TC permanece indicada para histologias com baixa ou variável avidéz ao PET ou em regiões que esse método não é acessível (CHESON et al., 2014).

A presença de sintomas residuais, na ausência de doença detectável por imagem, não impede a designação de Remissão Completa. Alguns casos apresentam confusão para determinar doença progressiva na presença de alargamentos tumorais inespecíficos, como inflamações associadas. Recomenda-se, portanto, a realização de biópsia ou reavaliação clínica da lesão em, pelo menos, duas semanas e, se confirmar a progressão do tumor, a data da doença progressiva será a da avaliação anterior (CHESON et al., 2014).

Para o LH, após a remissão completa, o *follow-up* proposto pelo IWG, NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) e pela ESMO (*European Society for Medical Oncology*) determina que os pacientes devem ser avaliados clinicamente de três a seis meses durante os primeiros dois anos; a cada seis meses nos próximos três anos e então, anualmente, para monitorar a recaída tardia e os efeitos adversos relacionados ao tratamento. Em adição ao exame clínico, a avaliação laboratorial com hemograma completo, perfil metabólico e LDH é recomendada. PET scan de rotina não deve ser solicitado. A taxa de PET falso positivo é de

aproximadamente 20% e, por isso, a investigação com imagem deve ser realizada por indicação clínica (CHESON et al., 2007; EICHENAUER et al., 2014; NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK, 2016).

Biópsia de tecido residual metabolicamente ativo é recomendada, quando a terapia de resgate for considerada ou um intervalo de rastreamento for indicado diante de uma probabilidade baixa de doença, para decidir acerca da necessidade de instituir tratamento (BARRINGTON et al., 2014).

O PET interino deve ser realizado após administração da quimioterapia e o PET do final do tratamento deve ser efetuado seis a oito semanas da última quimioterapia (mínimo de três semanas) e após doze semanas da última sessão de radioterapia (BARRINGTON et al., 2014).

3.7 FATORES PROGNÓSTICOS

Os fatores prognósticos são variáveis avaliadas a fim de auxiliar no entendimento da heterogeneidade dos resultados e poder prever o resultado clínico de um único paciente. Prever um resultado é importante para evitar um tratamento excessivo e identificar pacientes que podem falhar com um tratamento padrão. Parâmetros clínicos, histopatológicos e laboratoriais são recomendados como valores prognósticos e identificam pacientes de risco. Características relacionadas ao tumor, ao paciente e ao tratamento podem influenciar no prognóstico (CUCCARO et al., 2014; GOBBI et al., 2013; ZANDER; WIEDENMANN; WOLF, 2002).

A classificação de Ann Arbor é aceita internacionalmente e define dois grupos prognósticos: doença limitada (estádios I e II) e doença avançada (estádios III e IV). O estágio II, com sintomas sistêmicos (IIB), pode ser incluído como doença limitada desfavorável pelo EORTC (*European Organization for Research and Treatment of Cancer*) ou doença avançada pelo GHSG (*German Hodgkin's Lymphoma Study Group*), de acordo com a política específica dos grupos cooperativos de estudo (GOBBI et al., 2013).

O grupo de doença de estágio limitado é usualmente dividido como favorável ou desfavorável, de acordo com a presença ou ausência de variáveis

prognósticas clínicas e laboratoriais. A categoria doença de estadio limitado desfavorável define um grupo de prognóstico intermediário entre “doença de estadio limitado favorável” e “doença de estadio avançado”. Os fatores de risco para estadio limitado de doença diferenciam entre os grupos cooperativos de estudo de Linfomas de Hodgkin. No grupo EORTC, consideram-se como fatores prognósticos desfavoráveis para estadio limitado: massa Bulky mediastinal (superior a um terço do diâmetro torácico), idade maior ou igual a 50 anos, VHS acima ou igual a 50 mm/h sem sintomas B e acima ou igual a 30 mm/h com sintomas B e envolvimento de quatro ou mais áreas nodais. No grupo GHSG, consideram-se como fatores prognósticos desfavoráveis para estadio limitado (Quadro 8): massa Bulky mediastinal, doença extranodal, VHS acima ou igual a 50 mm/h sem sintomas B e acima ou igual a 30 mm/h com sintomas B e envolvimento de três ou mais áreas nodais (ENGERT et al., 2010; FRANKLIN et al., 2000).

Quadro 8 – Fatores de risco do German Hodgkin’s Lymphoma Study Group para estadio limitado no Linfoma de Hodgkin

Variável	Fatores de risco
Doença Bulky	Massa mediastinal, pelo menos 1/3 do diâmetro máximo torácico
Doença extranodal	Envolvimento localizado de um tecido extralinfático
Envolvimento nodal	Envolvimento de 3 ou mais áreas nodais
VHS	≥ 50 mm/h para estadios IA, IIA e ≥ 30 mm/h para estadios IB, IIB

Fonte: Adaptado de ENGERT et al., 2010 (tradução nossa)

Legenda:

VHS – Velocidade de hemossedimentação GHSG – *German Hodgkin Study Group*

Nota: Desfavorável: presença de pelo menos um fator.

Um estudo multicêntrico, publicado em 1998, definiu um Escore Prognóstico Internacional (IPS) para estadios avançados (Quadro 9). Observou-se, neste estudo, que de todos os fatores possíveis adversos no diagnóstico, sete apresentaram efeito prognóstico independente. O IPS compreende estes sete fatores: idade igual ou superior a 45 anos, sexo masculino, estadio IV, hemoglobina menor que 10,5 g/dl, leucocitose maior ou igual a 15.000/ µl, linfocitopenia (menor

que 8 % de leucócitos totais e/ou contagem absoluta menor que 600 / μ l) e albumina sérica menor que 4 g/dl. Classificam-se os pacientes em IPS favorável (< 4 fatores de risco) e desfavorável (\geq 4 fatores de risco). A presença de cada fator individualmente reduziu em 7% a 8% as taxas de sobrevida livre de eventos ao ano. Os autores também perceberam um grupo distinto de pacientes de alto risco que não puderam ser identificados com base em características clínicas e demográficas rotineiramente demonstradas (HASENCLEVER; DIEHL, 1998).

Quadro 9 – Fatores prognósticos pelo Escore Prognóstico Internacional para estadio avançado no Linfoma de Hodgkin

Variável	Fator adverso	Pontos/Escore
Idade	\geq 45 anos	1
Sexo	Masculino	1
Estadio	IV	1
Hemoglobina	< 10,5 g/dl	1
Leucócitos	\geq 15000/ μ l	1
Linfócitos	< 600/ μ l ou < 8% do total	1
Albumina	< 4 g/dl	1

Fonte: A autora

Notas: IPS favorável: < 4 fatores

IPS desfavorável: \geq 4 fatores

O IPS foi fundamentado na avaliação de aproximadamente 4.600 pacientes portadores de LH avançado. Dados completos foram verificados em 1.600 pacientes. Constatou-se 45% em estadio avançado, 13% em estadio limitado e 22% apresentava Bulky mediastinal ao diagnóstico. Os pacientes do estudo foram tratados previamente ao ano de 1992, com protocolos para LH estadio avançado. A terapêutica instituída foi variável e 75% foram tratados com pelo menos quatro protocolos diferentes que incluíam doxorubicina. MOPP (mecloretamina, oncovin, procarbazina e prednisona) ou outro regime similar foram indicados em 20% dos pacientes. Esses esquemas são, sabidamente, inferiores ao ABVD (doxorubicina, bleomicina, vimblastina, dacarbazina) ou a outros regimes atuais que incluem doxorubicina. Sete parâmetros revelaram significância na análise multivariada e

foram associados independentemente, apontando resultado clínico adverso, como já citado anteriormente (DIEFENBACH et al., 2015; HASENCLEVER; DIEHL, 1998).

Desde a fundamentação do IPS, o aperfeiçoamento terapêutico e suportivo no diagnóstico e na recidiva aprimoraram e, adicionalmente, novas modalidades propedêuticas de imagem – como a Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET) – apresentaram-se mais precisas para determinar o estadiamento e a resposta terapêutica (BIGGI et al., 2013; CHESON et al., 2014; EICH et al., 2010; ENGERT et al., 2010; YOUNES et al., 2012).

O Escore Prognóstico Internacional (IPS-7) é a ferramenta mais utilizada, atualmente, para a estratificação de risco do LH avançado. Todavia, estudos recentes sugerem que o IPS-7 pode não corresponder como escore ideal, devido aos melhores resultados com as terapias modernas. Um estudo publicado, recentemente, avaliou os sete fatores do IPS, em 854 pacientes participantes do *Eastern Cooperative Oncology Group 2496 trial* (E2496). Na análise multivariada, somente dois fatores (idade e estadio) permaneceram significantes para SLP [Sobrevida Livre de Progressão (FFP, do inglês, *Freedom From Progression*)] e três fatores (idade, estadio e nível de hemoglobina) para a Sobrevida Global (SG) (DIEFENBACH et al., 2015).

Portanto, um índice prognóstico alternativo foi elaborado – o IPS-3 – utilizando a idade, o estadio e o nível de hemoglobina. O IPS-3 dividiu os pacientes em quatro grupos de risco. As curvas de SLP e SG foram utilizadas para classificar os pacientes em três grupos de risco (baixo, intermediário e alto), de acordo com o número de fatores de risco: 0-2; 3-4 e ≥ 5 fatores para o IPS-7 e 0; 1-2 e 3 fatores para o IPS-3, respectivamente. A sobrevida livre de progressão em 5 anos pelo IPS-3 foi 83%, 74%, 68% e 63% e a sobrevida global foi 95%, 85%, 75% e 52% para pacientes com 0, 1, 2 e 3 fatores de risco, respectivamente. Os valores originais de *cut-off* foram mantidos devido à análise de outros *cut-offs* não apresentarem diferença nas sobrevidas. Na análise de reclassificação dos riscos, 18% dos pacientes IPS-7 baixo risco foram reclassificados como risco intermediário e 13% dos pacientes IPS-7 risco intermediário foram reclassificados como baixo risco. O IPS-3 superou o IPS-7 para predizer risco na SLP e SG (DIEFENBACH et al., 2015).

O tratamento quimioterápico com dois esquemas (ABVD e Stanford V) representou uma limitação do estudo, devido à incerteza da aplicação do IPS-3 para pacientes tratados com outros regimes (BEACOPP escalonado, brentuximabe

vedotin). Apesar de o estudo englobar um número considerável de pacientes, somente 23 pacientes apresentavam os 3 fatores do IPS-3 e 28 pacientes IPS-7 de alto risco foram definidos como IPS-3 intermediário. O IPS-7, nesses casos, foi melhor preditor para SLP, sem diferença na SG (DIEFENBACH et al., 2015).

Os dados confirmaram que o IPS-7 prossegue como estratificador prognóstico para LH avançado, no cenário atual. Entretanto, a magnitude das diferenças para SLP e SG em pacientes de baixo e alto risco reduziu consideravelmente e esses achados são consistentes com os de outros estudos. Apesar dos tratamentos atuais mais eficazes, os pacientes portadores de LH permanecem evoluindo desfavoravelmente. Fatores prognósticos devem ser incorporados ao IPS-7, a fim de refletir a interação da heterogeneidade biológica do LH com o tratamento. A validação do IPS-3 em outro amplo estudo apresenta-se em desenvolvimento, bem como a incorporação de novos avanços na estratificação de risco do IPS-3 (DIEFENBACH et al., 2015; MOCCIA et al., 2012).

A identificação de fatores prognósticos em pacientes com Linfoma de Hodgkin que apresentaram recaídas ou são refratários mostra-se dificultada devido à variedade de critérios de inclusão utilizados nos estudos. Apesar disso, alguns fatores são associados com um pior resultado, tais como: recaída em sítio primário irradiado, recaída precoce (primeiro ano), doença quimiorrefratária, *performance status* baixo, doença Bulky mediastinal, presença de sintomas B e doença extranodal (JOSTING et al., 2002; ROACH 3rd et al., 1990).

Os fatores prognósticos sintetizados no Quadro 10 apontam que o tempo de recidiva após início da terapia, a doença avançada na recidiva e o *performance status* baixo demonstram ser preditores de um pior desfecho (KURUVILLA; KEATING; CRUMP, 2011).

Quadro 10 – Fatores prognósticos adversos para recidiva e refratariedade no Linfoma de Hodgkin

Grupo de Pacientes	Fator
Recidiva	Tempo para recidiva < 1 ano Estádios III-IV Anemia Sintomas B <i>Status Performance</i> baixo
Refratariedade	Idade > 50 anos Falência em atingir remissão temporária Sintomas B Estádios III-IV <i>Status Performance</i> baixo
TCTH autólogo	Recidiva prévia não tratada Resposta à quimioterapia Albumina sérica baixa Anemia Idade Linfopenia Sintomas B Doença extranodal Tempo de recidiva < 1 ano <i>Status</i> da doença no TCTH Recidiva de doença em sítio prévio irradiado

Fonte: Adaptado de KURUVILLA; KEATING; CRUMP, 2011 (tradução nossa)

Legenda: TCTH – Transplante de células tronco hematopoéticas

O PET-FDG positivo após quimioterapia de resgate e antes do transplante de células tronco hematopoéticas é um fator indicativo de pior prognóstico em pacientes recidivados (CASTAGNA et al., 2009).

A análise semiquantitativa de SUVmax (máximo valor padronizado de captação) acima de 71%, no PET realizado após 2 ciclos de quimioterapia (PET2), apresentou uma maior acurácia em relação à análise do PET baseada na escala visual de 5 pontos. Na análise multivariada desse estudo, utilizou-se o IPS e a SUVmax como covariáveis. A SUVmax do PET2 permaneceu como o único valor preditivo independente na Sobrevida Livre de Progressão (BIGGI et al., 2013; PRESS et al., 2016; RAEMAEKERS et al., 2014; ROSSI et al., 2014).

Avanços na biologia do LH sugerem uma interação das células de Reed-Sternberg/Hodgkin com o microambiente tumoral, influenciando os desfechos clínicos. Expressão de CD68 e CD163 pelos macrófagos associados ao tumor (TAMS) apresenta correlação inferior com a SLP e SG (KAMPER et al., 2011; STEIDL et al., 2010; STEIDL et al., 2012; TAN et al., 2012).

Em uma pesquisa atual, foi descrito um perfil de expressão gênica com 23 genes, que identificou um grupo de pacientes com LH avançado de alto risco (SCOTT et al., 2013).

Outros novos indicadores que demonstram ter significado prognóstico no Linfoma de Hodgkin são a expressão do Epstein-Barr vírus, a proporção sérica de linfócitos-monócitos e a contagem sérica absoluta de monócitos do diagnóstico (KANAKRY et al., 2013; TADMOR et al., 2015).

O Linfoma de Hodgkin clássico é representado por um número pequeno de células de Reed-Sternberg associado a um extenso, porém, ineficaz infiltrado de células imunes/inflamatórias. No LH clássico, modificações no cromossomo 9p24.1/PD-L1/PD-L2 aumentam a expressão de PD-L1 e PD-L2 – ligantes da PD-1 (proteína de morte celular programada) – induzindo transdutores de sinal da via Janus Kinase2 e sinalizando ativadores de transcrição. No entanto, a incidência precisa e o significado prognóstico das alterações da PD-L1 e PD-L2 no LH clássico prosseguem indefinidos. Um estudo publicado recentemente avaliou a expressão da CD274/PD-L1 e a PDCD1LG2/PD-L2 através do método de FISH (*fluorescent in situ hybridization*) em 108 amostras anatomopatológicas de pacientes com diagnóstico recente de LH clássico. Esses pacientes foram tratados com o esquema de quimioterapia Stanford V e foram acompanhados a longo prazo. A frequência e a magnitude das alterações genéticas do 9p24.1, como polissomia, ganho de cópia e amplificação, foram documentadas. As expressões da PD-L1 e PD-L2 foram verificadas através do método de imuno-histoquímica e correlacionadas com as alterações genéticas. A associação entre alterações do 9p24.1 com os parâmetros clínicos e SLP também foi avaliada. O estudo revelou que 97% de todos os pacientes de LH clássico apresentavam alterações concordantes no *locus* da PD-L1 e PD-L2. A expressão imuno-histoquímica aumentada da proteína PD-L1 e alterações genéticas relativas (redução da dissomia da 9p24.1) apresentaram associação. A SLP foi significativamente menor para pacientes portadores de amplificação do 9p24.1 e a incidência dessa alteração genética foi maior em pacientes com LH clássico em estadios avançados. Esses resultados requerem confirmação em outras séries, como por exemplo, em estudos nos quais outros esquemas de tratamento são utilizados. Atualmente, anticorpos monoclonais direcionados ao PD-1 apresentam-se como opção terapêutica em pacientes com LH refratário (ROEMER et al., 2016).

3.8 TRATAMENTO

3.8.1 Tratamento da doença limitada favorável

Quimioterapia (QT) com ABVD seguida de Radioterapia (RT) de campo envolvido é o tratamento padrão para pacientes com LH clássico em estadió limitado, com uma sobrevida acima de 95%. Mesmo os pacientes com doença favorável, o uso de RT isolada associou-se com uma taxa de recaída inaceitável e já não é mais indicada. A combinação de QT e RT em comparação à RT de campo estendido isolada foi superior em vários estudos. A RT com campo reduzido e diminuição de doses foi introduzida progressivamente, a fim de reduzir o risco de morte por complicações, malignidades secundárias e doença cardiovascular (GOBBI et al., 2013).

O estudo alemão HD10, com 1370 pacientes em estadió limitado sem nenhum fator de risco, estabeleceu o novo padrão terapêutico para esse grupo de pessoas. Os quatro braços do estudo foram: ABVD x 4 + 3000 cGy; ABVD x 4 + 2000 cGy; ABVD x 2 + 3000cGy e ABVD x 2 + 2000 cGy. A sobrevida livre de falha de tratamento aos 5 anos foi semelhante na análise do número de ciclos de quimioterapia, o mesmo ocorrendo em relação à dose de radioterapia. A sobrevida global foi semelhante nos quatro braços do estudo. Esses dados favorecem o tratamento com apenas dois ciclos de ABVD seguidos de RT 2000 cGy em campo envolvido, aplicados em pacientes com parâmetros favoráveis como definidos pelo GHSG. Experimentalmente, estuda-se a possível eliminação da RT nesse grupo com base nos resultados do PET-TC após 2 ou 3 ciclos de QT (ARMITAGE, 2010).

O Quadro 11 exemplifica os esquemas de quimioterapia mais usualmente empregados.

Quadro 11 – Protocolos de quimioterapia mais utilizados no Linfoma de Hodgkin

Protocolo/Medicamentos	Dose (mg/m ²)	Dias	Via	Ciclos (dias)
ABVD				
Doxorrubicina	25	1,15	IV	28
Bleomicina	10	1,15	IV	
Vimblastina	6	1,15	IV	
Dacarbazina	375	1,15	IV	
Stanford V				
Doxorrubicina	25	1, 15, 29, 43, 57, 71	IV	
Vimblastina	6	1, 15, 29, 43, 57, 71	IV	
Mecloretamina	6	1, 29, 57	IV	
Vincristina	1,4	8, 22, 36, 50, 64, 78	IV	
Bleomicina	5	8, 22, 36, 50, 64, 78	IV	
Etoposídeo	60	15, 43, 71	IV	
Prednisona	40	Em dias alternados por 12 semanas	IV	
BEACOPP (básico)				
Bleomicina	10	8	IV	21
Etoposídeo	100	1-3	IV	
Doxorrubicina	25	1	IV	
Ciclofosfamida	650	1	IV	
Vincristina	1,4	8	IV	
Procarbazina	100	1-7	VO	
Prednisona	40	1-14	VO	
BEACOPP (escalonado)				
Bleomicina	10	8	IV	21
Etoposídeo	200	1-3	IV	
Doxorrubicina	35	1	IV	
Ciclofosfamida	1250	1	IV	
Vincristina	1,4	8	IV	
Procarbazina	100	1-7	VO	
Prednisona	40	1-14	VO	

Fonte: Adaptado de GOBBI et al., 2013 (tradução nossa)

Legenda:

IV – intravenoso

VO – via oral

3.8.2 Tratamento da doença limitada desfavorável

O estudo HD11, do grupo alemão, incluindo 1.395 pacientes em estádios IA, IB, IIA e IIB com algum fator de risco (massa mediastinal volumosa, doença extranodal, VHS elevada, mais de três áreas nodais acometidas), revelou que com quatro ciclos de ABVD não é seguro reduzir a dose de RT de 3.000 para 2.000 cGy. Portanto, para pacientes com algum fator de risco, recomenda-se tratamento com quatro ciclos de ABVD e RT 3.000 cGy em campo envolvido, podendo-se considerar

ABVD por 6 ciclos caso não se pretenda utilizar RT. Não foram incluídos nesse estudo, pacientes com estágio IIB com envolvimento extranodal e/ou massa volumosa (≥ 10 cm), pois são comumente abordados como estágio avançado (EICH et al., 2010).

O estudo HD 14, também do grupo alemão, randomizou 1.655 pacientes com doença limitada desfavorável em dois braços. Comparou quatro ciclos de ABVD seguido de RT 3.000 cGy em campo envolvido e dois ciclos de ABVD + dois ciclos de BEACOPP escalonado, seguidos de RT 3.000 cGy em campo envolvido. O segundo grupo apresentou melhor sobrevida livre de progressão, sem diferenças na sobrevida global. O estudo HD 17, que ainda não foi concluído, possui como objetivo determinar se a radioterapia pode ser omitida após quimioterapia, orientando-se pelo PET, nesses pacientes com doença limitada desfavorável (VON TRESCKOW et al., 2012).

3.8.3 Tratamento da doença avançada

O regime ABVD, com seis ciclos, permanece como opção padrão para pacientes em estádios avançados. Entretanto, alguns novos regimes, ainda em investigação, têm produzido resultados promissores e podem ser considerados como alternativa. Entre eles está o BEACOPP em dose intensificada (ENGERT et al., 2009). Uma metanálise incluindo 9.993 pacientes com doença avançada sugeriu que seis ciclos de BEACOPP intensificado apresentava benefício de sobrevida global em comparação ao ABVD e maior toxicidade hematológica (SKOETZ et al., 2013). Contudo, após seguimento, a longo prazo, do estudo italiano HD2000, houve sobrevida similar entre ABVD e BEACOPP (MERLI et al., 2016). Considerando que aproximadamente 70% dos pacientes com doença avançada podem ser curados com ABVD em primeira linha associada à toxicidade mínima, e o uso de ABVD é possível na recidiva, o ideal é reservar o BEACOPP escalonado para pacientes em estágio avançado e prognóstico ruim (IPS desfavorável). Infelizmente, o escore IPS não é um bom preditor de resposta ao ABVD. Entretanto, a resposta precoce a dois ciclos de ABVD com o PET parece ser um bom teste para avaliar quimiossensibilidade ao ABVD. A RT para doença Bulky no diagnóstico e em massa

residual, ainda é considerada como padrão terapêutico quando a QT de primeira linha é o ABVD (GOBBI et al., 2013). Outro esquema alternativo de quimioterapia é o Stanford V que, em estudos, não foi superior ao ABVD, em relação à sobrevida global e sobrevida livre de recaída (GORDON et al., 2013).

3.8.4 Tratamento da doença refratária ou recorrente

A falência de tratamento ocorre em aproximadamente 10% dos pacientes com LH estadio limitado. No estadio avançado, 10% dos pacientes não apresentarão remissão completa e 20 a 30% evoluirão com recidiva da doença. Pacientes recidivados após tratamento anterior com RT exclusiva podem ser tratados com ABVD seguidos ou não de RT em campo limitado, não irradiado. Pacientes com recaída tardia (acima de 12 meses da QT inicial) podem ser resgatados, novamente, com ABVD, considerando-se a dose acumulada de doxorubicina e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo, seguida de RT de sítio Bulky não irradiado. Quimioterapia de resgate seguida de QT em altas doses com transplante autólogo de células tronco hematopoéticas (TCTH) é o tratamento de escolha para LH recidivado ou refratário. Regimes de salvamento como o DHAP, ICE e IGEV podem ser utilizados antes do TCTH autólogo. A resposta à quimioterapia antes do TCTH autólogo é considerada um fator prognóstico importante. O transplante alogênico de células tronco hematopoéticas é indicado para pacientes com recaída após transplante autólogo (GOBBI et al., 2013; KURUVILLA; KEATING; CRUMP, 2011).

Para pacientes que não podem ser transplantados, o brentuximabe vedotina, um anticorpo anti-CD30 conjugado com um agente antimicrotúbulo, é uma opção para tratamento paliativo, bem como esquemas com gencitabina, vinorelbina e doxorubicina lipossomal peguilado, como agentes únicos ou em associação (BARTLETT et. al., 2007; YOUNES et al., 2010). Entre os indivíduos de mais idade (acima de 60 anos), os que apresentam recidiva precoce, estadios avançados e anemia, representam um subgrupo de pior prognóstico (BÖLL et al., 2013).

O brentuximabe, além de ser usado como terapia paliativa, também é uma opção para controlar a doença antes da realização do TCTH alogênico nos

pacientes com LH recidivado ou refratário após TCTH autólogo (GOPAL et al., 2015).

Devido à potencial vulnerabilidade do LH clássico ao bloqueio da atividade de PD-1 (*programmed death-1*), estuda-se o uso de anticorpos monoclonais direcionados ao PD-1. Esse bloqueio evita a inibição linfocitária, resultando em uma ativação dos linfócitos contra o linfoma, como um efeito imunestimulante. Em um estudo fase I, cujos dados preliminares foram publicados após apresentação no ASH 2014, devido à resposta satisfatória em uma população altamente refratária, um anticorpo monoclonal direcionado contra o PD-1, o nivolumabe, está sendo estudado e avaliado (ANSELL et al., 2015). Nesse mesmo evento, também foram apresentados dados preliminares de outro estudo fase I, avaliando o uso de outro anticorpo monoclonal inibidor de PD-1, o pembrolizumabe, em pacientes que apresentaram refratariedade ou recaída com brentuximabe (MOSKOWITZ et al., 2014).

3.9 O VÍRUS EPSTEIN-BARR

Denis Burkitt, em 1958, descreveu casos de câncer em crianças na África equatorial – de comportamento agressivo e acometimento mais comum em mandíbula – que foram posteriormente denominados de Linfoma de Burkitt (BURKITT, 1958). A localização geográfica específica, as características clínicas de distribuição da doença e a incidência em uma idade específica, provocaram a suspeita de possível correlação com um agente infeccioso viral (BURKITT, 1962).

Em 1964, Epstein, Barr e colaboradores observaram em culturas de células do tumor maligno descrito por Burkitt, células semelhantes a linfoblastos e presença de inclusões citoplasmáticas (EPSTEIN; BARR et al., 1964). Verificaram, também, partículas virais nessas linhagens celulares, semelhantes ao vírus Herpes simples, que posteriormente foi designado como vírus de Epstein-Barr (EPSTEIN et al., 1965).

Werner e Gertrude Henle, no final da década de 60, desenvolveram marcadores sorológicos e demonstraram a presença de altos títulos de anticorpos

anti-EBV em pacientes com Linfoma de Burkitt (HENLE, W.; HUMMELER; HENLE, G., 1966).

Em avaliação subsequente, o EBV, através de métodos imunológicos e sorológicos, foi também confirmado como causa da Mononucleose Infecciosa e agente etiológico para carcinoma de nasofaringe e outras neoplasias (HENLE, G.; HENLE, W.; DIEHL, 1968; NONOYAMA et al., 1973).

O vírus Epstein-Barr é um vírus da família *Herpesviridae*. É um patógeno exclusivamente humano, também denominado formalmente de Herpesvírus humano 4 (HHV4). Estudos relatam que 95% da população mundial é sorologicamente positiva para o vírus (ALI et al., 2015).

Como as outras herpesvíroses, o EBV possui genoma composto de fita dupla de ácido desoxirribonucleico (DNA), envolvido por um capsídeo proteico. Existem dois tipos de EBV, que se diferenciam um do outro pelo antígeno nuclear (EBNA). O tipo 1 é dominante no Sudeste Asiático e Hemisfério Ocidental e os tipos 1 e 2 são igualmente prevalentes na África. A transmissão ocorre por via oral e o vírus infecta principalmente linfócitos e células epiteliais. A infecção primária ocorre nas tonsilas e depende da ligação da glicoproteína viral 350 com a molécula de superfície CD21 dos linfócitos B. A replicação do EBV pode decorrer sob as formas líticas ou latentes. A ativação da replicação da fase lítica ou reativação da fase latente é a chave para a transmissão. A produção viral ocorre na fase lítica e leva à expressão de proteínas ativadoras de transcrição, fatores de replicação de DNA e proteínas estruturais. As proteínas BZLF1 e BRLF1 atuam na mudança da fase de latência para a fase lítica. Em contraste com a fase lítica, a fase de latência caracteriza-se pela persistência da infecção viral, contudo, com menor capacidade infectiva viral e ocorre por via da enzima DNA polimerase. Nesta fase, a expressão viral limita-se às proteínas virais nucleares EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C e EBNA-LP, às proteínas latentes de membrana LMP-1, LMP-2A e LMP-2B e a alguns RNAs virais EBER1 e EBER2 (ODUMADE; HOGQUIST; BALFOUR, 2011).

O padrão de expressão gênica do EBV evidencia três tipos de latência (Quadro 12). Na latência do tipo I, expressam-se o EBNA-1 e dois pequenos RNAs (EBERs), geralmente, é associada com o Linfoma de Burkitt. Na latência do tipo II, observa-se o EBNA-1, os EBERs, a LMP-1, a LMP-2 e a LMP-2B. Associa-se com o LH clássico e o Linfoma não Hodgkin (LNH) de células T. A latência III usualmente

envolve a expressão de todos os EBNAs, EBERs e LMPs e manifesta-se principalmente em imunossuprimidos que apresentam desordens linfoproliferativas após transplante, em doenças linfoproliferativas associadas ao HIV e em linhagens celulares linfoblastoides (CARBONE, A.; GLOGHINI; DOTTI, 2008).

Quadro 12 – Expressão gênica na latência do vírus Epstein-Barr

Expressão gênica	Localização	Tipos de latência
EBNA-1	Núcleo	I, II, III
EBNA-2	Núcleo	III
EBNA-3	Núcleo	III
LMP-1	Membrana	II, III
LMP-2	Membrana	II, III
EBER-1 e EBER-2	Núcleo	I, II, III

Fonte: Adaptado de CARBONE; GLOGHINI; DOTTI, 2008 (tradução nossa)

Legenda:

EBV – Epstein-Barr vírus
 EBNA – Antígeno nuclear do Epstein-Barr
 LMP – Proteína de membrana latente
 EBER – RNA do Epstein-Barr

A transmissão do EBV também pode ser adquirida, devido transplante de células hematopoéticas ou de órgãos sólidos e sangue. A transmissão vertical não está devidamente comprovada. A infecção primária do EBV promove sintomas semelhantes a outras infecções virais agudas. É, frequentemente, assintomática em crianças abaixo de 10 anos. Em adolescentes e adultos jovens, entretanto, usualmente se manifesta com sintomas de odinofagia, febre, esplenomegalia e linfadenomegalia, evidenciando a síndrome de Mononucleose Infecciosa (MI). A manifestação clínica da MI ocorre 5 a 7 semanas após o contato. Nesse período de incubação, a carga viral do EBV na cavidade oral é maior que no sangue e o DNA viral detectado no sangue é, em sua maioria, originado dos linfócitos B. A replicação na cavidade oral pode persistir por meses e recorrer de forma intermitente por anos nos indivíduos saudáveis (ODUMADE; HOGQUIST; BALFOUR, 2011; SVEDMYR et al., 1984; TIERNEY et al., 1994).

O sistema imune é o primeiro mecanismo de defesa contra infecções virais. Como resposta à infecção primária ao EBV, acontece um estímulo à produção de IFN pelas células dendríticas previamente à manifestação da sintomatologia

clínica (QUAN et al., 2010). As citocinas inflamatórias TNF α , IL-6 e IL-1 apresentam-se aumentadas no tecido tonsilar de pacientes com MI (FOSS et al., 1994). A elevação de IL-2 sérica consiste com a expansão e ativação de linfócitos T CD8 como resposta da presença do EBV nos linfócitos B, os quais podem ser encontrados na forma de linfócitos atípicos no sangue periférico (ODUMADE; HOGQUIST; BALFOUR, 2011). A IL-10, produzida por monócitos e linfócitos, é produzida para suprimir essa proliferação inflamatória de células T (MOSSER; ZHANG, 2008). As células NK também contribuem na resposta imune e desempenham função na regulação da infecção viral crônica (LANIER, 2008).

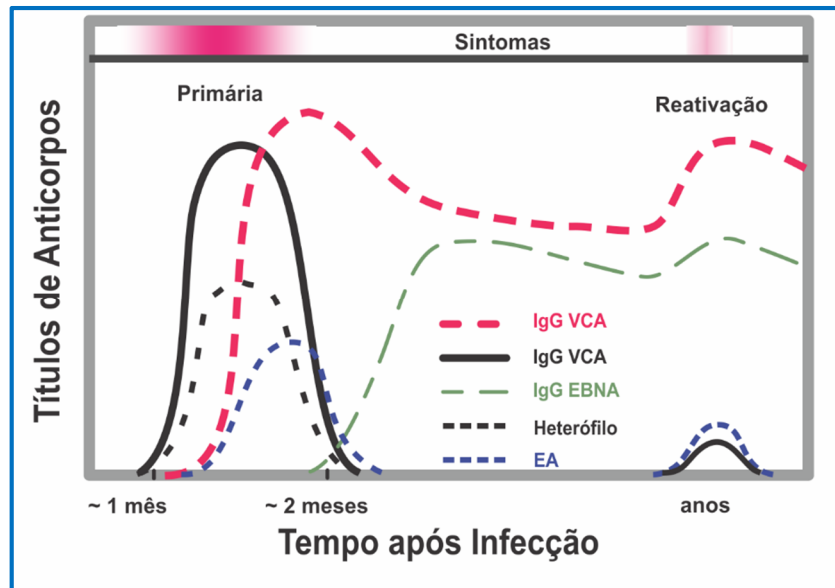
É bem reconhecido o potencial imunogênico do EBV e a persistência do vírus nas células infectadas é atribuída à sua capacidade de fuga à resposta imune. Entretanto, para a sobrevivência viral e o sucesso da latência em células B de memória, o EBV possui vários mecanismos de escape da resposta imune do hospedeiro, tais como: a expressão de proteínas líticas que interferem no processamento de antígenos; a expressão de moléculas do MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade, do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) nas células infectadas e a produção de citocinas homólogas humanas por essas células que simulam antígenos humanos. Outra estratégia considerada de evasão imune é o fato da expressão gênica durante a fase de latência ser menor em relação à expressão gênica de 80 genes durante a fase de replicação (RESSING et al., 2008).

Apesar das estratégias do EBV para o escape imune, o desenvolvimento de tumores como Doenças Linfoproliferativas, Linfoma de Hodgkin, Linfoma de Burkitt e Carcinoma de Nasofaringe, pode ser atribuído ao desequilíbrio entre as características virais de resistência e a resposta imunológica do hospedeiro (MERLO et al., 2010).

Durante a infecção primária, o EBV pode não ser detectado no sangue periférico, mas usualmente é verificado em quantidades elevadas na cavidade oral (CO). O vírus desaparece do sangue mais rapidamente em relação à CO. A replicação na CO pode permanecer por meses e recorrer de forma intermitente por anos na maioria dos indivíduos saudáveis. A maioria dos pacientes apresentam anticorpos IgM para antígenos do capsídeo viral (ACV) do EBV no início da doença, com redução entre 2 a 6 meses após a infecção. Os anticorpos IgG para ACV podem ser detectados nas duas primeiras semanas. Em praticamente 100 % dos pacientes observa-se anticorpos IgG para ACV durante o período de convalescença,

persistindo durante toda a vida. Anticorpos IgG para EBNA-1 não se desenvolvem até 3 meses a 6 meses após a infecção, mas persistem por toda a vida (ODUMADE; HOGQUIST; BALFOUR, 2011). A Figura 3 ilustra a titulação sorológica do EBV correspondente aos períodos de infecção.

Figura 3 – Titulação sorológica do vírus Epstein-Barr



Fonte: Adaptado de GULLEY; TANG, 2008 (tradução nossa)

Notas: A titulação sorológica diferencia a infecção primária da infecção tardia. Na infecção primária, o IgG anti-ACV e o IgM anti-ACV aumentam de acordo com os sintomas e ocorre positividade do teste heterófilo. Depois do desaparecimento dos sintomas, no período de infecção tardia, ocorre presença do EBNA e IgG anti-ACV, sem EA, embora o EA e o IgM anti-ACV possam reaparecer com ou sem sintomas, na reativação viral ou em neoplasias relacionadas com EBV.

Legenda:

IgG	–	Imunoglobulina G	ACV	–	Antígeno de capsídeo viral
IgM	–	Imunoglobulina M	EA	–	Do inglês, <i>early antigen</i>
EBNA	–	Antígeno nuclear do EBV			

A detecção do EBV é realizada por vários métodos (Quadro 13). A análise molecular do DNA e RNA viral permanece como foco dos estudos atuais para o diagnóstico e monitoramento das doenças associadas ao EBV. O vírus pode ser identificado em amostras de tecidos, através principalmente, das técnicas de imunohistoquímica (IHQ) para LMP-1 e hibridização *in situ* (ISH) para EBER. A ISH para EBER é o padrão ouro para a detecção tecidual das lesões histopatológicas relacionadas ao EBV. As transcrições de EBER são expressas em todos os tumores infectados com EBV, em tecidos linfoides retirados de pacientes portadores de MI e

em raras células de indivíduos saudáveis previamente expostos. Somente na leucoplasia pilosa oral relacionada ao EBV, cuja infecção ocorre em células epiteliais orais, que o EBER não é adequadamente expresso. A ISH pode ser realizada a partir de amostras de tecido parafinado e a leitura da reação é efetuada com a visualização microscópica do sinal nuclear do EBER nas células infectadas latentes (GULLEY, 2001; GULLEY; TANG, 2008).

Quadro 13 – Testes laboratoriais para vírus Epstein-Barr

Teste	Objetivo
Hibridização <i>in situ</i>	Identificar transcritos EBER ou EBV DNA em células específicas nas lesões histológicas.
Análise de clonalidade do EBV via <i>Southern Blot</i>	Avaliar clonalidade de lesões com relação à estrutura do DNA EBV; distinguir infecção latente de replicativa com base na estrutura linear contra episomal do genoma de EBV.
Amplificação do DNA do EBV	Deteção do DNA viral em tecidos; especificidade da doença é menor.
Carga viral do EBV	Quantificar o DNA EBV em sangue ou fluidos corporais para monitorizar o estado da doença ao longo do tempo.
Imuno-histoquímica (LMP-1, EBNA-1, EBNA-2, LMP-2A, BZLF-1)	Identificar a expressão da proteína EBV em tipos celulares específicos dentro de lesões histológicas; distinguir infecção latente de replicativa com base em perfis de expressão.
Cultura do EBV ou de linfócitos B infectados por EBV	Detectar e medir semiquantitativamente os <i>virions</i> infecciosos ou os linfócitos B infectados latentes; impraticável para uso clínico de rotina.
Microscopia eletrônica	Identificar os virions durante processo viral replicativo; impraticável para uso clínico de rotina.
Sorologia (ACV, EBNA, EA, anticorpos heterófilos)	Medir a resposta de anticorpos às proteínas virais em amostras de soro; distinguir infecção remota de aguda; monitorar o estado da doença ao longo do tempo.

Fonte: Adaptado de GULLEY, 2001 (tradução nossa)

Legendas:

EBV – Epstein-Barr vírus
 EBER – Ácido ribonucleico do EBV
 DNA – Ácido desoxirribonucleico
 LMP – Proteína de membrana latente

EBNA – Antígeno nuclear do EBV
 BZLF – Proteína viral
 ACV – Antígeno de capsídeo viral
 EA – Antígeno inicial

A hibridização *in situ* para o DNA EBV de amostras teciduais é outro método de detecção, em que sequências virais podem ser alcançadas, porém sua sensibilidade é reduzida. Seu uso é recomendado quando o RNA da amostra é seletivamente destruído, não sendo possível a análise pelo EBER RNA. Em situações clínicas, as transcrições do EBER permanecem a estratégia mais comum para detecção *in situ* do EBV (BROUSSET et al., 1992; GULLEY, 2001; GULLEY; TANG, 2008).

A técnica de imuno-histoquímica para o LMP-1 não é tão efetiva como o EBER na detecção do EBV, principalmente em Linfomas não Hodgkin e carcinomas. A análise do LMP-1 é verificada em material de parafina utilizando anticorpos comerciais. A leitura da reação é efetuada com a visualização microscópica do sinal citoplasmático da superfície de membrana (GULLEY; TANG, 2008).

A reação em cadeia de polimerase (PCR) quantitativa é utilizada para analisar a carga viral (CV) do EBV e para monitorar pacientes sob risco de desenvolver doenças linfoproliferativas após transplante (DLPT). Se realizada em sangue total, avalia-se a presença do vírus no compartimento intracelular, se em plasma, no compartimento extracelular. A maioria dos estudos sugere a análise em sangue total devido menor concentração de cópias virais no plasma. Não é recomendada análise única, devido pequena quantidade nos linfócitos B de memória. O acompanhamento com várias medidas de CV pode refletir com maior fidelidade a existência de replicação viral (STEVENS; PRONK; MIDDELDORP, 2001).

A técnica de PCR para extração de DNA EBV de fragmento histológico foi comparada com a ISH para EBER e com a IHQ para LMP-1 em um estudo recente, que evidenciou uma sensibilidade de detecção maior no método de PCR, porém, sua inabilidade em localizar as células EBV positivas fundamenta sua limitação como método de detecção isolado (QI et al., 2013).

3.10 EPSTEIN-BARR VÍRUS E LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO

Subsequentemente às pesquisas e descrições do Linfoma de Hodgkin e do EBV na década de 60, a detecção de altos níveis de anticorpos específicos para

antígenos do EBV no soro de pacientes com LH encorajou estudos acerca da implicação do EBV na patogênese dessa doença (LEVINE et al., 1971). Estudos posteriores confirmaram essa associação através de técnicas de hibridização *in situ* (WEISS et al., 1991).

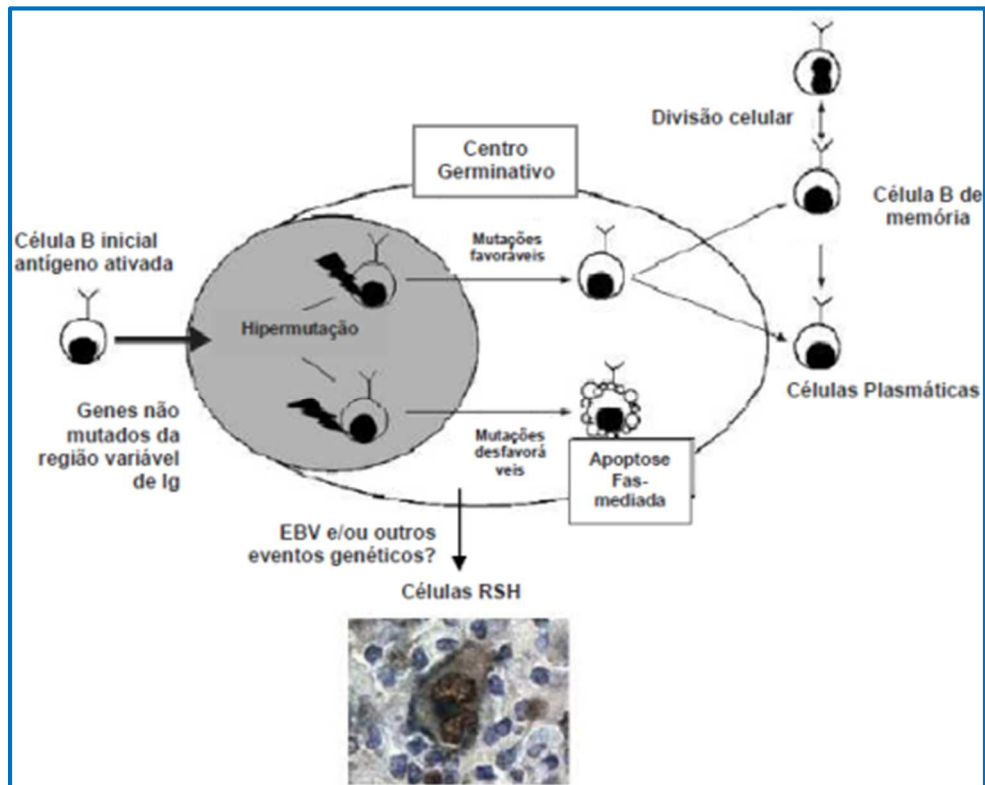
Embora a morfologia das células de Reed-Sternberg do Linfoma de Hodgkin ter sido descrita há um século, a sua origem a partir de linfócitos B foi reconhecida recentemente. A demonstração de que uma proporção de casos de LH albergava o EBV e que o seu genoma viral era monoclonal nesses tumores, sugeria que, em alguns casos, o vírus contribuía para o desenvolvimento de LH. Essa monoclonalidade dos genomas virais indicava que a infecção das células tumorais processava-se antes que a expansão clonal tumoral (KAPATAI; MURRAY, 2007).

As células de Reed-Sternberg/Hodgkin perdem a função do receptor de células B (RCB). Em aproximadamente um quarto dos casos, a perda da função do RCB é causada por mutações que destroem a capacidade de codificar genes de imunoglobulinas funcionais. As células de RSH são derivadas das células B do centro germinativo, que falharam em sofrer a apoptose, quando perderam a função do RCB (KANZLER et al., 1996).

Duas evidências sustentam um papel do EBV neste mecanismo antiapoptótico. A primeira refere-se às mutações nos genes de imunoglobulinas que são quase exclusivamente encontradas em casos EBV positivos (BRÄUNINGER et al., 2006). A segunda trata-se da capacidade que o EBV possui de perpetuar as células B do centro germinativo como RCB negativas *in vitro*; esse efeito é mediado pela LMP-2A (BECHTEL et al., 2005). A LMP-1 também contribui para a sobrevivência das células precursoras de RSH, por estimular anormalmente e constitutivamente, vias de ativação das células de RSH como NF- κ B, JAK/STAT e fosfatidilinositol 3-kinase/AKT (BARGOU et al., 1997; DUTTON et al., 2005). Contudo, a expressão gênica latente do EBV nas células de RSH pode não somente contribuir para propriedades antiapoptóticas, mas também interferir com o programa de diferenciação das células B do centro germinativo (VOCKERODT et al., 2015).

Na Figura 4, segue um modelo esquemático da provável associação do EBV com a patogênese das células de Reed-Sternberg/Hodgkin.

Figura 4 – Modelo esquemático da provável relação entre o vírus Epstein-Barr e as células de Reed-Sternberg/Hodgkin



Fonte: Adaptado de KAPATAI; MURRAY, 2007 (tradução nossa)

Notas: As células de Reed Sternberg/Hodgkin (RSH) provavelmente se originam de células B do centro germinativo na fase pré-apoptótica. Células B precursoras "nãive" são ativadas quando encontram o seu antígeno correspondente. As células B ativadas migram dentro dos folículos de células B, proliferam e se diferenciam em centroblastos, desenvolvendo, dessa forma, os centros germinativos. As células B do centro germinativo (CG) sofrem hipermutação somática dos genes da região Variável da Imunoglobulina; células com mutação desfavorável são eliminadas pelo apoptose Fas-mediada, enquanto aquelas que carregam o receptor de célula B (RCB) com alta afinidade antigênica, sobreviverão e deixarão o centro germinativo como linfócitos B de memória ou células plasmáticas. As células B do CG que carregam um RCB disfuncional, provavelmente sofrerão apoptose, porém, podem ser resgatadas pelo vírus Epstein-Barr e/ou ainda sofrer alterações genéticas ainda desconhecidas. Essas células podem configurar-se como as progenitoras das células de RSH.

O risco relativo de desenvolver LH após história de MI em relação à pacientes sem história prévia alternou entre 2.0 e 5.0 (KAPATAI; MURRAY, 2007). Demonstrou-se que o risco de desenvolver Linfoma de Hodgkin EBV-positivo aumentou quatro vezes após MI, enquanto o risco de desenvolver LH EBV-negativo não aumentou. A mediana estimada do tempo de incubação da Mononucleose para o diagnóstico de LH EBV-positivo foi de 4.1 anos em adultos jovens (HJALGRIM et al., 2003).

O LH EBV-positivo é menos frequente em países desenvolvidos, com percentagens de 20% a 50% de casos para Europa e América do Norte (HUMMEL et al., 1992). Valores mais altos são constatados em países em desenvolvimento, provavelmente, devido imunossupressão subjacente semelhante àquela observada para o Linfoma de Burkitt Africano na população infectada por malária e para o Linfoma de Hodgkin EBV-positivo nos pacientes infectados pelo HIV. Outra hipótese importante é o tempo de infecção pelo EBV, que nesses países é mais suscetível de ocorrer mais precocemente (KAPATAI; MURRAY, 2007; UCCINI et al., 1990). Nos Estados Unidos da América, a relação do EBV com o LH foi mais observada em latinos e asiáticos em vez de americanos brancos ou negros. Nos países desenvolvidos, a proporção de casos EBV-positivos é mais baixa em adultos jovens, mas é maior em crianças, especialmente naquelas com idade menor de 10 anos (GLASER et al., 1997).

Casos EBV-positivos são mais frequentes em idosos, devido à redução da imunidade específica contra o EBV de acordo com o avançar da idade. A presença do EBV está documentada somente no LH clássico e é mais frequentemente detectada no subtipo histológico celularidade mista (VOCKERODT et al., 2015).

3.11 EPSTEIN-BARR VÍRUS E PROGNÓSTICO NO LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO

A determinação do Epstein-Barr vírus como um marcador prognóstico no Linfoma de Hodgkin clássico permanece controversa e revela resultados conflitantes. Alguns estudos não demonstraram impacto prognóstico, enquanto outros sugeriram uma associação benéfica (KEEGAN et al., 2005).

A positividade tumoral para o EBV difere em relação à idade, sexo e subtipo histológico e a percentagem de pacientes com células de RSH, EBV-positivas distingue-se pelo mundo. Essas diferenças podem ser explicadas por variações demográficas, seleção dos pacientes nos estudos, qualidade da análise estatística e a idade como fator confundidor (DIEPSTRA et al., 2009).

A fim de exemplificar a divergência epidemiológica de distribuição e as características demográficas da relação EBV e LHc, um estudo avaliou se o Linfoma

de Hodgkin clássico relacionado ao EBV apresentava relevância para a sobrevida em 47 crianças sul africanas, de diferentes etnias, com idade entre 3 a 14 anos. Verificou-se predomínio do subtipo esclerose nodular em 89% dos casos e presença do EBV em 68% dos pacientes. Os casos EBV-positivos apresentaram sintomas menos agressivos ao diagnóstico e uma mediana maior de sobrevida em relação aos EBV-negativos (ENGEL et al., 2000).

Em 2005, um estudo populacional investigou os efeitos prognósticos do EBV em relação à idade, sexo, subtipo histológico e outros fatores de risco. Evidenciou-se que a presença do EBV nas células tumorais foi associada com uma melhor sobrevida em pacientes jovens e pior sobrevida em pacientes de maior idade com subtipo esclerose nodular. Variações nos resultados de acordo com idade e subtipo histológico sugerem entidades biologicamente distintas da doença (KEEGAN et al., 2005).

No mesmo ano, outro estudo populacional com 437 pacientes avaliou o impacto do *status* do EBV na sobrevida de grupos de Linfoma de Hodgkin clássico estratificados por idade. Os pacientes EBV-positivos, que apresentavam idade ao diagnóstico entre 16 a 34 anos, demonstraram uma vantagem na sobrevida comparada aos EBV-negativos, contudo, sem significância estatística. Entretanto, no grupo EBV-positivo (EBV+) acima de 50 anos, o EBV foi associado estatisticamente com pior desfecho clínico. Dessa forma, o comprometimento imune de pacientes de maior idade pode contribuir para o desenvolvimento de LHc associado ao EBV e fomenta estratégias de investigação relacionadas ao estímulo imune nesses pacientes. A frequência maior de óbitos ocorreu em pacientes EBV-positivos, independente do estadio, e a sobrevida global em cinco anos apresentou significância estatística no grupo EBV-negativo (EBV-) (JARRETT et al., 2005).

Em 2009, uma série populacional realizada na Holanda, englobando 412 pacientes portadores de LHc, avaliou subgrupos definidos de acordo com a idade. A falência de tratamento no subgrupo de maior idade foi associada com *status* positivo do EBV nas células tumorais (DIEPSTRA et al., 2009).

Um estudo brasileiro também analisou o impacto da presença do EBV nas células de RS e sua interferência na evolução clínica de 97 pacientes com LHc, no período entre 1994 a 2004. Não foi verificada diferença estatística na idade, sexo, estadio e presença de sintomas B entre os grupos (EBV+ e EBV-). A presença do

EBV não influenciou a sobrevida livre de eventos ou a sobrevida global (SOUZA et al., 2010).

Considera-se o Linfoma de Hodgkin uma neoplasia altamente curável. No entanto, aproximadamente 15% dos pacientes que apresentam doença localizada e 30% que manifestam doença disseminada, não respondem à terapêutica inicial. Os sistemas de escores atuais são úteis na prática clínica, porém não refletem a heterogeneidade biológica do Linfoma de Hodgkin. Recentes análises de perfis de expressão gênica das células de RS/H sugeriram perfis moleculares distintos. Estudos de perfis de expressão gênica de tumores EBV+ e EBV- permitiram delinear entidades biológicas distintas, com regulação imune e microambiente específicos. Estudos epidemiológicos atuais sugerem que fatores de riscos genéticos diferem entre os LHc EBV-positivos e negativos, salientando a necessidade de pesquisas sobre variação gênica em genes imunes, a fim de elucidar a patogênese do LHc relacionado ao EBV (CHETAILLE et al., 2009; URAYAMA et al., 2012).

Como a patogênese do LH clássico envolve fatores genéticos e ambientais, progressivamente nos estudos, tem-se explorado aspectos genéticos para o entendimento da biologia dessa doença e avaliação de fatores prognósticos. Análises do HLA (antígeno leucocitário humano) no contexto patogênico e prognóstico do LH estão sendo divulgadas. Há quase 50 anos, foi publicado um estudo de referência que destacou o Linfoma de Hodgkin como a primeira doença associada às variações do HLA. Atualmente, é reconhecida a relação do LHc EBV+ e LHc EBV- com polimorfismos específicos de HLA. Alelos do HLA classe I apresentam-se consistentemente associados ao LHc EBV-positivo, enquanto polimorfismos no HLA classe II conferem forte risco preditor para o LH EBV-negativo (MCAULAY; JARRETT, 2015).

Em 2012, publicou-se um estudo que avaliou a associação do HLA com o *status* tumoral do EBV no Linfoma de Hodgkin. Verificou-se que antígenos HLA-A1 e HLA-A2 associavam-se ao Linfoma de Hodgkin clássico EBV-positivo. Outras associações protetoras e predisponentes de HLA classe I e II para LHc EBV-positivo e EBV-negativo também foram identificadas (HUANG et al., 2012a).

Conduzida pelo mesmo autor e publicada no mesmo ano citado acima, outra pesquisa envolvendo HLA, EBV e Linfoma de Hodgkin definiu que o alelo HLA-A*02:07 corresponde a um alelo predisponente para LHc EBV-positivo e um alelo

protetor para LHc EBV-negativo em uma população norte chinesa (HUANG et al., 2012b).

Outro estudo, publicado em 2015, revelou uma associação de risco maior entre os pacientes EBV-positivos com HLA-A*01:01 e B*37:01, enquanto a presença de DRB1*15:01 e DPB1*01:01 foi associada com menor risco. Para os casos EBV-negativos, a classe II SNP rs6903608 prosseguiu como forte preditor de risco de doença (JOHNSON et al., 2015).

Adicionalmente às evidências genéticas de associação do EBV ao Linfoma de Hodgkin relatadas anteriormente, constatou-se, recentemente, um *locus* novo suscetível para o LHc EBV-positivo. Um estudo genético avaliou a imputação do SNP da região do MHC, considerando o *status* tumoral do EBV em 1200 casos de LHc e 5726 controles de origem europeia. Identificou-se uma nova associação entre uma variante genética comum, denominada rs6457715, localizada na região do MHC – a região do *locus* 6p21.3, e o LHc. Essa associação foi específica para o subgrupo EBV+, independente do subtipo histológico. Concluiu-se, portanto, que a região rs6457715, localizada próximo do gene HLA-DPB1, associou-se com o LHc EBV+, permitindo sugerir um *locus* novo suscetível para o LHc. Esse resultado expande o número de variantes genéticas que estão correlacionadas com o LHc e fornece evidências adicionais do papel crítico e específico do EBV na etiologia dessa doença (DELAHAYE-SOURDEIX et al., 2015).

Discrepâncias cariotípicas entre os tumores EBV-positivos e EBV-negativos foram relatadas em um estudo retrospectivo de duas instituições americanas e publicadas recentemente. O grupo EBV-negativo apresentou cariótipos de maior complexidade que o grupo EBV-positivo, caracterizados por instabilidades genômicas, maior número de pontos de interrupção cromossômica e aneuploidias. Algumas dessas anormalidades manifestaram-se relacionadas ao subtipo histológico, enquanto outras se revelaram independentes da histologia. Depreendeu-se que um número significativo de tumores EBV-positivos possuíam um cariótipo surpreendentemente simples, comparado ao que é usualmente observado no LHc. Essa análise cariotípica explicita a diversidade biológica e genética dessa doença (MONTGOMERY et al., 2016).

As citocinas representam importantes mediadores imunes da patogênese do LHc e pesquisas avaliam se os níveis circulantes de citocinas ao diagnóstico permitem prever prognóstico. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) na

sequência de DNA configuram genes imunes que se correlacionam com a função e produção de citocinas. Um estudo investigou se SNPs nos genes ILRN e INFG e nos genes do TNF- α (TNFA), da IL-10, da IL-6 e da CCL17 correlacionavam-se com níveis circulantes de citocinas ao diagnóstico e com o *status* do EBV tumoral no LHc. O estudo englobou 464 pacientes franceses e 239 pacientes americanos. A positividade tumoral ao EBV representou 22% dessa amostra. A análise exploratória entre *status* do EBV e SNPs apontou uma associação de SNPs do TNFA com sobrevida livre de progressão nos pacientes franceses EBV-negativos, bem como uma tendência similar de associação nos americanos EBV-negativos. Na metanálise das duas coortes, o TNFA apresentou significância estatística e ajustes com o IPS não alteraram esse resultado. Esse dado revelou que a variação na sequência gênica do TNFA associou-se com prognóstico nos pacientes EBV-negativos. Devido à complexidade de interações imunes no LHc, estudos adicionais utilizando varreduras de todo o genoma ou sequenciamento, são necessárias para determinar o impacto prognóstico de fatores hereditários nessa doença, integrando dados relacionados ao *status* do EBV (GHESQUIÈRES et al., 2013).

Outra recente pesquisa acerca de citocinas demonstrou, após análises imuno-histológicas de 104 amostras de LH, que a expressão de MIP-1 α , MIP-1 β , IL-13 correlacionava-se com a infecção pelo EBV e com a expressão de LMP-1. A expressão combinada dessas citocinas apresentou-se mais comum em pacientes com idade maior que 60 anos e associava-se com pior prognóstico. A infecção por EBV parece promover a liberação de citocinas em pacientes com LH e determina um impacto negativo na sobrevida do paciente. A imunossenescência fisiológica, provavelmente, explica a associação entre infecção por EBV e idade avançada. Portanto, essa investigação fomenta a possibilidade da modulação de citocinas ser um potencial alvo terapêutico para pacientes com LH EBV-positivo (CHANG et al., 2016).

O escape imune das células RSH ocorre, parcialmente, devido à existência de uma subpopulação de células T imunossupressoras regulatórias (Treg). Treg são subpopulações de células T funcionalmente distintas envolvidas na manutenção da autotolerância imunológica e da homeostase. Um estudo publicado recentemente avaliou a composição das células T no LH clássico, com ênfase no Treg, relacionando-a ao *status* do EBV, subtipo histológico e idade do paciente. Esse estudo totalizou 102 pacientes com LH clássico diagnosticados em um período

de 12 anos (1997 a 2009). O *status* do EBV foi verificado através de imunohistoquímica utilizando anticorpos direcionados à proteína de membrana latente-1 (LMP-1). Para definir as populações de linfócitos T, as lâminas foram duplamente coradas para marcar o FOXP3 (do inglês, *forkhead winged-helix transcriptional factor*), considerado como um marcador de linhagem específica para Treg. A positividade para o EBV foi confirmada em 30% (29 pacientes), principalmente em pacientes com idade maior que 54 anos e subtipo celularidade mista. Nos LHc EBV-positivos, um maior número de células CD8+ foram identificadas e mais Treg FOXP3+ foram encontradas, tão bem como maior número de Treg FOXP3+CD4+ comparado com os LHc EBV-negativos. O número de células CD4+ reduziu com a idade. A frequência de Treg FOXP3+CD8+ foi variável, sem significância estatística na associação com idade ou *status* do EBV. Demonstrou-se, dessa forma, um impacto do *status* do EBV na composição de populações de células T no microambiente tumoral do LH clássico. Nesse microambiente, Treg exerce sua atividade supressora sob as células T efectoras, promovendo privilégio imune para as células tumorais (PAVLOVIC et al., 2016).

Sugere-se, em estudos, que altos níveis de expressão de CD68 e CD163, antígenos associados à linhagem monócito/macrófago, apresentem efeitos pró-tumorais. Objetivando-se correlacionar a expressão desses antígenos com características clínico-patológicas e prognósticas em pacientes com LHc, um estudo foi realizado em amostras histológicas de 288 pacientes dinamarqueses. Na análise univariada, a expressão aumentada de CD68 e CD163 correlacionou-se com menor sobrevida global e menor sobrevida livre de eventos. Na análise multivariada, a expressão elevada de CD68 prosseguiu significativamente preditiva para a sobrevida global. Demonstrou-se, também, que tanto a expressão elevada de CD68, quanto a de CD163 associavam-se à presença do EBV nas células neoplásicas (KAMPER et al., 2011).

Um estudo japonês, publicado em 2014, analisou em 389 pacientes, o significado clínico-patológico da expressão de CD20 e presença do EBV em células de Hodgkin e Reed-Sternberg do LH clássico. Nos 74 casos positivos para CD20 observou-se idade significativamente maior ao diagnóstico e maior associação com o EBV. A análise multivariada identificou como fatores prognósticos desfavoráveis para a sobrevida global (SG): a presença de sintomas B, a trombocitopenia, a elevação da desidrogenase láctica, o ECOG performance *status* (*Eastern Cooperative*

Oncology Group) >1 e a positividade tumoral ao EBV. A positividade ao CD20 não se mostrou como fator prognóstico independente nessa análise estatística. Estabeleceram um modelo prognóstico, fundamentado nesses cinco fatores, que estratificou os pacientes em três grupos: baixo risco (0-1 fator adverso); risco intermediário (2-3 fatores adversos) e alto risco (4-5 fatores adversos). O grupo de baixo risco encerrou 144 pacientes, o grupo de risco intermediário totalizou 92 pacientes e o grupo de alto risco compreendeu 11 pacientes. A SG em cinco anos dos grupos de risco representou respectivamente: 91%, 66% e 36%. Inferiram a partir desses resultados, o EBV como fator prognóstico independente no LHc e recomendaram a propedêutica histológica de rotina para o EBV, especialmente em países que apresentam alta prevalência de infecção por esse vírus (ELSAYED et al., 2014).

Pesquisas acerca do papel do bloqueio da PD-1 como fator prognóstico no Linfoma de Hodgkin estão sendo conduzidas. A infecção pelo EBV permite aumentar a expressão dos ligantes da PD-1 nos LH EBV-positivos. Os ligantes da PD-1 (PD-L1 e PD-L2) se unem ao receptor da PD-1 nas células T e induzem a via de sinalização da PD-1, provocando a exaustão da célula T por inibição irreversível da proliferação e ativação da célula T. Células tumorais que expressam esses ligantes em sua superfície utilizam a via da PD-1 para escapar de uma resposta imunitária antitumoral eficaz. Considera-se uma potencial vulnerabilidade do LHc no bloqueio da PD-1 e uma indução adicional da expressão de PD-L1 pela infecção viral pelo EBV (ROEMER et al., 2016).

Estudos clínicos e populacionais dos últimos 16 anos, referentes à influência do EBV no prognóstico do Linfoma de Hodgkin, apresentam-se sumarizados no Quadro 14.

Quadro 14– Descrição de estudos clínicos e populacionais que relacionaram o valor prognóstico da presença do Epstein-Barr vírus e Linfoma de Hodgkin clássico nos últimos 16 anos

Estudo	Tamanho da amostra	Casos EBV+ (%)	Valor prognóstico do EBV no LHc
Engel et al. (2000)	36	68	Positivo
Naresh et al. (2000)	110	78	Positivo
Glavina-Durdov et al. (2001)	100	26	EBV + associou-se com maior SLE em < 30 anos
Clarke et al. (2001)	311	17	Negativo para SLE somente em mulheres > 45 anos
Vassallo et al. (2001)	78	64	Positivo somente para casos LMP-1 positivos
Flavell et al. (2001)	273	29	Não significativa
Stark et al. (2002)	102	34	Negativo
Herling et al. (2003)	577	64	Não significativa
Krugmann et al. (2003)	119	26	Positivo
Jarret et al. (2005)	437	33	Negativo
Keegan et al. (2005)	922	27	EBV + associou-se com melhor sobrevivida em jovens e pior sobrevivida em pacientes de maior idade com EN
Kwon et al. (2006)	56	41	EBV+ associou-se com maior SLE em < 25 anos e menor SLE em > 25 anos
Keresztes et al. (2006)	109	43	Não significativa
Dinand et al. (2007)	118	97	Não significativa
Diepstra et al. (2009)	412	34	EBV+ associou-se com menor SLE em pacientes de maior idade
Souza et al. (2010)	97	52,5	Não significativa
Kamper et al. (2011)	288	33	EBV+ associou-se com expressão de CD68 e CD163, sem significância prognóstica
Koh et al. (2012)	159	34.5	EBV+ associou-se com pior SLE em pacientes > 25 anos
Huang et al. (2012b)	161	70%	Alelo HLA-A*02:07: predisponente para LHc EBV+ e protetor para LHc EBV-

Ghesquières et al. (2013)	703	22% de 242 pacientes	A variação da sequência gênica do TNFA associou-se com prognóstico em pacientes EBV-
Elsayed et al. (2014)	389	44	EBV + como fator prognóstico significativo para SG
Johnson et al. (2015)	503	30	Para o EBV-, a classe II SNP rs6903608 prosseguiu como forte preditor de risco
Pavlovic et al. (2016)	102	30	Sem significância na associação de Treg FOXP3+CD8+ com EBV
Roemer et al. (2016)	108	21	EBV+ induziu expressão de PD-L1. Valor prognóstico não foi analisado

Fonte: A autora

Legenda:

EBV+ – Epstein-Barr Vírus positivo

EBV- – Epstein-Barr Vírus negativo

SLE – Sobrevida livre de Eventos

LMP-1 – Proteína de membrana latente-1

EN – Esclerose nodular

LHc – Linfoma de Hodgkin clássico

TNFA – Gene do fator de necrose tumoral-
alfa

SG – Sobrevida Global

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo simples

Treg – Células T regulatórias

FOXP3 – *Forkhead winged-helix transcriptional factor*

PD-L1 – Ligante de morte programada-1

4 MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (HU-UFJF). Registrado por meio do número CAAE 40612614.5.0000.5133 (Anexo A).

Todos os pacientes foram informados acerca da pesquisa e seus objetivos, bem como da garantia do anonimato e sigilo das informações coletadas, além de serem esclarecidos de que a interrupção da participação poderia ocorrer a qualquer momento, sem qualquer prejuízo ou dano. Tais informações foram descritas no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A), elaborado em duas vias, sendo uma delas entregue ao participante e a outra cópia arquivada pela pesquisadora.

A coleta de dados foi iniciada após aprovação do estudo pelo Comitê de Ética, em consonância com a Resolução número 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde, que regulamenta pesquisas envolvendo seres humanos.

A identificação das amostras foi codificada para evitar o acesso às informações por terceiros não autorizados. Os formulários originais (Apêndice B) contendo dados dos pacientes permanecem guardados em local restrito para assegurar o caráter anônimo dos pacientes.

4.2 DESENHO DO ESTUDO

O trabalho foi desenhado com a proposta de um estudo de coorte histórico.

4.3 SELEÇÃO DA POPULAÇÃO

Foram incluídos, nesse estudo, pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico, tratados e acompanhados pelos mesmos especialistas em Hematologia que trabalham no Hospital Ascomcer e no Serviço de Hematologia e Transplante de Medula Óssea do Hospital Universitário da Universidade de Juiz de Fora.

Totalizaram 60 pacientes com LH matriculados no período de janeiro de 2009 a janeiro de 2015.

Os pacientes portadores de Linfoma de Hodgkin Predominância Linfocitária, os portadores de sorologia positiva para o vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV), os pacientes com prontuários incompletos e os pacientes sem amostra anatomopatológica disponível ou inadequada para avaliação apresentaram-se inelegíveis para o estudo. Totalizaram 29 pacientes para a análise.

Foram coletados, dos prontuários médicos, dados dos fatores prognósticos do Escore Prognóstico Internacional (IPS), para doença avançada no Linfoma de Hodgkin, que engloba sexo, idade, albumina, leucocitose, linfocitopenia, estadiamento clínico e hemoglobina.

Foram também verificados e incluídos, na análise, os fatores de risco desfavoráveis para doença limitada, de acordo com o GHSG: doença extranodal, Bulky mediastinal, VHS, sintomas B e envolvimento nodal.

O estadiamento dos pacientes foi realizado segundo o preconizado pelo estadiamento Ann Arbor (CARBONE et al., 1971).

Os subtipos histológicos foram estabelecidos.

Classificou-se a resposta ao tratamento utilizando os critérios de resposta de Cheson e colaboradores de 2007.

Dados acerca da recaída, da realização de transplante e da ocorrência de óbito foram reunidos.

4.4 AMOSTRAS ANATOMOPATOLÓGICAS

Foram adquiridas 32 amostras de laboratórios de anatomia patológica. Essas amostras apresentavam-se por lâminas e blocos parafinados devidamente registrados. Devido ao material insuficiente, três amostras foram excluídas, totalizando 29 amostras analisadas.

O material histológico foi enviado ao Núcleo de Patologia Quantitativa (NPQ) do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL), em São Paulo, que realizou a verificação do EBV, através das técnicas de imuno-histoquímica e hibridização *in situ*, bem como a revisão histopatológica diagnóstica da amostra de acordo com os critérios da OMS 2008. Memorando de autorização da parceria com o IAL apresenta-se no Anexo B.

As análises das lâminas coradas pela hematoxilina e eosina (HE), imuno-histoquímica (IHQ) e hibridização *in situ* cromogênica (CISH) foram realizadas por um único hematopatologista. Visualiza-se modelo do Laudo no Anexo C.

4.5 MÉTODOS PARA DETECÇÃO DO EPSTEIN-BARR VÍRUS

4.5.1 Microtomia das amostras

As amostras, incluídas em parafina, foram resfriadas e cortadas no micrótomo rotativo semimotorizado, modelo Leica RM2245 (Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha). Foram realizados cortes com 3 µm para as reações de Imuno-histoquímica (IHQ) e Hematoxilina-Eosina (HE) e com 5 µm para Hibridização *in situ* cromogênica (CISH).

Os cortes histológicos foram estendidos em banho-maria histológico, modelo PAT BH-10, com água destilada a 40°C e coladas em lâminas previamente tratadas. As lâminas foram deixadas em estufa de secagem a 60°C durante a noite. Foi utilizada uma navalha para cada amostra, para evitar a contaminação cruzada.

As lâminas empregadas são da marca *Star Frost Knittel Glass*, referência (ref) K580 (Glasbearbeitungs GmbH, Braunschweig, Alemanha).

4.5.2 Coloração de Hematoxilina-Eosina

Após processo de microtomia das amostras, as lâminas foram desparafinadas em xilol (Panreac Quimica S.L.U, ref.131769.1611, Barcelona, Espanha) a 60°C, em estufa de secagem e à temperatura ambiente, por 20 minutos cada etapa.

Subsequentemente, as lâminas foram lavadas com concentrações decrescentes de etanol (Merck, ref.1.00983.1000, Darmstadt, Alemanha), por 5 minutos, em cada cuba, na cabine de segurança química. Empregou-se nova lavagem em água corrente e destilada e, após essa lavagem, as lâminas foram mergulhadas em solução de Hematoxilina por 1 minuto. Novamente, foram lavadas em água corrente e destilada e após, mergulhadas em solução de água amoniacal por 3 segundos. Repetidamente, foram lavadas em água corrente e destilada e após, mergulhadas finalmente, em etanol por 1 minuto e em solução de Eosina alcoólica por 30 segundos.

O excesso foi retirado em papel toalha e as lâminas foram mergulhadas em etanol e xilol e após, cobertas por lamínula e fixadas com Entellan Neu (Merck, ref.1.07961.0100, Darmstadt, Alemanha).

Posteriormente, efetuou-se análise microscópica histopatológica diagnóstica de acordo com a classificação da OMS de 2008, para Linfoma de Hodgkin.

4.5.3 Reação de imuno-histoquímica para a proteína latente de membrana 1 do Epstein-Barr vírus

Após o processo de microtomia das amostras, descrito anteriormente, as lâminas foram desparafinadas em xilol a 60°C, em estufa de secagem e à temperatura ambiente por 20 minutos cada etapa e reidratadas com concentrações decrescentes de etanol, por 5 minutos em cada cuba, na cabine de segurança química.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada, e imersas em solução tampão citrato 10 mM pH 6,0. Essa etapa é necessária para recuperação do antígeno. A seguir, colocadas em ebulição na panela de pressão por 3 minutos.

Procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ a 6%, com trocas de 5 minutos cada e em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, destilada e solução salina tamponada com fosfatos (*PBS-phosphate buffered saline*) 10mM pH 7,4 por 5 minutos.

Após essa etapa, foi aplicado o anticorpo primário (*Monoclonal Mouse anti Epstein-Barr Virus*, LMP; Dako ref. M0897, Glostrup, Dinamarca) e a seguir, as lâminas foram diluídas em tampão PBS (meio de cultura) contendo soroalbumina bovina (BSA) a 1% (Inlab, ref.1870, São Paulo) e azida sódica a 0,1% (Merck, ref. 6688, Rio de Janeiro), durante 30 minutos a 37°C e por 18 horas a 5°C, em câmara úmida, a fim de inibir fungos e bactérias.

Após término desse procedimento, as lâminas foram lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada e incubadas com o polímero *Value Primary Antibody Enhacer* do sistema de amplificação (*UltraVision LP Value Large Volume Detection System HRP Polymer, Thermo Scientificat# TL-125-HLS*) por 20 minutos, a 37°C e, a seguir, foi realizada nova lavagem com o mesmo tampão PBS, com 3 trocas de 3 minutos cada e então, as lâminas foram incubadas com o mesmo polímero anteriormente citado, por 30 minutos a 37°C. Última lavagem com tampão PBS foi realizada, com 3 trocas de 3 minutos cada.

Para revelar a reação, as lâminas foram incubadas em solução substrato cromógeno, por 5 minutos, a 37°C e ao abrigo da luz. Essa solução incluía 100 mg de 3,3 diaminobenzidina (*Diaminobenzidine Tetrahydrochloride – DAB*; Sigma, ref. D-5637, St Louis, MO, EUA), 1 ml de Dimetilsulfóxido (J T Baker, ref. 9224-03), 1 ml de H₂O₂ 6% e 100 mL de PBS.

Após a incubação com solução cromogênica, a lâmina de controle positivo foi avaliada no microscópio óptico *Olympus CX22LED*, a fim de verificar o desenvolvimento do precipitado castanho dourado, como produto final da reação.

Após essa análise confirmatória da lâmina de controle, as lâminas foram lavadas, contracoradas com Hematoxilina de Harris por 30 segundos. Procedeu-se a novas lavagens com água amoniacal, etanol seriado crescente e xilol, para diferenciação e desidratação.

Na cabine de segurança química, as lâminas receberam as lamínulas e o Entellan, finalizando assim, o processo de imuno-histoquímica (IHQ).

A seguir, as lâminas foram analisadas e estudadas ao microscópio.

4.5.4 Hibridização *in situ* cromogênica para Epstein-Barr vírus

As amostras preparadas em lâminas de vidro foram inicialmente desparafinadas em xilol e etanol. A seguir, foi usada solução com H₂O₂ a 6% para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Após lavagem, foi aplicada 1 a 2 gotas de Solução de Pepsina (ES1) por 3 minutos a 37°C em câmara úmida para o processo de desproteção.

A seguir, foi aplicado 10 µL da sonda sobre cada amostra, que foi coberta com lamínula e selada com o selante Fixo Gum, (ref.2901 17000, Marabu GmbH, Bietigheim-Bissingen, Alemanha).

As lâminas foram incubadas por 5 minutos a 75°C no hibridizador para o processo de desnaturação de ácidos nucleicos celulares indesejados e hibridizadas por 90 minutos a 55°C.

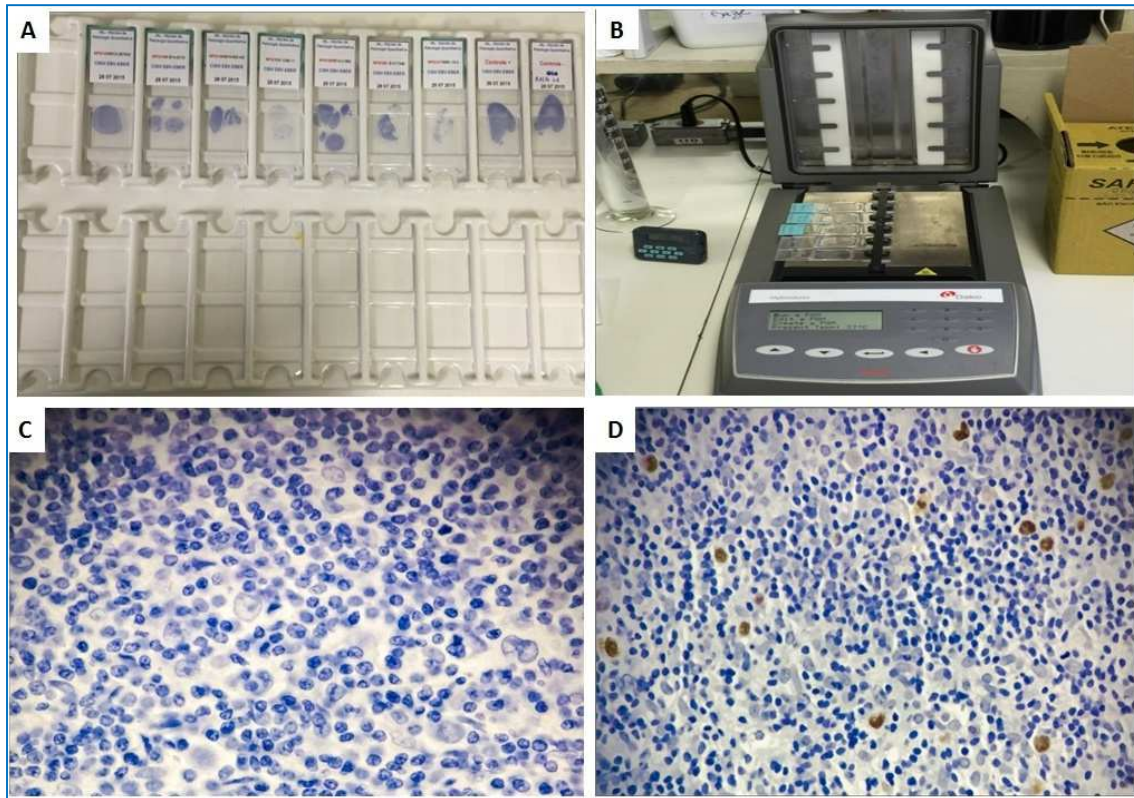
Após a hibridização, as lâminas foram lavadas e, a seguir, aplicou-se 25 µL do anticorpo monoclonal *Mouse anti DIG* (AB1) em cada lâmina. Foram cobertas com lamínula e incubadas por 60 minutos a 37°C na câmara úmida. Após nova lavagem, aplicou-se 25 µL do anticorpo monoclonal *Anti Mouse HRP Polymer* (AB2) em cada lâmina, cobrindo com lamínula.

Procedeu-se a outra incubação por 30 minutos a 37°C na câmara úmida, com posterior lavagem. Para a revelação com cromógeno, foi aplicado 50 µL do *DAB Solution* por lâmina, com incubação posterior de 15 minutos a 37°C.

A seguir, as lâminas foram coradas com Hematoxilina de Harris por 10 segundos.

A positividade foi demonstrada pela coloração nuclear marrom dourado visualizada em microscópio óptico Olympus CX22LED (Figura 5).

Figura 5 – Hibridização *in situ* para vírus Epstein-Barr em células tumorais do Linfoma de Hodgkin



Fonte: A autora

Notas:

- A) Amostras preparadas em lâminas de vidro;
 B) Hibridizador Automático de lâminas modelo DAKO S2450;
 C) Células de Reed-Sternberg e Hodgkin (setas) negativas para EBER. 40x;
 D) Células de Hodgkin demonstrando a marcação nuclear castanho dourada para os transcritos EBER. 40x.

A determinação do Vírus Epstein-Barr pela hibridização *in situ* cromogênica foi obtida empregando-se o Hibridizador automático de lâminas modelo Dako S2450 (DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Dinamarca).

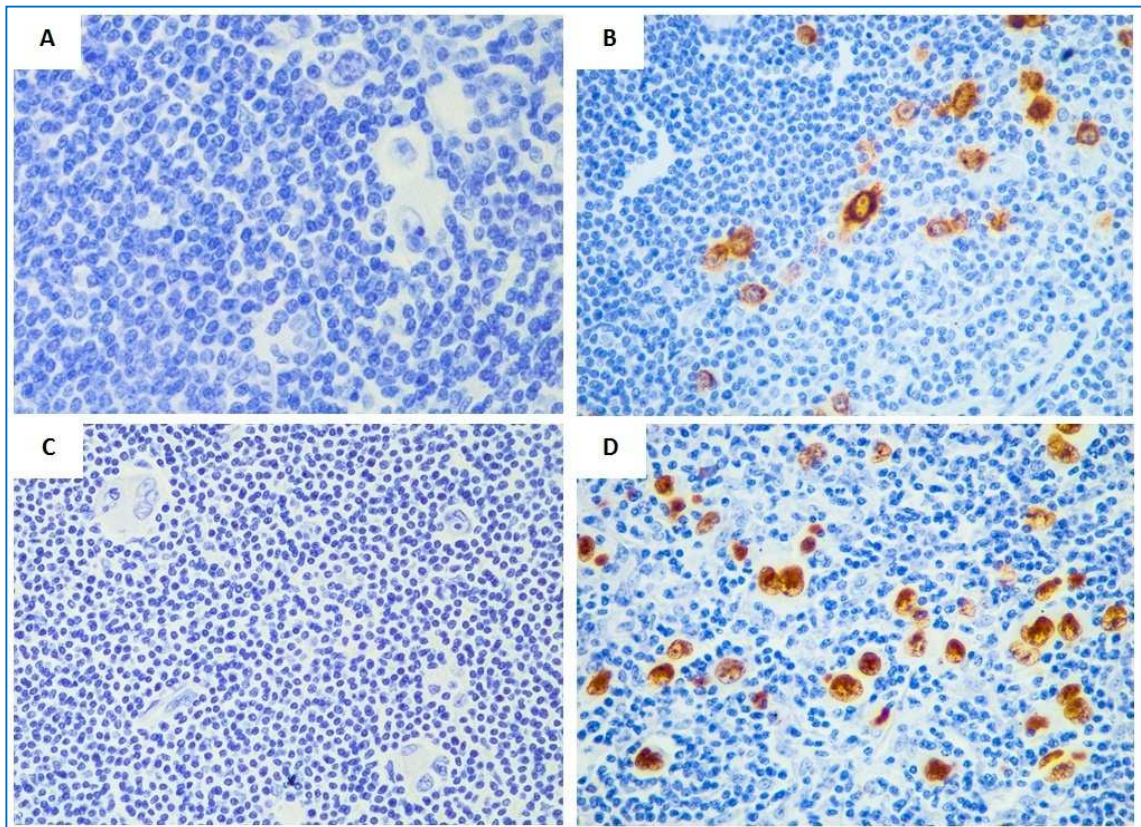
Para detecção do EBER-RNA do EBV foi utilizada a sonda conjugada à digoxigenina (*ZytoFast EBV Probe Digoxigenin-labeled* ref. T-1114-400; *ZytoVision GmbH*, Bremerhaven, Alemanha).

Para detecção dos híbridos por polímero conjugado à peroxidase, foi aplicado o *Kit HRP-DAB ZytoFast Plus CISH implementation*.

Controles positivos e negativos atestaram a fidelidade das reações.

A Figura 6 ilustra os controles positivos e negativos das reações de IHQ e ISH para detecção do EBV. A Figura 7 condensa fotomicrografias de HE, IHQ e ISH de células tumorais de pacientes do estudo.

Figura 6 – Controles positivos e negativos das reações de imuno-histoquímica e hibridização *in situ*

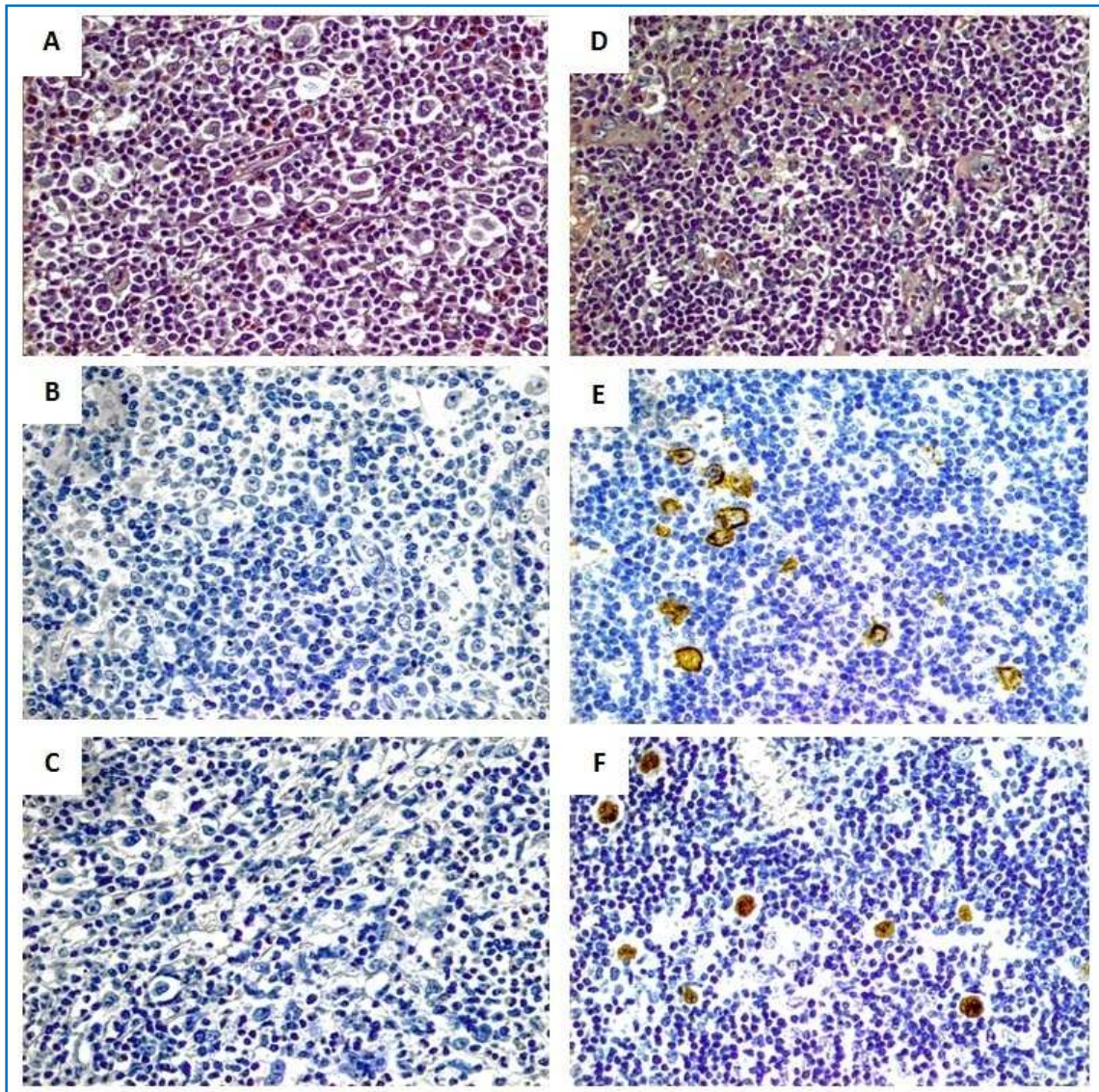


Fonte: A autora

Notas:

- | | |
|--|---|
| A) Controle EBV-negativo da IHQ pela omissão de anticorpo primário. 40x; | C) Controle EBV-negativo da ISH utilizando sonda negativa. 40x; |
| B) EBV LMP-1 controle positivo. 40x; | D) EBV ISH controle positivo. 40x. |

Figura 7 – Fotomicrografias das amostras histológicas de dois pacientes do estudo: hematoxilina-eosina, imuno-histoquímica e hibridização *in situ*



Fonte: A autora

Notas:

Exemplos A, B e C referem-se à amostra NPQ 1489 de paciente EBV negativo.

Exemplos D, E e F referem-se à amostra NPQ 1560 de paciente EBV positivo.

A) Subtipo Esclerose Nodular, Hematoxilina-eosina (HE) 40x;

B) EBV negativo por IHQ;

C) EBV negativo por ISH;

D) Subtipo Celularidade Mista, HE 40x;

E) EBV positivo por IHQ; marcação citoplasmática para o LMP-1 nas células de Reed Sternberg/Hodgkin;

F) EBV positivo por ISH, marcação nuclear marrom dourada para o EBER.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análise descritiva foi realizada através de distribuições de frequências, medidas de tendência central e de variabilidade.

A relação entre a presença do EBV e outras variáveis categóricas foi analisada pelo teste do Qui-Quadrado ou pelo teste exato de Fisher. O tamanho do efeito foi avaliado pelo V de Cramer (V), utilizando a classificação 0,2 (pequeno), 0,5 (moderado) e 0,8 (elevado) (COHEN, J. A., 1992), e pela razão de chances (RC) com os respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%).

A concordância entre os métodos de identificação da positividade ao EBV e entre os avaliadores na classificação histológica foi realizada através do teste Kappa, utilizando a classificação proposta por Landis e Koch, sendo considerado excelente valor acima de 0,80 (LANDIS; KOCH, 1977).

As funções de sobrevida foram calculadas pelo Método Kaplan-Meier e testes de Log-Rank foram usados para comparar curvas. A sobrevida global foi definida como o tempo decorrido da data do diagnóstico até a data de óbito ou data da última avaliação. A sobrevida livre de eventos foi definida como o tempo decorrido do diagnóstico da doença ao diagnóstico de recidiva ou do óbito. Na ausência de óbito ou recidiva, os pacientes foram censurados na data da última avaliação. Para analisar os fatores associados à sobrevida livre de eventos foi utilizado o Modelo de Cox, sendo calculados os *hazard-ratios* com os respectivos IC95%.

A análise multivariada incluiu variáveis que apresentaram $p < 0,15$ nos modelos univariados.

As características gerais e as curvas de sobrevida dos pacientes incluídos e excluídos foram comparadas, a fim de observar diferenças significativas.

O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Todas as análises foram realizadas no *IBM SPSS Statistics 17* (IBM Corp., Armonk, NY).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão serão apresentados sob a forma do artigo intitulado “*Expression of Epstein-Barr virus in classical Hodgkin’s Lymphoma tumor cells: Correlation of unfavorable factors and survival*”, o qual foi submetido à revista *Infectious Agents and Cancer* (Anexo D).

Demais resultados apresentam-se no (Apêndice C).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo compreendeu todos os pacientes portadores de Linfoma de Hodgkin clássico, tratados e acompanhados pela mesma equipe médica do Hospital Universitário e do Hospital Ascomcer – ambos de Juiz de Fora – matriculados nestas instituições, no período de janeiro de 2009 a janeiro de 2015, com material histopatológico disponível.

A representação clínica, demográfica e histopatológica do grupo amostrado permite caracterizar a doença como acometendo jovens (média de 33 anos), com proporção aproximada de homens e mulheres, predominantemente de subtipo histológico esclerose nodular e de estadiamento limitado desfavorável, com curvas de sobrevida global e livre de eventos semelhantes às constatadas em estudos clínicos.

Diferenças estatísticas significantes não foram verificadas entre a positividade ou negatividade do EBV e os fatores desfavoráveis e prognósticos do Linfoma de Hodgkin. A ampliação do número de casos é essencial para obter conclusões definitivas em relação ao valor prognóstico destas variáveis.

Além disso, recentes estudos clínicos e pré-clínicos demonstraram que o microambiente tumoral do LH representa um alvo terapêutico promissor, fomentando a esperança de que novas estratégias de tratamento focados na interface entre as células malignas e reacionais surgirão em breve. Contudo, os principais motivos para o insucesso das definições clínicas consistem na falta de reprodutibilidade entre coortes de pacientes independentes e implicações prognósticas que não apresentam magnitude significativa para justificar uma mudança na conduta clínica.

O aumento dessa série de casos é crucial para alcançar resultados definitivos em relação a essa questão, pois a determinação do EBV como marcador prognóstico para o Linfoma de Hodgkin agrega o entendimento da biologia e progressão dessa doença além de influenciar nas decisões terapêuticas.

7 CONCLUSÃO

Os pacientes EBV positivos apresentaram maior SLE (mediana de 93 meses) quando comparados aos pacientes EBV negativos (mediana de 36 meses), embora a diferença não apresentasse significância. Observou-se uma associação da positividade do EBV com o subtipo histológico celularidade mista e uma tendência de associação do vírus com idade acima de 45 anos.

A detecção do EBV nas células tumorais do LH clássico em 37,9% dos pacientes de nosso estudo corrobora os dados de grandes séries.

A chance de recidiva foi 6,9 vezes maior nos pacientes que apresentavam sintomas B ao diagnóstico, considerando que os sintomas B, associados aos valores de VHS, integram os riscos desfavoráveis da doença limitada.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER F. E. et al. Risk factors for Hodgkin's disease by Epstein-Barr virus (EBV) status: prior infection by EBV and other agents. **British journal of cancer**, London, v. 82, n. 5, p. 1117-1121, Mar 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2374437/>>. Acesso em: 20 jan. 2015.

ALI, A. S. et al. Epstein- Barr Virus: Clinical and Epidemiological Revisits and Genetic Basis of Oncogenesis. **The open virology journal**, Hilversum, v. 9, p. 7-28, Nov 2015.

ANAGNOSTOPOULOS, I. et al. European Task Force on Lymphoma project on lymphocyte predominance Hodgkin disease: histologic and immunohistologic analysis of submitted cases reveals 2 types of Hodgkin disease with a nodular growth pattern and abundant lymphocytes. **Blood**, Washington, v. 96, n. 5, p. 1889-99, Sept 2000.

ANDRIEU, J. M. et al. Hodgkin's disease during HIV1 infection: the French registry experience. French Registry of HIV-associated Tumors. **Annals of oncology**, Dordrecht, v. 4, n. 8, p. 635-641, Sept 1993.

ANSELL, S. M. Hodgkin lymphoma: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **American journal of hematology**, New York, v. 89, n. 7, p. 771-9, July 2014.

ANSELL, S. M. et al. PD-1 Blockade with Nivolumab in Relapsed or Refractory Hodgkin's Lymphoma. **The New England journal of medicine**, Boston, v. 372, p. 311-319, Jan 2015.

ARMITAGE, J. O. Early-stage Hodgkin's lymphoma. **The New England journal of medicine**, Boston, v. 363, n. 7, p. 653-62, Aug 2010.

BANERJEE, D. Recent Insights into the Biology of Hodgkin's Lymphoma. In: REZAEI, N. (Ed.). **Hodgkin's Lymphoma**. Rijeka: InTech, 2012. cap. 1. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/hodgkin-s-lymphoma/recent-insights-into-the-biology-of-hodgkin>>. Acesso em: 16 jan. 2015.

BARGOU, R. C. et al. Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v. 100, n. 12, p. 2961-2969, Dec 1997.

BARRINGTON, S. F. et al. Role of imaging in the staging and response assessment of lymphoma: consensus of the International Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group. **Journal of clinical oncology**, Alexandria, v. 32, n. 27, p. 3048-3058, Sept 2014.

BARRINGTON, S. F. et al. PET-CT for staging and early response: results from the Response-Adapted Therapy in Advanced Hodgkin Lymphoma study. **Blood**, Washington, v. 127, n. 12, p. 1531-1538, Mar 2016.

BARTLETT, N. L. et al. Gemcitabine, vinorelbine, and pegylated liposomal doxorubicin (GVD), a salvage regimen in relapsed Hodgkin's lymphoma: CALGB 59804. **Annals of oncology**, London, v. 18, n. 6, p. 1071-1079, June 2007.

BECHTEL, D. et al. Transformation of BCR-deficient germinal center B cells by EBV supports a major role of the virus in the pathogenesis of Hodgkin and post transplant lymphoma. **Blood**, Washington, v. 106, n. 13, p. 4345-4350, Aug 2005.

BIGGI, A. et al. International validation study for interim PET in ABVD-treated, advanced-stage Hodgkin lymphoma: interpretation criteria and concordance rate among reviewers. **Journal of nuclear medicine**, Reston, v. 54, n. 5, p. 683-690, May 2013.

BÖLL, B. et al. Relapsed Hodgkin lymphoma in older patients: a comprehensive analysis from the German Hodgkin study group. **Journal of clinical oncology**, Alexandria, v. 31, n. 35, p. 4431-4437, Dec 2013.

BRÄUNINGER, A. et al. Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. **International journal of cancer**, New York, v. 118, n. 8, p. 1853-1861, Apr 2006.

BROUSSET, P. et al. Comparison of in situ hybridization using different nonisotopic probes for detection of Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma and immunohistochemical correlation with anti-latent membrane protein antibody. **Laboratory investigation**, Baltimore, v. 67, n. 4, p. 457-464, Oct 1992.

BURKITT, D. A sarcoma involving the jaws in African children. **The British journal of surgery**, Bristol, v. 46, n. 197, p. 218-223, Nov 1958.

BURKITT, D. A tumour syndrome affecting children in tropical Africa. **Postgraduate medical journal**, London, v. 38, p. 71-79, Feb 1962.

CAMPO, E. et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. **Blood**, Washington, v. 117, n. 19, p. 5019-5032, May 2011.

CARBONE, A.; GLOGHINI, A.; DOTTI, G. EBV-associated lymphoproliferative disorders: classification and treatment. **The oncologist**, Dayton, v. 13, n. 5, p. 577-585, May 2008.

CARBONE, P. P. et al. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. **Cancer research**, Baltimore, v. 31, n. 11, p. 1860-1861, Nov 1971.

CASTAGNA, L. et al. Predictive value of early 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) during salvage chemotherapy in relapsing/refractory Hodgkin lymphoma (HL) treated with high-dose chemotherapy. **British journal of haematology**, Oxford, v. 145, n. 3, p. 369-372, May 2009.

CHANG, K. C. et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 up-regulates cytokines and correlates with older age and poorer prognosis in Hodgkin lymphoma. **Histopathology**, Oxford, Sept 2016. (Ahead of print).

CHESON, B. D. et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. **Journal of clinical oncology**, New York, v. 17, n. 4, p. 1244, Apr 1999.

CHESON, B. D. et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. **Journal of clinical oncology**, Alexandria, v. 25, n. 5, p. 579-586, Feb 2007.

CHESON, B. D. et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. **Journal of clinical oncology**, Alexandria, v. 32, n. 27, p. 3059-3068, Sept 2014.

CHETAILLE, B. et al. Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome. **Blood**, Washington, v. 113, n. 12, p. 2765-3775, Mar 2009.

CLARKE, C. A. et al. Epstein-Barr virus and survival after Hodgkin disease in a population-based series of women. **Cancer**, New York, v. 91, n. 8, p. 1579-1587, Apr 2001.

COHEN, C.; HAMILTON, D. G. Epidemiologic and histologic patterns of Hodgkin's disease: comparison of the black and white populations of Johannesburg, South Africa. **Cancer**, New York, v. 46, n. 1, p. 186-189, July 1980.

COHEN, J. A. Power primer. **Psychological bulletin**, Washington, v. 112, n. 1, p. 155-159, July 1992.

CROSS, R. M. Hodgkin's disease: histological classification and diagnosis. **Journal of clinical pathology**, London, v. 22, n. 2, p. 165-182, Mar 1969.

CUCCARO, A. et al. Prognostic factors in Hodgkin lymphoma. **Mediterranean journal of hematology and infectious diseases**, Roma, v. 6, n. 1, p. e2014053, 2014.

DELAHAYE-SOURDEIX, M. et al. A Novel Risk Locus at 6p21.3 for Epstein-Barr Virus-Positive Hodgkin Lymphoma. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**, Philadelphia, v. 24, n. 12, p. 1838-1843, Dec 2015.

DIEFENBACH, C. S. et al. Evaluation of the International Prognostic Score (IPS-7) and a Simpler Prognostic Score (IPS-3) for advanced Hodgkin lymphoma in the modern era. **British journal of haematology**, Oxford, v. 171, n. 4, p. 530-538, Nov 2015.

DIEHL, V. et al. Clinical presentation, course, and prognostic factors in lymphocyte-predominant Hodgkin's disease and lymphocyte-rich classical Hodgkin's disease: report from the European Task Force on Lymphoma Project on Lymphocyte-Predominant Hodgkin's Disease. **Journal of clinical oncology**, New York, v. 17, n. 3, p. 776-783, Mar 1999.

DIEPSTRA, A. et al. Latent Epstein-Barr virus infection of tumor cells in classical Hodgkin's lymphoma predicts adverse outcome in older adult patients. **Journal of clinical oncology**, Alexandria, v. 27, n. 23, p. 3815-3821, Aug 2009.

DINAND, V. et al. Hodgkin's lymphoma in Indian children: prevalence and significance of Epstein-Barr virus detection in Hodgkin's and Reed-Sternberg cells. **European journal of cancer**, Oxford, v. 43, n. 1m, p. 161-168, Jan 2007.

DUTTON, A. et al. Constitutive activation of phosphatidylinositol 3 kinase contributes to the survival of Hodgkin's lymphoma cells through a mechanism involving Akt kinase and mTOR. **The Journal of pathology**, Chichester, v. 205, n. 4, p. 498-506, Mar 2005.

EICH, H. T. et al. Intensified chemotherapy and dose-reduced involved-field radiotherapy in patients with early unfavorable Hodgkin's lymphoma: final analysis of the German Hodgkin Study Group HD11 trial. **Journal of clinical oncology**, Alexandria, v. 28, n. 27, p. 4199-4206, Sept 2010.

EICHENAUER, D. A. et al. Hodgkin's lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Hodgkin's Lymphoma: ESMO. **Clinical Practice Guidelines**, London, v. 25, p. iii70-75, Sept 2014. Supplement 3.

ELSAYED, A. A. et al. Prognostic significance of CD20 expression and Epstein-Barr virus (EBV) association in classical Hodgkin lymphoma in Japan: a clinicopathologic study. **Pathology international**, Carlton South, v. 64, n. 7, p. 336-345, July 2014.

ENGEL, M. et al. Improved prognosis of Epstein-Barr virus associated childhood Hodgkin's lymphoma: study of 47 South African cases. **Journal of clinical pathology**, London, v. 53, n. 3, p. 182-186, Mar 2000.

ENGERT, A. et al. Escalated-dose BEACOPP in the treatment of patients with advanced-stage Hodgkin's lymphoma: 10 years of follow-up of the GHSG HD9 study. **Journal of clinical oncology**, Alexandria, v. 27, n. 27, p. 4548-4554, Sept 2009.

ENGERT, A. et al. Reduced treatment intensity in patients with early-stage Hodgkin's lymphoma. **The New England journal of medicine**, Boston, v. 363, n. 7, p. 640-652, Aug 2010.

EPSTEIN, M. A.; BARR, Y. M. Cultivation in vitro of Human Lymphoblasts from Burkitt's malignant lymphoma. **Lancet**, London, v. 1, n. 7327, p. 252-253, Feb 1964.

EPSTEIN, M. A. et al. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. **The Journal of experimental medicine**, New York, v. 121, n. 5, p. 761-770, May 1965.

FLAVELL, K. J. et al. South Asian ethnicity and material deprivation increase the risk of Epstein-Barr virus infection in Hodgkin's disease. **British journal of cancer**, London, v. 85, n. 3, p. 350-356, Aug 2001.

FONSECA JÚNIOR, A. Classificação do Linfoma de Hodgkin: revisão histórica. **Acta scientiae medica**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 24-34, 2008.

FOSS, H. D. et al. Patterns of cytokine gene expression in infectious mononucleosis. **Blood**, New York, v. 83, n. 3, p. 707-712, Feb 1994.

FRANKLIN, J. et al. Is the international prognostic score for advanced stage Hodgkin's disease applicable to early stage patients? German Hodgkin Lymphoma Study Group. **Annals of oncology**, Dordrecht, v. 11, n. 5, p. 617-623, May 2000.

FRANSSILA, K. O.; KALIMA, T. V.; VOUTLAINEN, A. Histologic classification of Hodgkin's disease. **Cancer**, New York, v. 20, n. 10, p. 1594-1601, Oct 1967.

GHESQUIÈRES, H. et al. Cytokine gene polymorphisms and progression-free survival in classical Hodgkin lymphoma by EBV status: results from two independent cohorts. **Cytokine**, Oxford, v. 64, n. 2, p. 523-531, Nov 2013.

GLASER, S. L. et al. Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data. **International journal of cancer**, Genève, v. 70, n. 4, p. 375-382, Feb 1997.

GLAVINA-DURDOV, M. et al. Assessment of the prognostic impact of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 expression in Hodgkin's disease. **British journal of cancer**, London, v. 84, n. 9, p. 1227-1234, May 2001.

GOBBI, P. G. et al. Hodgkin lymphoma. **Critical reviews in oncology/hematology**, Amsterdam, v. 85, n. 2, p. 216-237, Feb 2013.

GOPAL, A. K. et al. Durable remissions in a pivotal phase 2 study of brentuximab vedotin in relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. **Blood**, Washington, v. 125, n. 8, p. 1236-1243, Feb 2015.

GORDON, L. I. et al. Randomized phase III trial of ABVD versus Stanford V with or without radiation therapy in locally extensive and advanced-stage Hodgkin lymphoma: an intergroup study coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group (E2496). **Journal of clinical oncology**, Alexandria, v. 31, n. 6, p. 684-691, Feb 2013.

GREER, J. P. et al. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 13 ed. Philadelphia: Lippincott Williams& Wilkins, 2014.

GULLEY, M. L. Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases. **The Journal of molecular diagnostics**, Bethesda, v. 3, n. 1, p. 1-10, Feb 2001.

GULLEY, M. L.; TANG, W. Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. **The Journal of molecular diagnostics**, Bethesda, v. 10, n. 4, p. 279-292, July 2008.

HARRIS, N. L. et al. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. **Annals of oncology**, Dordrecht, v. 10, n. 12, p. 1419-1432, Dec 1999.

HASENCLEVER, D.; DIEHL, V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. **The New England journal of medicine**, Boston, v. 339, n. 21, p. 1506-1514, Nov 1998.

HENLE, G.; HENLE, W.; DIEHL, V. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 59, n. 1, p. 94-101, Jan 1968.

HENLE, W.; HUMMELER, K.; HENLE, G. Antibody coating and agglutination of virus particles separated from the EB3 line of Burkitt lymphoma cells. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 92, n. 1, p. 269-271, July 1966.

HERLING, M. 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. **Clinical cancer research**, Denville, v. 9, n. 6, p. 2114-2120, June 2003.

HJALGRIM, H. et al. Characteristics of Hodgkin's lymphoma after infectious mononucleosis. **The New England journal of medicine**, Boston, v. 349, n. 14, p. 1324-1332, Oct 2003.

HODGKIN, T. On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. **Medico-chirurgical transactions**, London, v. 17, p. 68-114, Jan 1832.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. **Fundamentos em hematologia**. Tradução de Renato Failace. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

HOLLANDER, P. et al. Autoimmune and Atopic Disorders and Risk of Classical Hodgkin Lymphoma. **American journal of epidemiology**, Cary, v. 182, n. 7, p. 624-632, Oct 2015.

HOWLADER, N. et al. **SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012**. Bethesda: National Cancer Institute, based on November 2014.

HUANG, X. et al. HLA associations in classical Hodgkin lymphoma: EBV status matters. **PloS one**, San Francisco, v. 7, n. 7, p. e39986, July 2012a.

HUANG, X. et al. HLA-A*02:07 is a protective allele for EBV negative and a susceptibility allele for EBV positive classical Hodgkin lymphoma in China. **PloS one**, San Francisco, v. 7, n. 2, p. e31865, Feb 2012b.

HUMMEL, M. et al. EBV infection patterns in Hodgkin's disease and normal lymphoid tissue: expression and cellular localization of EBV gene products. **British journal of haematology**, Oxford, v. 82, n. 4, p. 689-694, Dec 1992.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.

Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Inca, c1996-2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/tabelaestados.asp?UF=BR>>. Acesso em: 2 jul. 2016.

JACKSON JR., H.; PARKER JR., F. Hodgkin's Disease – General Considerations. **The New England journal of medicine**, Boston, v. 230, n. 1, p. 1-8, Jan 1944.

JARRETT, R. F. et al. Impact of tumor Epstein-Barr virus status on presenting features and outcome in age-defined subgroups of patients with classic Hodgkin lymphoma: a population-based study. **Blood**, Washington, v. 106, n. 7, p. 2444-2451, Oct 2005.

JOHNSON, P. C. et al. Modeling HLA associations with EBV-positive and -negative Hodgkin lymphoma suggests distinct mechanisms in disease pathogenesis. **International journal of cancer**, New York, v. 137, n. 5, p. 1066-1075, Sept 2015.

JOOS, S. et al. Classical Hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2. **Blood**, Washington, v. 99, n. 4, p. 1381-1387, Feb 2002.

JOSTING, A. 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. **Journal of clinical oncology**, New York, v. 20, n. 1, p. 221-230, Jan 2002.

KAMPER, P. et al. Tumor-infiltrating macrophages correlate with adverse prognosis and Epstein-Barr virus status in classical Hodgkin's lymphoma. **Haematologica**, Pavia, v. 96, n. 2, p. 269-276, Feb 2011.

KANAKRY, J. A. et al. Plasma Epstein-Barr virus DNA predicts outcome in advanced Hodgkin lymphoma: correlative analysis from a large North American cooperative group trial. **Blood**, Washington, v. 121, n. 18, p. 3547-3553, May 2013.

KANZLER, H. et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. **The Journal of experimental medicine**, New York, v. 184, n. 4, p. 1495-1505, Oct 1996.

KAPATAI, G.; MURRAY, P. Contribution of the Epstein–Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. **Journal of clinical pathology**, London, v. 60, n. 12, p. 1342-1349, Dec 2007.

KEEGAN, T. H. et al. Epstein-Barr virus as a marker of survival after Hodgkin's lymphoma: a population-based study. **Journal of clinical oncology**, Alexandria, v. 23, n. 30, p. 7604-7613, Oct 2005.

KELLER, A. R. et al. Correlation of histopathology with other prognostic indicators in Hodgkin's disease. **Cancer**, New York, v. 22, n. 3, p. 487-499, Sept 1968.

KERESZTES, K. et al. Association between the Epstein-Barr virus and Hodgkin's lymphoma in the North-Eastern part of Hungary: effects on therapy and survival. **Acta haematologica**, Basel, v. 116, n. 2, p. 101-107, Aug 2006.

KOH, Y. W. Impact of the Epstein-Barr virus positivity on Hodgkin's lymphoma in a large cohort from a single institute in Korea. **Annals of hematology**, Berlin, v. 91, n. 9, p. 1403-1412, Sept 2012.

KRUGMANN, J. et al. Longer failure-free survival interval of Epstein-Barr virus-associated classical Hodgkin's lymphoma: a single-institution study. **Modern pathology**, Baltimore, v. 16, n. 6, p. 566-573, June 2003.

KÜPPERS, R. Molecular biology of Hodgkin lymphoma. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology**, Washington, p. 491-496, 2009.

KURUVILLA, J.; KEATING, A.; CRUMP, M. How I treat relapsed and refractory Hodgkin lymphoma. **Blood**, Washington, v. 117, n. 16, p. 4208-4217, Apr 2011.

KWEE, T. C.; KWEE, R. M.; NIEVELSTEIN, R. A. Imaging in staging of malignant lymphoma: a systematic review. **Blood**, Washington, v. 111, n. 2, p. 504-516, Jan 2008.

KWON, J. M. et al. The effect of Epstein-Barr virus status on clinical outcome in Hodgkin's lymphoma. **Annals of hematology**, Berlin, v. 85, n. 7, p. 463-468, July 2006.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, Washington, v. 33, n. 1, p. 159-174, Mar 1977.

LANIER, L. L. Evolutionary struggles between NK cells and viruses. **Nature reviews. Immunology**, London, v. 8, n. 4, p. 259-268, Apr 2008.

LEVINE, P. H. et al. Elevated antibody titers to Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. **Cancer**, New York, v. 27, n. 2, p. 416-421, Feb 1971.

LISTER, T. A. et al. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: cotswolds meeting. **Journal of clinical oncology**, New York, v. 7, n. 11, p. 1630-1636, Nov 1989.

LUKES, R. J. Hodgkin's disease. Prognosis and relationship of histologic features to clinical stage. **JAMA**, Chicago, v. 190, p. 914-915, Dec 1964.

LUKES, R. J.; BUTLER, J. J. The pathology and nomenclature of Hodgkin's disease. **Cancer research**, Chicago, v. 26, n. 6, p. 1063-1083, June 1966.

MAGGIO, E. et al. Chemokines, cytokines and their receptors in Hodgkin's lymphoma cell lines and tissues. **Annals of oncology**, London, v. 13, p. 52-56, 2002. Supplement 1.

MALPIGHI, M. **De viscerum structura exercitatio anatomica**. Bolonha: J. Montij, 1666.

MCAULAY, K. A.; JARRETT. R. F. Human leukocyte antigens and genetic susceptibility to lymphoma. **Tissue antigens**, Oxford, v. 86, n. 2, p. 98-113, Aug 2015.

MERLI, F. L. et al. Long-term results of the HD2000 trial comparing ABVD versus BEACOPP versus COPP-EBV-CAD in untreated patients with advanced Hodgkin lymphoma: a study by Fondazione Italiana Linfomi. **Journal of clinical oncology**, Alexandria, v. 34, n. 11, p. 1175-1181, Apr 2016.

MERLO, A. et al. The interplay between Epstein-Barr virus and the immune system: a rationale for adoptive cell therapy of EBV-related disorders. **Haematologica**, Pavia, v. 95, n. 10, p. 1769-1777, Oct 2010.

MOCCIA, A. A. et al. International prognostic score in advanced-stage Hodgkin's lymphoma: altered utility in the modern era. **Journal of clinical oncology**, Alexandria, v. 30, n. 27, p. 3383-3388, Sept 2012.

MONTGOMERY, N. D. et al. Karyotypic abnormalities associated with Epstein-Barr virus status in classical Hodgkin lymphoma. **Cancer genetics**, New York, v. 209, n. 9, p. 408-416, Sept 2016.

MORTON, L. M. et al. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. **Blood**, Washington, v. 107, n. 1, p. 265-276, Jan 2006.

MOSKOWITZ, C. H. et al. PD-1 blockade with the monoclonal antibody pembrolizumab (MK-3475) in patients with classical Hodgkin lymphoma after brentuximab vedotin failure: preliminary results from a phase 1b study (KEYNOTE-013). **Blood**, Washington, v. 124, n. 21, p. 290, Dec 2014.

MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. **Immunological reviews**, Oxford, v. 226, p. 205-218, Dec 2008.

MOULIN-ROMSEE, G. et al. (18)F-FDG PET/CT bone/bone marrow findings in Hodgkin's lymphoma may circumvent the use of bone marrow trephine biopsy at diagnosis staging. **European journal of nuclear medicine and molecular imaging**, Berlin, v. 37, n. 6, p. 1095-1105, June 2010.

MOZAHEB, Z. Epidemiology of Hodgkin's lymphoma. **Health**, Irvine, v. 5, n. 5A, p. 17-22, 2013.

MUELLER, N. Hodgkin's disease. In: SCHONOTTENFELD, D. et al. (Ed.). **Cancer epidemiology and prevention**. 2. ed. New York: Oxford University Press, 1992. p. 893-919. v. 2.

NARESH, K. et al. Epstein-Barr virus association in classical Hodgkin's disease provides survival advantage to patients and correlates with higher expression of proliferation markers in Reed-Sternberg cells. **Annals of oncology**, Boston, v. 11, n. 1, p. 91-96, Jan 2000.

NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK. **Clinical practice guidelines in oncology: Hodgkin Lymphoma**. Version 3. 2016. Washington: NCCN, 2016.

NONOYAMA, M. et al. DNA of Epstein-Barr virus detected in tissue of Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 70, n. 11, p. 3265-3268, Nov 1973.

ODUMADE, O. A.; HOGQUIST, K. A.; BALFOUR, H. H. Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v. 24, n. 1, p. 193-209, Jan 2011.

- PAVLOVIC, A. et al. Classical Hodgkin lymphoma with positive Epstein-Barr Virus status is associated with more FOXP3 regulatory T cells. **Medical science monitor**, Smithtown, v. 22, p. 2340-2346, July 2016.
- PILERI, S. A. et al. Hodgkin's lymphoma: the pathologist's viewpoint. **Journal of clinical pathology**, London, v. 55, n. 3, p. 162-176, Mar 2002.
- PRESS, O. W. et al. US Intergroup Trial of response-adapted therapy for stage III to IV Hodgkin lymphoma using early interim fluorodeoxyglucose-positron emission tomography imaging: Southwest Oncology Group S0816. **Journal of clinical oncology**, Alexandria, v. 34, n. 17, p. 2020-2027, June 2016.
- QI, Z. L. et al. Comparison of three methods for the detection of Epstein-Barr virus in Hodgkin's lymphoma in paraffin-embedded tissues. **Molecular medicine reports**, Athens, v. 7, n. 1, p. 89-92, Jan 2013.
- QUAN, T. E. et al. Epstein-Barr virus promotes interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. **Arthritis and rheumatism**, Atlanta, v. 62, n. 6, p. 1693-1701, June 2010.
- RAEMAEEKERS, J. M. et al. Omitting radiotherapy in early positron emission tomography-negative stage I/II Hodgkin lymphoma is associated with an increased risk of early relapse: clinical results of the preplanned interim analysis of the randomized EORTC/LYSA/FIL H10 trial. **Journal of clinical oncology**, Alexandria, v. 32, n. 12, p. 1188-1194, Apr 2014.
- RE, D. et al. From Hodgkin disease to Hodgkin lymphoma: biologic insights and therapeutic potential. **Blood**, Washington, v. 105, n. 12, p. 4553-4560, June 2005.
- RESSING, M. E. et al. Epstein-Barr virus evasion of CD8(+) and CD4(+) T cell immunity via concerted actions of multiple gene products. **Seminars in cancer biology**, London, v. 18, n. 6, p. 397-408, Dec 2008.
- ROACH 3rd, M. et al. Prognostic factors for patients relapsing after radiotherapy for early-stage Hodgkin's disease. **Journal of clinical oncology**, New York, v. 8, n. 4, p. 623-629, Apr 1990.
- ROEMER, M. G. et al. PD-L1 and PD-L2 genetic alterations define classical Hodgkin lymphoma and predict outcome. **Journal of clinical oncology**, Alexandria, v. 34, n. 23, p. 2690-2697, Aug 2016.

ROSSI, C. et al. Interim 18F-FDG PET SUV max reduction is superior to visual analysis in predicting outcome early in Hodgkin lymphoma patients. **Journal of nuclear medicine**, Reston, v. 55, n. 4, p. 569-573, Apr 2014.

SCHWARTING, R. et al. BER-H2: a new anti-Ki-1 (CD30) monoclonal antibody directed at a formol-resistant epitope. **Blood**, New York, v. 74, n. 5, p. 1678-1689, Oct 1989.

SCOTT, D. W. et al. Gene expression-based model using formalin-fixed paraffin-embedded biopsies predicts overall survival in advanced-stage classical Hodgkin lymphoma. **Journal of clinical oncology**, Alexandria, v. 31, n. 6, p. 692-700, Feb 2013.

SHIMABUKURO-VORNHAGEN, A. et al. Lymphocyte-rich classical Hodgkin's lymphoma: clinical presentation and treatment outcome in 100 patients treated within German Hodgkin's Study Group trials. **Journal of clinical oncology**, Alexandria, v. 23, n. 24, p. 5739-5745, Aug 2005.

SKOETZ, N. et al. Effect of initial treatment strategy on survival of patients with advanced-stage Hodgkin's lymphoma: a systematic review and network meta-analysis. **The Lancet. Oncology**, London, v. 14, n. 10, p. 943-952, Sept 2013.

SMETANA, H. F.; COHEN, B. M. Mortality in relation to histologic type in Hodgkin's disease. **Blood**, New York, v. 11, n. 3, p. 211-224, Mar 1956.

SOUZA, E. M. et al. Impact of Epstein-Barr virus in the clinical evolution of patients with classical Hodgkin's lymphoma in Brazil. **Hematological oncology**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 137-141, Sept 2010.

STARK, G. L. et al. Hodgkin's disease in the elderly: a population-based study. **British journal of haematology**, Oxford, v. 119, n. 2, p. 432-440, Nov 2002.

STEIDL, C.; CONNORS, J. M.; GASCOYNE, R. D. Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma: increasing evidence of the importance of the microenvironment. **Journal of clinical oncology**, Alexandria, v. 29, n. 14, p. 1812-1826, May 2011.

STEIDL, C. et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. **The New England journal of medicine**, Boston, v. 362, n. 10, p. 875-885, Mar 2010.

STEIDL, C. et al. Gene expression profiling of microdissected Hodgkin Reed-Sternberg cells correlates with treatment outcome in classical Hodgkin lymphoma. **Blood**, Washington, v. 120, n. 17, p. 3530-3540, Oct 2012.

STEVENS, S. J.; PRONK, I.; MIDDELDORP, J. M. Toward standardization of Epstein-Barr virus DNA load monitoring: unfractionated whole blood as preferred clinical specimen. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 39, n. 4, p. 1211-1216, Apr 2001.

SVEDMYR, E. et al. Virologic, immunologic, and clinical observations on a patient during the incubation, acute, and convalescent phases of infectious mononucleosis. **Clinical immunology and immunopathology**, New York, v. 30, n. 3, p. 437-50, Mar 1984.

SWERDLOW, S. H. et al. **WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. 4. ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008.

SWERDLOW, S. H. et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. **Blood**, Washington, v. 127, n. 20, p. 2375-2390, May 2016.

TADMOR, T. et al. Absolute monocyte count and lymphocyte-monocyte ratio predict outcome in nodular sclerosis Hodgkin lymphoma: evaluation based on data from 1450 patients. **Mayo Clinic proceedings**, Oxford, v. 90, n. 6, p. 756-764, June 2015.

TAN, K. L. et al. Tumor-associated macrophages predict inferior outcomes in classic Hodgkin lymphoma: a correlative study from the E2496 Intergroup trial. **Blood**, Washington, v. 120, n. 16, p. 3280-3287, Oct 2012.

THOMAS, R. K. et al. Epidemiology and etiology of Hodgkin's lymphoma. **Annals of oncology**, London, v. 13, p. 147-152, 2002. Supplement 4.

TIERNEY, R. J. et al. Epstein-Barr virus latency in blood mononuclear cells: analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state. **Journal of virology**, Baltimore, v. 68, n. 11, p. 7374-85, Nov 1994.

TIRELLI, U. et al. Hodgkin's disease and human immunodeficiency virus infection: clinicopathologic and virologic features of 114 patients from the Italian Cooperative Group on AIDS and Tumors. **Journal of clinical oncology**, New York, v. 13, n. 7, p. 1758-1767, July 1995.

UCCINI, S. et al. High frequency of Epstein-Barr virus genome detection in Hodgkin's disease of HIV-positive patients. **International journal of cancer**, Genève, v. 46, n. 4, p. 581-585, Oct 1990.

URAYAMA, K. Y. et al. Genome-wide association study of classical Hodgkin lymphoma and Epstein-Barr virus status-defined subgroups. **Journal of the National Cancer Institute**, Cary, v. 104, n. 3, p. 240-253, Feb 2012.

VASSALLO, J. et al. Expression of Epstein-Barr virus in classical Hodgkin's lymphomas in Brazilian adult patients. **Haematologica**, Pavia, v. 86, n. 11, p. 1227-1228, Nov 2001.

VASSALLO, J. et al. Histological classification of 1,025 cases of Hodgkin's lymphoma from the State of São Paulo, Brazil. **São Paulo medical journal**, São Paulo, v. 123, n. 3, p. 134-136, May 2005.

VASSILAKOPOULOS, T. P. et al. Development and validation of a clinical prediction rule for bone marrow involvement in patients with Hodgkin lymphoma. **Blood**, Washington, v. 105, n. 5, p. 1875-1880, Mar 2005.

VOCKERODT, M. et al. The Epstein-Barr virus and the pathogenesis of lymphoma. **The Journal of pathology**, Chichester, v. 235, n. 2, p. 312-22, Jan 2015.

VON TRESCKOW, B. et al. Dose-intensification in early unfavorable Hodgkin's lymphoma: final analysis of the German Hodgkin Study Group HD14 trial. **Journal of clinical oncology**, Alexandria, v. 30, n. 9, p. 907-13, Mar 2012.

WEISS, L. M. et al. Epstein-Barr viral DNA in tissues of Hodgkin's disease. **The American journal of pathology**, Philadelphia, v. 129, n. 1, p. 86-91, Oct 1987.

WEISS, L. M. et al. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease. A correlative in situ hybridization and polymerase chain reaction study. **The American journal of pathology**, Philadelphia, v. 139, n. 6, p. 1259-1265, Dec 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O)**. 3. ed. Geneva: WHO, 2000.

YOUNES, A. et al. Brentuximab vedotin (SGN-35) for relapsed CD30-positive lymphomas. **The New England journal of medicine**, Boston, v. 363, n. 19, p. 1812-1821, Nov 2010.

YOUNES, A. et al. Results of a pivotal phase II study of brentuximab vedotin for patients with relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. **Journal of clinical oncology**, Alexandria, v. 30, n. 18, p. 2183-2189, June 2012.

ZANDER, T.; WIEDENMANN, S.; WOLF, J. Prognostic factors in Hodgkin's lymphoma. **Annals of oncology**, London, v. 13, p. 67-74, 2002. Supplement 1.

ZUKERBERG, L. R. et al. Coexpression of CD15 and CD20 by Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. **The American journal of pathology**, Philadelphia, v. 139, n. 3, p. 475-483, Sept 1991.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP HU/UFJF
JUIZ DE FORA – MG – BRASIL

Pesquisador Responsável: Graziela Toledo Costa Mayrink
Endereço: Rua Catulo Breviglieri, s/n – Bairro: Sta Catarina.
CEP: 36036-000 – Juiz de Fora – MG
Fone: (32) 91096682
E-mail: grazimed@hotmail.com

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa "Detecção do Epstein-Barr vírus nas células tumorais de pacientes portadores de Linfoma de Hodgkin: uma avaliação prognóstica". Neste estudo pretendemos identificar a presença do Epstein-Barr vírus (EBV) em material anatomopatológico (laminas e parafina), e avaliar os dados encontrados com a ocorrência de recidiva da doença (Linfoma de Hodgkin – LH). O motivo que nos leva a estudar é a tentativa de conhecer melhor o comportamento da doença (Linfoma de Hodgkin).

Para a realização da coleta de dados, acessaremos as informações do seu prontuário, com o intuito de caracterizar os pacientes analisados. Serão coletados dados a respeito da data do diagnóstico, medicações utilizadas, entre outros.

Para a análise laboratorial, solicitamos o consentimento para uso de material anatomopatológico que o Sr. já possua, encaminharemos o material para análise laboratorial para identificação da presença do Epstein-Barr vírus.

Consideramos esta pesquisa importante para conhecermos o perfil dos pacientes atendidos no Serviço de Hematologia e Transplante de Medula Óssea do HU/UFJF e ASCOMCER, com a tentativa de identificar fatores que possam interferir na recidiva da doença.

Para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador. Este estudo apresenta risco mínimo, ou seja, mesmo risco de atividades rotineiras, a perda de dados e constrangimento. Apesar disso você tem assegurado o direito de ressarcimento ou indenização no caso de quaisquer danos eventualmente produzidos pela pesquisa.

O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, ou seja, nenhuma informação pessoal será divulgada.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O (A) Sr (a) não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável e a outra será fornecida a você. Caso haja danos decorrentes dos riscos previstos, o pesquisador assumirá a responsabilidade pelos mesmos.

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos do estudo "Detecção do Epstein-Barr vírus nas células tumorais de pacientes portadores de Linfoma de Hodgkin: uma avaliação prognóstica", de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Juiz de Fora, _____ de _____ de 20__ .

Nome	Assinatura participante	Data
------	-------------------------	------

Nome	Assinatura testemunha	Data
------	-----------------------	------

Nome	Assinatura pesquisador	Data
------	------------------------	------

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o
 CEP HU – Comitê de Ética em Pesquisa HU/UFJF
 Hospital universitário Unidade Santa Catarina
 Prédio da Administração Sala 27
 CEP 36036-110
 E-mail: cep.hu@uff.edu.br

APÊNDICE B – Formulário para obtenção dos dados dos pacientes

Formulário de coleta de dados do Projeto Linfoma de Hodgkin :

Número formulário:	Data: ___/___/___
Hospital:	
Registro do prontuário :	

Nome:		
Iniciais:	DN: ___/___/___	Identidade/CPF/CNS:
Endereço:		
Telefones: () ()	Email:	

Data do diagnóstico: (IMH) ___/___/___

Data do TMO (infusão): ___/___/___

TMO : auto alo SP

Sinais/ Sintomas relacionados:

Febre __S__N

Sudorese noturna __S__N

Emagrecimento: __S__N

Prurido: __S__N

Lesões Dermatológicas: __S__N

Linfonodomegalias: __S__N

Qts?

Extranodal: __S__N

Idade ao diagnóstico:

Idade recidiva:

Sexo:

Etnia:

LDH:

VHS:

Albumina:

Ac. Úrico:

Hemograma:

HB:

LG:

Plaqu:

Anti EBV: IgG __S__N

IgM __S__N

Sorologias positivas:

Perfomance status:

Infecção prévia:

Comorbidades:

Doença auto imune:

HIV? __S__N

Drogas imunossupressoras:

Família: __S__N

Tipo histológico: (IMH) _____ Data: ___/___/_____

- 1- Predominância linfocitária nodular
- 2- Rico em linfócitos
- 3- Esclerose nodular
- 4- Celularidade mista
- 5- Depleção linfocitária
- 6- Não especificado

Transformação após diagnóstico: __S __N Especificar:

Data: ___/___/_____

Estadiamento:

- 1- ___ I - envolvimento de uma cadeia ganglionar ou estrutura linfóide (baço, timo, anel de waldeyer) ou envolvimento de local extralinfático (IE)
- 2- ___ II- envolvimento de duas ou mais cadeias ganglionares localizadas no mesmo lado do diafragma, que pode ter contiguidade com um local extralinfático (IIE)
- 3- ___ III- envolvimento de gânglios linfáticos em ambos os lados do diafragma, que pode ter contiguidade com um local extralinfático (IIIE), ou envolvimento do baço (IIIS), ou ambos (IIIES)
- 4- ___ IV – envolvimento disseminado de um ou mais órgãos extralinfáticos, com ou sem envolvimento ganglionar, ou ainda envolvimento de um local extralinfático com envolvimento ganglionar à distância. Inclui ainda qualquer envolvimento do fígado, medula óssea, pulmões ou líquido cefalorraquidiano.
- 5- ___ outro órgão envolvido: especificar:
- 6- ___ desconhecido

BMO: __S __N

Sintomas sistêmicos ao diagnóstico:

- 1 ___ A sem sintomas B
- 2 ___ B (febre, sudorese noturna, perda de peso inexplicada > 10 % em 6 meses antes do tratamento)
- 3 ___ desconhecido

Envolvimento esplênico ou extranodal no diagnóstico:

- 1- ___S
- 2- ___N
- 3- ___desconhecido

LOCAL	SIM	NAO
OSSO		
MÉDULA ÓSSEA		
CÉREBRO		
LCR		
ESPAÇO EPIDURAL		
TGI		
RIM		
FÍGADO		
PULMÃO		
PLEURA		
PELE		
BAÇO		
OUTRO LOCAL / ESPECIFICAR		

LDH no diagnóstico:

- 1- ___ conhecido
 ___ U/L ___ m kA/L
 2- ___ desconhecido

Acima do limite normal: _____

Karnofsky: _____ ECOG: _____

Tratamento:

QT	1ª linha		2ª linha	
	S	N	S	N
Data de início:				
Data de término:				
alemtuzumab				
ibritumomab tiuxetan				
rituximabe (anti-CD20)				
tositumomab (Bexxar)				
outro anticorpo monoclonal / especificar				
bleomicina				
carmustina				
carboplatina				
cisplatina				
cladribina				
corticosteroides				
ciclofosfamida				
citarabina				
dacarbazina				
doxorubicina				
etoposide				
fludarabina				
gemcitabina				

ifosfamida				
methotrexate				
mitoxantrona				
mostarda nitrogenada				
pentostatina				
procarbazina				
vinblastina				
vincristina				
outro tratamento / especificar				

	1ª linha		2ª linha	
RT	S	N	S	N
Data de inicio:				
Data de término:				
mediastino				
outros sitios / especificar				

	1ª linha		2ª linha	
Cirurgia	S	N	S	N
Data:				
Esplenectomia				
Outro local / especificar				

	1ª linha		2ª linha	
	S	N	S	N
Esta foi a terapia para "priming de stem cell?"				

	1ª linha		2ª linha	
Melhor resposta da linha de terapia	RC	RCI	RC	RCI
	RP	NR / DS	RP	NR / DS
	PROG	DESC. OU NÃO AVAL.	PROG	DESC. OU NÃO AVAL.
Data de avaliação da resposta				

Legenda:

RC: remissão completa: desaparecimento complete de toda doença conhecida por >/ 4 semanas

RCI: remissão completa indeterminada: a definição acima com a exceção de persistir anormalidades radiológicas de significado desconhecido

RP: remissão parcial :>/ 50 % redução no maior diâmetro de todos os locais de doença conhecida e sem novos sítios de doença

NR/DS: não respondeu / doença estável: < 50 % redução no maior diâmetro de todos os sítios de doença conhecida

Prog: aumento do tamanho da doença conhecida ou novos locais de doença.

	1ª linha		2ª linha	
	S	N	S	N
Ocorreu recidiva ou progressão após essa linha de terapia				
Data da recaída / progressão:				

Avaliação da doença pré- TMO:

Tem PET? ___ S ___ N
Foi positivo? ___ S ___ N

Envolvimento nodal antes do TMO? ___ S ___ N
Especificar o número total de regiões nodais envolvidas: _____

- 1- ___ uma região nodal
- 2- ___ duas ou mais
- 3- ___ desconhecida

Especificar o maior tamanho da massa: _____ cm x _____ cm

No momento de avaliação pré TMO, presença de envolvimento extra nodal?

___ S
___ N
___ Desconhecida

LOCAL	SIM	NÃO
OSSO		
MÉDULA ÓSSEA		
CÉREBRO		
LCR		
ESPAÇO EPIDURAL		

TGI		
RIM		
FIGADO		
PULMÃO		
PLEURA		
PELE		
BAÇO		
OUTRO LOCAL / ESPECIFICAR		

Foi realizado teste molecular para avaliação de status de doença pré tmo?

___ S ___ N

Data: ___/___/___

Doença foi detectada? ___ S ___ N

Qual a sensibilidade do linfoma à QT realizada antes do TMO? (antes ≤ 6 meses antes do TMO)

- ___ sensível: > / 50 % de redução no diâmetro bidimensional de todos os sítios de doença , sem novos locais
 ___ resistente: < 50 % redução no diâmetro de todos os sítios de doença, ou desenvolvimento de novos locais
 ___ não tratado: nenhuma terapia administrada nos 6 meses antes do TMO
 ___ desconhecida

Qual foi o status de remissão da doença imediatamente antes do regime preparatório para o TMO?

- 1- ___ doença não tratada
- 2- ___ falência na indução primária- resistente: nunca em remissão completa mas com doença estável ou progressiva no tratamento
- 3- ___ falência de indução primária – sensível : nunca em remissão completa mas com remissão parcial n o tratamento
- 4- ___ falência de indução primária – sensibilidade desconhecida
- 5- ___ remissão completa primária: sem recaída de medula óssea ou extramedular antes do TMO
- 6- ___ remissão completa secundária
- 7- ___ remissão completa terciária ou subsequente
- 8- ___ remissão completa primária indeterminada: como acima com exceção de persistência de anormalidades radiológicas de significado desconhecido
- 9- ___ remissão completa secundária indeterminada
- 10- ___ remissão completa terciária ou subsequente indeterminada
- 11- ___ recaída primária - não tratada: inclui recaída de medula óssea e extramedular
- 12- ___ recaída primária – resistente: doença estável ou progressiva com tratamento
- 13 - ___ recaída primária – sensível: remissão parcial: se remissão completa , classificar como item 6
- 14 - ___ recaída primária – sensibilidade desconhecida
- 15 - ___ recaída secundária – não tratada: inclui recaída de medula óssea e extramedular
- 16 - ___ recaída secundária – resistente: doença estável ou progressiva com tratamento
- 17 ___ recaída secundária – sensível: remissão parcial : se remissão completa, considerar como item 7
- 18 - ___ recaída secundária – sensibilidade desconhecida
- 19 - ___ recaída terciária ou subsequente – não tratada: inclui recaída de medula óssea e extramedular
- 20- ___ recaída terciária ou subsequente – resistente: doença estável ou progressiva com tratamento
- 21 - ___ recaída terciária ou subsequente – sensível : remissão parcial (se conseguir remissão completa, considerar como item 7
- 22- ___ recaída terciária ou melhor sensibilidade desconhecida

Data da avaliação mais recente do status da doença antes do TMO:

Assinatura: _____

Nome completo: _____

Tel: _____

E- mail: _____

APÊNDICE C – Demais resultados encontrados na pesquisa

Tabela 1 – Características do grupo incluído (n = 29) e excluído (n = 30)

Característica	Incluídos		Excluídos		p
	n	%	n	%	
Sexo					
Feminino	14	48,3	15		0,89
Masculino	15	51,7	15		
Idade					
Menor que 45 anos	22	75,9	26		0,29
Maior ou igual a 45 anos	7	24,1	4		
Subtipo histológico					
Esclerose nodular	19	65,5	25		0,02
Celularidade mista	10	34,5	5		
Estadio clínico					
Limitado	18	62,1	12		0,09
Avançado	11	37,9	12		
DHL*					
Normal	15	71,4	10		0,41
Aumentado	6	28,6	7		
Número de Sítios nodais					
Menor que três	10	34,5	7		0,35
Três ou mais	19	65,5	21		
Sítios extranodais					
Presente	5	17,2	13		0,02
Ausente	24	82,8	15		
Sintomas B					
Presente	15	51,7	20		0,18
Ausente	14	48,3	9		
Doença Bulky					
Presente	9	31,0	13		0,23
Ausente	20	69,0	15		

Fonte: A autora

Legenda:

DHL – Desidrogenase láctica

Notas: * Dado ausente em 8 pacientes;

p < 0,05;

Total de pacientes do Grupo excluído: 31. Porém 1 paciente não apresentava dados no prontuário e foi excluído do estudo e dessa análise.

Tabela 2 – Características da população *versus* recidiva/óbito

Característica	Recidiva/Óbito Sim (n=10)		Recidiva/Óbito Não (n=19)		p	OR (IC95%)
	N	%	N	%		
Idade (anos)						
≥ 45	1	14,3	6	85,7	0,37	0,24 (0,02 – 2,36)
<45	9	40,9	13	59,1		
Sexo						
Masculino	5	33,3	10	66,7	0,89	0,90 (0,19 – 4,16)
Feminino	5	35,7	9	64,3		
Subtipo Histológico						
Celularidade mista	3	30,0	7	70,0	0,71	1,36 (0,26 – 7,04)
Esclerose nodular	7	36,8	12	63,2		
Estadio clínico						
Avançado	4	33,3	7	66,7	0,87	1,14 (0,24 – 5,50)
Limitado	6	36,4	12	63,6		
Envolvimento nodal						
≥ 3 áreas	8	42,1	11	57,9	0,23	2,91 (0,48 – 17,55)
<3 áreas	2	20,0	8	80,0		
Sintomas B						
Sim	8	53,3	7	46,7	0,05*	6,86 (1,12 – 41,83)
Não	2	14,3	12	85,7		
EBV						
Positivo	2	18,2	9	81,8	0,23	0,28 (0,05 – 1,67)
Negativo	8	44,4	10	55,6		

Fonte: A autora

Nota: *Diferença estatisticamente significativa, $p < 0,05$

Tabela 3 – Concordância da Classificação do subtipo histológico

Subtipo Histológico	Subtipo Histológico Revisado		Total
	Celularidade mista n (%)	Esclerose nodular n(%)	
Celularidade mista	10 (76,9)	3 (23,1)	13 (100,0)
Esclerose nodular	0 (0,0)	16 (100,0)	16 (100,0)
Total	10 (34,5)	19 (65,5)	29 (100,0)

Fonte: A autora

Tabela 4 – Positividade do vírus Epstein-Barr pelas técnicas de inumo-hisquímica e hibridização *in situ* cromogênica

IHQ / LPM-1	CISH / EBER		Total
	EBV negativo n (%)	EBV positivo n(%)	
EBV negativo	17 (100,0)	0 (0,0)	17 (100,0)
EBV positivo	1 (8,3)	11 (91,7)	12 (100,0)
Total	18 (62,1)	11 (37,9)	29 (100,0)

Fonte: A autora

Legenda:

IHQ – Imuno-histoquímica

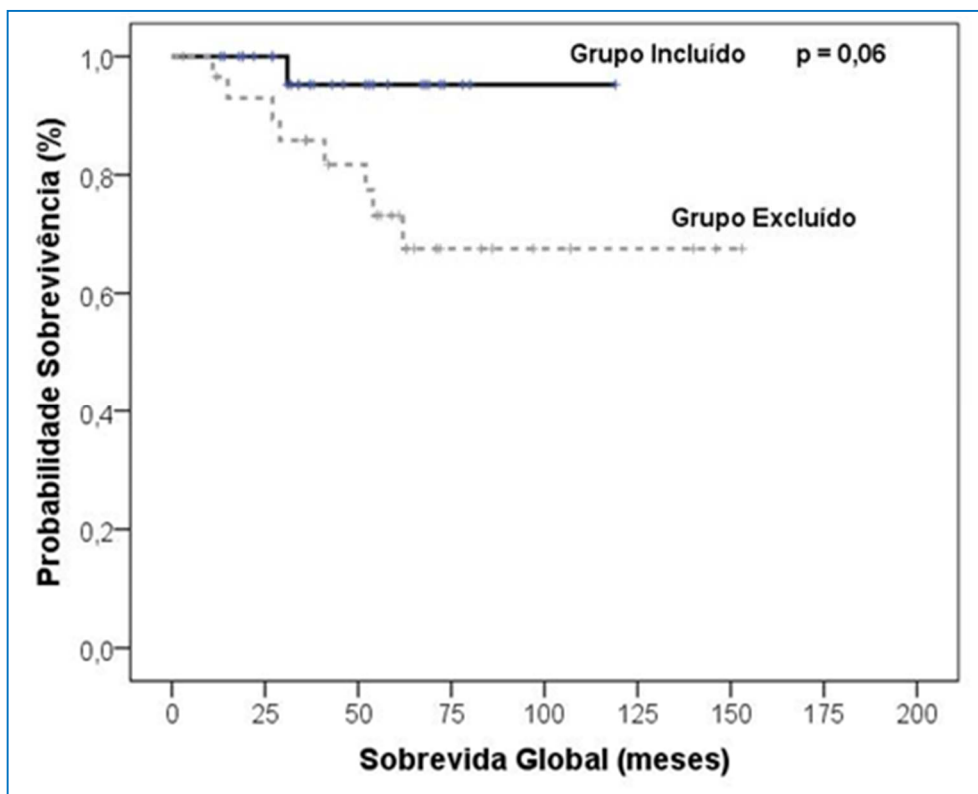
LPM-1 – Proteína de membrana latente tipo 1

EBV – Vírus Epstein-Barr

CISH – Hibridização *in situ* cromogênica

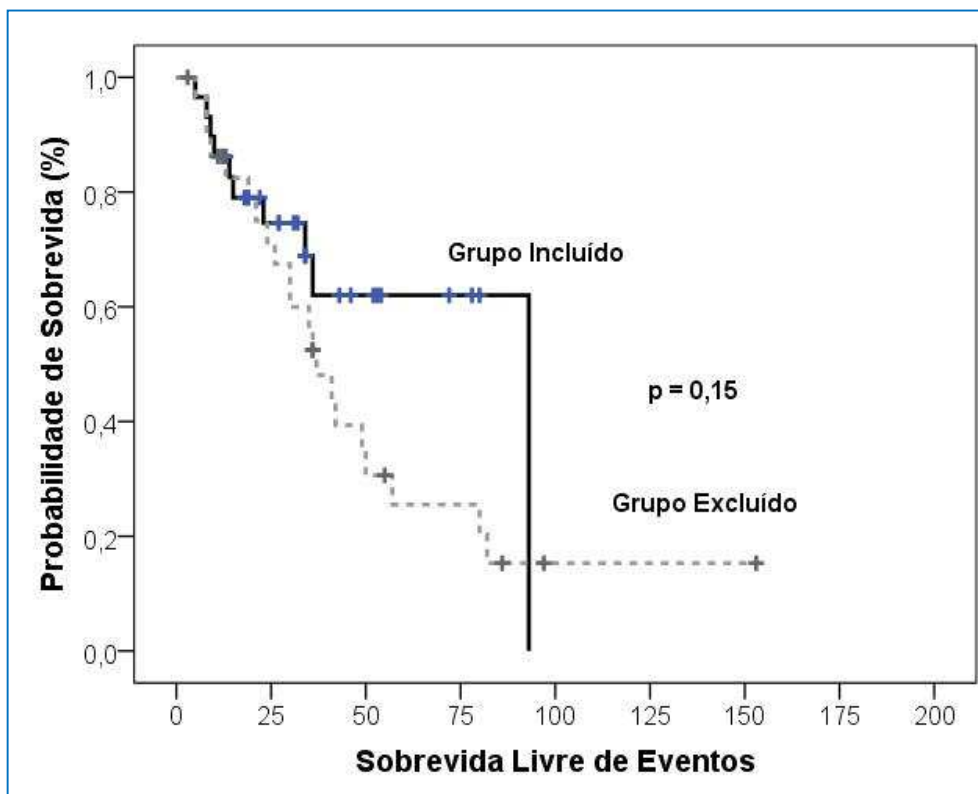
EBER – Ácido ribonucleico do EBV

Figura 8 – Tempo de sobrevida global de pacientes com Linfoma de Hodgkin incluídos (n = 29) e excluídos (n = 30) no presente estudo



Fonte: A autora






Figura 9 – Tempo de sobrevida livre de eventos de pacientes com Linfoma de Hodgkin incluídos (n = 29) e excluídos (n = 30) no presente estudo



Fonte: A autora

ANEXOS

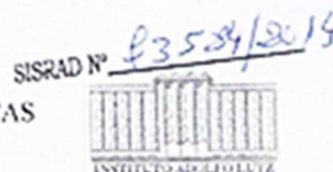
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética pela Plataforma Brasil

- DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA							
<p>Título da Pesquisa: Detecção do Epstein-Barr virus nas células tumorais de pacientes portadores de Linfoma de Hodgkin Pesquisador Responsável: Graziela Toledo Costa Mayrink Área Temática: Versão: 3 CAAE: 40612614.5.0000.5133 Submetido em: 05/05/2015 Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA UFJF Situação da Versão do Projeto: Aprovado Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável Patrocinador Principal: Financiamento Próprio</p>							
							
Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_439976							
+ DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA							
- LISTA DE APRECIÇÕES DO PROJETO							
Apreciação ↕	Pesquisador Responsável ↕	Versão ↕	Submissão ↕	Modificação ↕	Situação ↕	Exclusiva do Centro Coord. ↕	Ações
PO	Graziela Toledo Costa Mayrink	3	05/05/2015	12/05/2015	Aprovado	Não	   
+ HISTÓRICO DE TRÂMITES							
LEGENDA:							
(*) Apreciação							
PO = Projeto Original de Centro Coordenador	POp = Projeto Original de Centro Participante	POc = Projeto Original de Centro Coparticipante					
E = Emenda de Centro Coordenador	Ep = Emenda de Centro Participante	Ec = Emenda de Centro Coparticipante					
N = Notificação de Centro Coordenador	Np = Notificação de Centro Participante						

ANEXO B – Memorando de autorização para parceria de projeto de pesquisa do Instituto Adolfo Lutz



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
Centro de Patologia
Núcleo de Patologia Quantitativa



São Paulo, 29 de Abril de 2014.

Memorando NPQ nº 03/2014

À Diretoria Geral
Sra Diretora Geral Substituta
Dra Carmem A Freitas Oliveira

Assunto: Autorização para estabelecimento de parceria para desenvolvimento de Projeto de Pesquisa

O Núcleo de Patologia Quantitativa (e Molecular) (NPQ) possui infraestrutura e expertise para padronizar e executar os marcadores do Projeto de Mestrado de Graziela Toledo Costa Mayrink do curso de Pós – Graduação em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora / MG intitulado "Detecção do Epstein-Barr vírus nas células tumorais de pacientes portadores de linfoma de Hodgkin: uma avaliação prognóstica".

O projeto terá a participação da médica patologista especialista em linfomas, Dra. Yara de Menezes do Núcleo de Anatomia Patológica que avaliará os resultados das reações.

Uma das linhas de pesquisa do NPQ é a "Caracterização biomolecular de doenças neoplásicas e infecciosas através da hibridização *in situ*". Esta linha tem como objetivos realizar a caracterização biomolecular de doenças neoplásicas e infecciosas em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina, utilizando sondas moleculares, através da técnica de hibridização *in situ*, aplicáveis na rotina diagnóstica e na pesquisa.

Esta parceria visa complementar um projeto em fase de conclusão realizada no NPQ intitulado "Estudo comparativo de cinco sondas comerciais para hibridização *in situ* do vírus Epstein – Barr nos casos de linfoma de Hodgkin subtipo esclero nodular".

A pesquisadora compromete-se a financiar o projeto e doar os reagentes remanescentes, não honerando desta forma a nossa Instituição.

A pesquisadora solicita ainda, autorização para acompanhar a execução das técnicas no laboratório, pois não existe na região de Juiz de Fora quem realize a técnica de hibridização *in situ*.



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
 COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
 INSTITUTO ADOLFO LUTZ
 Centro de Patologia
 Núcleo de Patologia Quantitativa



Informamos que a pesquisadora poderá realizar o estágio no NPQ, desde que sejam preenchidas as formalidades legais requeridas pelo Núcleo de Seleção / Desenvolvimento de Recursos Humanos do IAL.


O IAL tem entre as suas missões "Realizar pesquisa científica e de inovação tecnológica de interesse em Saúde Pública e Formar recursos humanos especializados para laboratórios de interesse à Saúde Pública".

Solicita ainda Declaração de anuência da Direção do IAL para inclusão do nome da Instituição como parceira na Plataforma Brasil.

Os resultados gerados por este Projeto poderão ser apresentados em Congresso ou na forma de artigo científico, divulgando o nome do Instituto Adolfo Lutz.

Desta forma, o Projeto apresentado vai de encontro as linhas de pesquisas desenvolvidas por este Núcleo.

Atenciosamente,


 Suely Nonoga
 Diretor Técnico I
 Núcleo de Patologia Quantitativa

Preliminarmente ao Centro de
Patologia, para manifestação.

Atenciosamente,

M. Camem Oliveira 29/04/2014


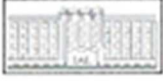
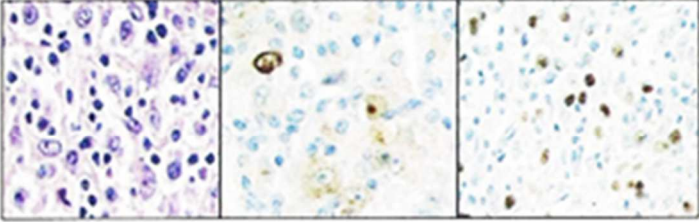
Dra. Camem Aparecida de Freitas Oliveira
Diretora Geral Substituta - IAL

Ciente e de
acordo.

M. Pereira de Oliveira
Diretor Técnico II
Centro de Patologia

Recebido em 29/4/2014
Suelly Nonogaki
Diretor Técnico I
Módulo de Patologia Quantitativa

ANEXO C – Modelo do laudo de revisão histológica e das metodologias de detecção do vírus Epstein-Barr pelo Instituto Adolfo Lutz

		SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS INSTITUTO ADOLFO LUTZ - CENTRO DE PATOLOGIA NÚCLEO DE PATOLOGIA QUANTITATIVA			
Av. Dr. Arnaldo, 355-7º andar. CEP:01246-000 Tel: 11-3068-2874 e-mail: patomol@ial.sp.gov.br					
Biópsia Nº: B13-26753-1, 2 e 3		Nº E:		NPC: 1488-2015	
Paciente:				SIGH:	
Idade:				Sexo: <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> M	
Médico Requisitante: Dra. Graziela Toledo Costa Mayrink					
Instituição/Origem: Hospital Universitário da Univ Federal Juiz de Fora				Médico Instituição: Dra Yara de Menezes	
Doença de Base: Linfoma de Hodgkin Esclerose Nodular. Estadiamento IIIB					
Revisão de caso com pesquisa de EBV por hibridização in situ					
Material Enviado: <input type="checkbox"/> 03 Bloco <input type="checkbox"/> 02 Lâminas				<input type="checkbox"/> Fragmentos <input type="checkbox"/> Meio líquido	
Topografia: Linfonodo ângulo venoso				Fixador utilizado: Formol	
Entrada no Núcleo: 08.01.2015					
Metodologia: Hibridização in situ cromogênica utilizando sonda conjugada a digoxigenina, detectada por polímero conjugado a peroxidase. A positividade é demonstrada pela coloração nuclear marrom dourado. Controles positivo e negativo atestam a fidelidade da reação.					
IMAGEM			RESULTADO		
			Linfoma de Hodgkin esclerose nodular com muitas células neoplásicas e focos de necrose. CISH - EBER: POSITIVO em numerosas células neoplásicas. IHQ - LMP1: POSITIVO em numerosas células neoplásicas com intensidade irregular.		
HE - IHQ - CISH					
Patologista:		Dra. Yara de Menezes		CRM 45279	
Observações:					
Data de Saída: 08.10.2015					

ANEXO D – Comprovante de submissão do Artigo***Expression of Epstein-Barr virus in classical Hodgkin's Lymphoma tumor cells: Correlation of unfavorable factors and survival.***

GRAZIELA TOLEDO COSTA MAYRINK, M.D.; YARA DE MENEZES, PhD; SUELY NONOGAKI; KELLI BORGES DOS SANTOS, PhD; NEUZA KASUMI SHIRATA; LIDIA MIDORI KIMURA; JULIANA MARIOTTI GUERRA; ANGELO ATALLA, PhD; ABRAHAO ELIAS HALLACK NETO, PhD

Infectious Agents and Cancer

Dear Mrs. MAYRINK,

Thank you for submitting your manuscript 'Expression of Epstein-Barr virus in classical Hodgkin's Lymphoma tumor cells: Correlation of unfavorable factors and survival' to Infectious Agents and Cancer.

The submission id is: IAAC-D-16-00058

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following website:

<http://iaac.edmgr.com/>

Best wishes,

Editorial Office

Infectious Agents and Cancer

www.editorialmanager.com/iaac